



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Estudos de imobilização de pectinase de
Aspergillus terreus

Raissa Pieroni Vaz

Brasília - DF, março de 2019

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Estudos de imobilização de pectinase de
*Aspergillus terreus***

Raissa Pieroni Vaz

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília – DF, março de 2019

Estudos de imobilização de pectinase de *Aspergillus terreus*

Raissa Pieroni Vaz

Tese de Doutorado

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale

Dr^a. Ana Cláudia Vici

Dr. Caio de Oliveira Gorgulho

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Edivaldo Ximenes por me recepcionar tão bem em seu laboratório, tão logo quando cheguei em Brasília. Realizei meu mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e no doutorado, apesar da mudança de cidade, ambiente e linha de pesquisa, fui prontamente bem recebida pelo professor. Tão receptivo, atencioso e disponível. Além disso, o agradeço imensamente pela ajuda, dedicação e orientação ao longo da pesquisa.

Gostaria de agradecer aos meus colegas e amigos do laboratório. Helder, Ton, Caio, Andreza, Carol, Diandra, Guilherme, Leonora, Pedro. Obrigada pelos auxílios científicos, psicológicos, pelas conversas, risadas e tudo mais. Vocês fizeram com que Brasília fosse um lugar mais familiar para mim.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos André por abrir as portas do seu laboratório para que eu realizasse parte dos meus experimentos. Foi essencial para a minha pesquisa. Também o agradeço pelas tutorias no Simpósio de Biologia Molecular. Todas as ideias e contribuições foram bem vindas.

Também gostaria de agradecer infinitamente a Prof^a. Dr^a. Polizeli e a Dr^a. Ana Claudia Vici por me recepcionarem tão bem em seu laboratório na USP de Ribeirão Preto. Sem vocês eu estaria tentando imobilizar minhas enzimas até hoje. Os conhecimentos transmitidos foram primordiais para a minha pesquisa. Sou eternamente grata.

Agradeço ao Departamento de Física e de Microbiologia da UFMG por me auxiliarem nos experimentos envolvendo nanotecnologia. Principalmente ao Prof. Dr. Luiz Orlando e Prof. Dr. Ary Correa. Obrigada por me cederem as amostras de nanotubos e por proporcionarem a realização das caracterizações deste material no laboratório de vocês.

Também agradeço a Prof^a. Dr^a. Sônia Maria de Freitas, do Laboratório de Biofísica, a Prof^a. Dr^a. Pérola Magalhães, do Laboratório de Produtos Naturais, e o pessoal do Laboratório de Microscopia por me auxiliarem em partes essenciais da minha pesquisa.

Ressalto a importância da CAPES, CNPQ e FAP-DF, pois através dessas agências recebi fomento por bolsa de doutorado, projetos de pesquisa e auxílio para participação em congresso. Esse incentivo foi primordial para minha jornada. Também agradeço ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular por me proporcionar uma vaga no programa e permitir que eu executasse meu projeto.

Por fim, agradeço imensamente a minha família, mãe, pai, irmãos e marido por me apoiarem e incentivarem ao longo destes 4 anos. Sempre pacientes para escutar coisas das quais mal entendiam. Amo vocês.

Resumo

A catálise enzimática é uma técnica cada vez mais utilizada em diversos setores industriais. Isso porque as enzimas, além de apresentarem alta especificidade pelo substrato, representam a possibilidade de um processo ambientalmente amigável e não dependente de recursos fósseis. No entanto, para ampla aplicação da tecnologia enzimática na indústria, o fator reutilização é extremamente relevante, e representa um grande desafio do ponto de vista técnico-econômico. Além disso, a manutenção e otimização da estabilidade estrutural das enzimas durante os processos químicos também configura um importante obstáculo a ser superado. Nesse âmbito, a imobilização enzimática surge como uma alternativa para a superação dos desafios apresentados, visto que essa técnica pode proporcionar a melhora da estabilidade enzimática, além de permitir o reuso de enzimas, tornando os processos mais produtivos, menos onerosos, e de fato competitivos em relação às químicas tradicionais já adotadas. Diante do quadro apresentado, o presente estudo envolveu a produção, purificação parcial, imobilização e caracterização de uma pectinase de *Aspergillus terreus*, visando uma potencial aplicação das enzimas imobilizadas na indústria. O fungo *A. terreus* foi capaz de produzir diferentes holocelulases quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar, com predominância de atividade da pectinase. Dessa forma, a pectinase foi selecionada para os estudos de purificação e imobilização. Após as etapas de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular foi possível semi-purificar a enzima com rendimento parcial de 79,9%. A pectinase do extrato bruto e a enzima parcialmente purificada foram imobilizadas em MANAE-agarose com rendimentos de 66 e 98%, respectivamente. Após a imobilização no suporte MANAE, a pectinase apresentou uma maior atividade em pH ácido (pH=4), quando comparado a enzima não imobilizada. Também foi constatado que após o procedimento de imobilização houve uma melhora de até 200% na termoestabilidade da enzima. Ademais, foi possível reutilizar a enzima imobilizada por até 5 ciclos de hidrólise com efetiva produção de açúcares redutores. Por fim, os testes de aplicação industrial revelaram uma redução significativa na viscosidade do suco de goiaba quando utilizada a enzima imobilizada. Embora que para uma real aplicação industrial sejam necessários estudos adicionais, como de toxicidade do suporte de imobilização, os resultados aqui obtidos revelam o potencial de aplicação das enzimas imobilizadas na indústria.

Abstract

Enzymatic catalysis is an increasingly used technique in many industrial sectors. This is because enzymes have high substrate specificity and represent the possibility of an environmentally friendly process and not dependent on fossil resources. However, for the widespread application of enzymatic technology in the industry, the reuse factor is extremely relevant and represents a major challenge from the technical-economic point of view. Also, the maintenance and optimization of the structural stability of the enzymes during the chemical processes also constitutes a major obstacle to be overcome. In this context, enzymatic immobilization appears as an alternative to overcome the presented challenges, since this technique can improve enzyme stability and allows the reuse of enzymes, making the processes more productive, less expensive, and competitive about the traditional chemicals already adopted. The present study involved the production, partial purification, immobilization and characterization of *Aspergillus terreus* pectinase, aiming at the application of immobilized enzymes in the industry. *A. terreus* was able to produce different holo-cellulases when grown in sugarcane bagasse, with predominance of pectinase activity. Thus, pectinase was selected for purification and immobilization studies. After the steps of ion exchange and molecular exclusion chromatography it was possible to semi-purify the enzyme with partial yield of 79,9%. The crude extract pectinase and the partially purified enzyme were immobilized on MANAE-agarose in yields of 66 and 98%, respectively. After immobilization in MANAE-agarose, the pectinase showed higher activity at acid pH (pH = 4) when compared to the non-immobilized enzyme. It was also found that after the immobilization process, there was an improvement of up to 200% in the thermostability of the enzyme. Also, it was possible to reuse the immobilized enzyme for up to 5 cycles of hydrolysis with effective production of reducing sugars. Finally, the industrial application tests revealed a significant decrease in the viscosity of guava juice when the immobilized enzyme was used. Although additional studies (such as immobilization's support toxicity) are needed for a realistic industrial application, the results obtained herein reveal the potential of application of immobilized enzyme in the industry.

Sumário

Capítulo I: Introdução a imobilização enzimática	1
1. Introdução	2
2. Objetivo geral da tese	13
3. Justificativa geral da tese.....	13
4. Referências.....	14
Capítulo II: Seleção da enzima: Produção e purificação parcial de uma pectinase de <i>Aspergillus terreus</i>	16
1. Introdução	17
2. Objetivos específicos	20
3. Metodologia	20
3.1. Reagentes	20
3.2. Resíduos agroindustriais	21
3.3. Pré-tratamento do resíduo.....	21
3.4. Origem do microrganismo e manutenção.....	21
3.5. Cultivo em estado sólido.....	22
3.6. Determinação da atividade enzimática de holocelulases	22
3.7. Determinação de proteínas totais.....	23
3.8. Ultrafiltração do extrato bruto enzimático	23
3.9. Purificação parcial da pectinase	24
3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.....	24
3.11. Coloração com nitrato de prata	25
3.12. Zimograma.....	26
4. Resultados e discussão	26
4.1. Perfil enzimático do extrato bruto de <i>A. terreus</i>	26
4.2. Ultrafiltração.....	28
4.3. Cromatografia de troca iônica.....	29
4.4. Cromatografia de exclusão molecular	30
4.5. Eletroforese: SDS-Page e Zimograma	32
5. Conclusões e perspectivas futuras	35
6. Referências.....	35
Capítulo III: Funcionalização/caracterização dos nanotubos de carbono e sua utilização em imobilização enzimática.....	40
1. Introdução	41
2. Objetivos específicos	43

3.	Metodologia	43
3.1.	Amostra	43
3.2.	Funcionalização.....	44
3.3.	Teste de solubilidade dos nanotubos de carbono	44
3.4.	Análise termogravimétrica e térmica diferencial	44
3.5.	Espectroscopia Raman.....	45
3.6.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
3.7.	Ensaio de imobilização enzimática nos nanotubos de carbono	46
4.	Resultados e discussão	46
4.1.	Teste de solubilidade.....	46
4.2.	Análise termogravimétrica e térmica diferencial	48
4.3.	Espectroscopia Raman.....	51
4.4.	Microscopia eletrônica de varredura.....	52
4.5.	Ensaio de imobilização enzimática	54
5.	Conclusões e perspectivas futuras	54
6.	Referências.....	55
Capítulo IV: <i>Screening</i> de diferentes suportes para imobilização		59
1.	Introdução	60
2.	Objetivos específicos	80
3.	Metodologia	80
3.1.	Amostras.....	80
3.2.	Síntese do suporte glioxil agarose.....	81
3.3.	Síntese do suporte MANAE-agarose.....	81
3.4.	Imobilização das enzimas nos suportes CM, MANAE e glioxil agarose.....	81
3.5.	Imobilização em alginato de cálcio	82
3.6.	Constatação da imobilização e cálculo das taxas de imobilização	82
4.	Resultados e discussão	83
4.1.	Taxas de imobilização das enzimas nos suportes	83
5.	Conclusões e perspectivas futuras	88
6.	Referências.....	89
Capítulo V: Caracterização das enzimas livres e imobilizadas		92
1.	Introdução	93
2.	Objetivos específicos	94
3.	Metodologia	94
3.1.	Amostras.....	94
3.2.	Determinação do efeito do pH na atividade enzimática	94
3.3.	Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática.....	95

3.4.	Termoestabilidade	95
3.5.	Determinação de parâmetro cinéticos	95
3.6.	Determinação do efeito de íons e compostos fenólicos	95
3.7.	Caracterização física da amostra de enzima imobilizada.....	96
3.8.	Hidrólise enzimática.....	96
3.9.	Teste de reuso da enzima imobilizada	97
3.10.	Experimento de redução de viscosidade de polpas de frutas	97
4.	Resultados e discussão	98
4.1.	Determinação do efeito do pH na atividade enzimática	98
4.2.	Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática.....	101
4.3.	Termoestabilidade	102
4.4.	Determinação de parâmetros cinéticos	105
4.5.	Determinação do efeito de íons na atividade enzimática	107
4.6.	Determinação do efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática.....	112
4.7.	Caracterização física da enzima imobilizada: Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	114
4.8.	Hidrólise enzimática.....	116
4.9.	Teste de reuso da enzima imobilizada	117
4.10.	Redução da viscosidade da polpa de suco de goiaba	119
5.	Conclusões e perspectivas futuras	121
6.	Referências.....	122
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
	ANEXO I.....	128

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Perfil de holocelulases de <i>A. terreus</i> no extrato bruto, concentrado e ultrafiltrado.....	29
Tabela 2 - Rendimento e índice de purificação parcial de PEC2.	34
Tabela 3 - Resultados do comprimento médio e grau de funcionalização para os MWCNT's funcionalizados por diferentes tempos de tratamento ácido.	53
Tabela 4 - Taxa de imobilização da pectinase do extrato bruto e PEC2 em diferentes suportes e suas atividades enzimáticas após imobilização.....	84
Tabela 5 - Atividade de holocelulases do extrato bruto de <i>A. terreus</i> não imobilizado e do derivado (extrato bruto+suporte).	86
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de PEC2 e PECEB livre e imobilizadas em MANAE-agarose.....	105
Tabela 7 - Efeitos de íons e outros compostos (concentração de 1 e 10 mM) na atividade catalítica da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada.	108
Tabela 8 - Efeitos de íons e outro compostos (concentração de 1 e 10 mM) na atividade catalítica da pectinase parcialmente purificada livre e imobilizada.	111
Tabela 9 - Efeitos de compostos fenólicos na atividade enzimática da pectinase do extrato bruto (PECEB) livre e imobilizada.	113
Tabela 10 - Efeitos de compostos fenólicos na atividade enzimática da pectinase parcialmente purificada (PEC2) livre e imobilizada.	114
Tabela 11 - Avaliação da redução da viscosidade da polpa de goiaba utilizando a pectinase do extrato bruto de <i>A. terreus</i> livre (PECEB) e imobilizada em MANAE-agarose (PECEB-MANAE) nas concentrações de 5 U de pectinase e 50 µg de proteínas.....	119

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes tipos de pectinases e suas ações sobre a pectina. As setas indicam o local de ação da enzima.....	18
Figura 2 - Determinação da atividade de holocelulases no extrato bruto de <i>A. terreu</i> ..	27
Figura 3 - Perfil cromatográfico da troca iônica em resina HiTrap Q FF..	30
Figura 4 - Perfil cromatográfico da fração PEC1 em resina HiPrep16/60 Sephacryl S-100 HR de exclusão molecular.....	31
Figura 5 - Fluxograma das etapas de purificação da PEC2.	32
Figura 6 - Gel de eletroforese em condições desnaturantes e zimograma.	33
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura básica de um nanotubo de carbono.....	41
Figura 8 - Nanotubo de parede única (SWNT's) à esquerda e nanotubo de parede múltipla à direita (MWCNT's).....	42
Figura 9 - Teste de solubilidade dos MWCNT's..	47
Figura 10 - Análise termogravimétrica dos MWCNT's.....	50
Figura 11 - Espectro Raman dos MWCNT's não funcionalizados.....	51
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura dos MWCNT's.....	53
Figura 13 - Exemplo de imobilização colvalente multipontual irreversível utilizando suporte glioxil agarose.....	61
Figura 14 - Exemplos de imobilização reversível.	62
Figura 15 - Imobilização por encapsulação.	63
Figura 16 - Gel de eletroforese em condições desnaturantes.....	87
Figura 17 - Gel de eletroforese em condições desnaturantes.....	88
Figura 18 - Efeito do pH na atividade de PEC2 livre e imobilizada em MANAE-agarose	99
Figura 19 - Efeito do pH na atividade da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada em MANAE-agarose.....	100
Figura 20 - Efeito da temperatura nas atividades de PEC2 livre e imobilizada em MANAE-agarose.....	101
Figura 21 - Efeito da temperatura nas atividades da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada em MANAE-agarose.....	102
Figura 22 - Teste de termoestabilidade da PEC2 livre e imobilizada em MANAE-agarose, em 40°C de pré-incubação.	103
Figura 23 - Teste de termoestabilidade da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada em MANAE-agarose, em 40°C pré-incubação.	104

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras.....	115
Figura 25 – Perfil de hidrólise enzimática da pectinase do extrato bruto de <i>A. terreus</i> livre e imobilizada em MANAE-agarose.	116
Figura 26 - Experimento de reuso da pectinase do extrato bruto de <i>A. terreus</i> imobilizada em MANAE-agarose.....	118

Capítulo I: Introdução a imobilização enzimática

1. Introdução

A utilização de enzimas pelo homem remonta os tempos mais antigos da civilização. Ainda nos tempos remotos os povos egípcios produziam cerveja e vinho por fermentação enzimática, mesmo sem a exata compreensão dos mecanismos envolvidos no processo. Somente no fim século XVIII a biocatálise foi descrita pela primeira vez, através de estudos da digestão de carnes por secreções de estômago (HOMAEI *et al.*, 2013; POLAINA *et al.*, 2007).

O conhecimento crescente e os recentes avanços em técnicas de produção, purificação, caracterização de enzimas e engenharia proteica despertaram grande interesse para as aplicações biotecnológicas destes catalisadores (HOMAEI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013). Isso porque as enzimas apresentam alta seletividade, especificidade e atividade em condições ambientais, aliado ao baixo impacto ambiental gerado, quando comparado aos catalisadores químicos comumente utilizados nos processos industriais (SINGH *et al.*, 2013; GARCIA GALAN *et al.*, 2011).

Diversas enzimas são comercializadas atualmente, como por exemplo, as amilases, proteases, lipases, celulasas, e a cada dia cresce mais a demanda por estes produtos. Estima-se que o mercado de enzimas industriais movimente uma receita de até U\$6.3 bilhões em 2022 (MARKETS AND MARKETS, 2016).

Dentre as enzimas de grande interesse industrial, as holocelulasas (celulasas, hemicelulasas e pectinases) são um grupo de notória importância no mercado mundial, pois podem ser empregadas em diversos processos industriais, incluindo a produção e beneficiamento de alimentos, bebidas e rações animais, indústrias de polpa de papel e celulose, produção de bioetanol de segunda geração (2G), entre outras (BINOD *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012).

Atualmente, os principais desafios das indústrias que utilizam biocatalizadores são o aumento da produtividade das enzimas e o desenvolvimento de novas técnicas que otimizem os processos de catálise

enzimática (DATTA *et al.*, 2013). Estes requisitos são imprescindíveis para proporcionar uma produção em larga escala e uma formulação econômica. Além disso, para ampla comercialização e emprego de enzimas na indústria, o fator reutilização é extremamente relevante, e representa um grande desafio técnico-econômico (KAWAGUTI *et al.*, 2006).

Dessa forma, a imobilização enzimática surge como uma possível alternativa para os desafios apresentados, pois ela pode melhorar a estabilidade enzimática, permitir a reutilização de enzimas, diminuir a sua perda no processo, e proporcionar uma fácil separação dos produtos gerados (WANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2006).

No contexto acima descrito, foi realizada uma revisão de literatura publicada no periódico *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Fator de impacto 2.26), intitulada “*An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production*” (2016). O artigo aborda o conceito de imobilização enzimática, discute as diversas técnicas de imobilização e diferentes suportes utilizados, apresenta o atual estado da arte sobre imobilização de holocelulases visando à aplicação na indústria, e expõe perspectivas futuras no âmbito de imobilização.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production



Raissa Pieroni Vaz, Leonora Rios de Souza Moreira, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho *

Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70910-900, Brazil

article info

Article history:

Received 25 April 2016

Received in revised form 25 July 2016

Accepted 10 August 2016

Available online 11 August 2016

Keywords:

Immobilization

Holocellulases

Cellulases

Xylanases

Bioethanol

abstract

Enzymes are biocatalysts with huge potential for industry because they have specific catalytic properties, are easy to produce, and are environmentally friendly. These biocatalysts are remarkable molecules for use in the field of bioprocessing technology. However, for certain biocatalytic processes, native enzymes do not meet the requirements for large-scale application; therefore, their natural properties need to be modulated. Another consideration is that the current global demands of the biotechnology industry require increasing productivity of processes and reduction of costs. In this context, enzyme immobilization can be a low-cost approach to the development of more robust and resistant systems to industrial conditions. Immobilized enzymes provide greater stability, sensitivity, and catalytic activity, than free enzymes do, in addition to improved purification processes and the potential for reuse of the enzymes. Among different classes of enzymes, holocellulases are important because they have a broad application spectrum in key industries, such as food, textiles, and biofuels, which are billion-dollar industries. We compiled recent reports of holocellulase immobilization achieved using different techniques, with the focus on the production of bioethanol, a product with growing global demand. In this review, we discuss the concept of immobilization, immobilization techniques, and the state of the art with respect to immobilized holocellulases. We also discuss recent trends in immobilization for second-generation ethanol production and future prospects for industrial applications of immobilized enzymes.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	127
2. Holocellulose-degrading enzymes	128
3. Enzyme immobilization	128
3.1. Immobilization techniques	129
3.2. Support materials	129
4. Immobilized cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their applications	130
4.1. Cellulases	130
4.2. Hemicellulases	131
5. New trends in immobilization for bioethanol production	132
6. Future prospects	132
Acknowledgments	133
References	133

1. Introduction

The steady growth of the world's population has increased the demands for food, fuel, and energy sources. However, feedstocks

from natural and nonrenewable sources are depleted every day, and many are very close to exhaustion. Considering this situation, there are global efforts to search for sustainable, renewable, cheap, and environmentally friendly solutions to resource depletion [1].

Brazil is the largest producer of sugarcane and ethanol. In 2015, 590 million tons of sugarcane was harvested, and a large part of the harvest produced approximately 2.34 billion liters of ethanol. This

* Corresponding author.

E-mail addresses: eximenes@unb.br, eximenes.1@gmail.com (E.X. Ferreira Filho).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.006> 1381-1177/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

market is constantly growing; a 5% increase in ethanol production is predicted in 2016 compared with that in 2015, with the exportation of >1.3 billion liters [2].

However, because of growing global demand for this fuel, exhaustion of nonrenewable sources, and accumulation of waste from the processing of sugarcane (bagasse and straw) in the environment, there is special interest in exploitation of the energy available in lignocellulosic biomasses to produce bioethanol. The use of agro-industrial waste allied to biocatalysis has promoted increased ethanol production in a sustainable and environmentally friendly way [3].

Enzymes are biological catalysts that have great potential for application in different industry branches [4]. This potential is attributed to the selectivity, specificity, easy production, and environmentally sustainable applications possible with enzymes [5]. Among different classes of enzymes, holoenzymes are a group with great industrial importance because they have wide applications in textiles, pulp, paper, food, animal feed, and the bioethanol industry [6,7].

However, to achieve wider application of these enzymes in industry, more stable enzyme systems and economical processes are required. Many industrial processes occur under conditions of extreme pH and temperature and generate inhibitory products for enzymes. In addition, mechanisms that allow the use of small amounts of enzymes or enable their reuse are also required to reduce overall costs [8–10]. These requirements are essential for increasing productivity and providing large-scale economic formulations [5].

To meet all of these needs, enzyme immobilization is one of the tools suggested by many researchers [5,11–14]. Immobilization appears to be an effective alternative method because it allows reuse of enzymes, decreases their loss, provides easy separation of products, increases chemical and physical stability of the enzymes, decreases their inhibition, and increases their specificity and selectivity [15,16]. When performed correctly, enzyme immobilization enhances the productivity of processes, decreases overall costs, and provides an economical and environmentally friendly catalysis approach [17].

To the best of our knowledge, this is the first review of holoenzyme immobilization studies. We discuss techniques and methods for enzyme immobilization and present the state of the art of research in this field, with a focus on the immobilization of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their potential applications in industry, especially in the bioenergy sector for production of second-generation bioethanol.

2. Holoenzyme-degrading enzymes

Holoenzyme is the carbohydrate portion of lignocellulose and holds most of the energy contained in this vegetal component. Among the enzymes that show holoenzyme activity, xylanase, mannanase, endoglucanase, and exoglucanase have important roles in breakdown of the polysaccharide backbone [18,19]. In addition to holoenzymes, other recently discovered proteins and nonhydrolytic enzymes also have important roles in breaking and depolymerizing lignocellulose. These molecules are expansins and auxiliary activity enzymes. Swollenin has the ability to disrupt hydrogen bonds, reduce cellulose crystallinity, and increase cellulase accessibility [20,21]. Lytic polysaccharide mono-oxygenases are metalloenzymes that oxidize the glycosidic bonds in cellulose, hemicellulose, and chitin. They are able to increase the activity of classic glycosyl hydrolases by acting synergistically with these enzymes in the deconstruction of lignocellulosic biomasses [22,23].

All enzymes described in this review can be used for immobilization processes, but we have chosen to focus on holoenzymes,

a group of enzymes with broad industrial applications, mainly in bioethanol production.

The ligninolytic enzymes are also extremely important for the degradation of lignocellulose; however, these enzymes will not be discussed in depth because a review in the literature focusing on their immobilization and applications has already been published [17].

3. Enzyme immobilization

Enzyme immobilization can be defined as the confinement of free/soluble enzymes to a phase (matrix, support, or aggregate) different from a substrate or product [5,12]. This approach overcomes most of the restrictions of industrial processes, such as low thermal stability, low pH stability, loss of catalytic activity after one cycle, enzyme inhibition by substrates or by-products, loss of enzyme during product separation, and difficulty in the purification step [14,24–26].

Immobilization increases the thermal stability and provides greater stability of the enzyme under pH and temperature extremes because immobilization provides a more rigid external backbone for enzyme binding. Thus, the effect of high temperature or extreme pH in the breaking of interactions or the unfolding of secondary/tertiary structures of enzymes are minimized [27].

The same explanation also applies to the retention of activity after several cycles of use, the reduction in enzyme inhibition, and the increase in storage stability because enzymes are less accessible to interactions caused by inhibitory and denaturing agents, which makes them less exposed to these agents. Moreover, immobilization also decreases mass transfer by reducing the diffusion of substrates and other inhibitory agents for the enzymes. Thus, immobilization can decrease the affinity of an enzyme for a substrate but it can also reduce the interference of external agents in enzyme catalysis [26,27].

Although immobilization allows the functional optimization of enzymes, this process also has an impact on the catalytic activity. An enzyme may be denatured and lose its activity when solubilized in the immobilization medium or during the binding step of immobilization process. Immobilization generally promotes new interactions between the enzyme and support, which in turn can change the final configuration of the biocatalyst and its catalytic activity [13]. Within the same context, ionic strength and pH in the immobilization medium may lead to denaturation of the enzyme. Factors linked to the immobilization process itself can also cause loss of enzyme activity. As previously mentioned, the decrease in mass transfer between enzyme and substrate caused by the immobilization process generates diffusion problems that lead to loss of affinity and activity of the enzyme. Furthermore, it is known that the binding site and the active site of the enzyme play a crucial role in catalysis and, during the immobilization process, these sites can be blocked or distorted, which results in loss of activity [11,27–29].

However, these difficulties may be solved with the most appropriate choice of the support material and immobilization approach to the desired objective. For example, there are approaches that use a one-point attached derivative, which are hydrophilic, long and flexible spacers that mimic the soluble enzyme [30]. The design and the selection of more controlled immobilization approaches (and nonrandom) are also plausible solutions to obtain suitable enzyme orientation and relevant activity. Hernandez et al. [31] reported that different immobilization approaches can result in different oriented enzyme molecules, depending upon the immobilization approach [13,31]. The use of non-porous nanomaterials is an alternative to solve the substrate diffusion problems, as they have reduced mass-transfer limitations, which decrease the loss of catalytic activity of the enzyme [32]. Furthermore it is important

to assess the cost-benefit ratio. In some cases, the loss of catalytic activity is less important when compared to a gain of functional properties, such as thermal stability, reuse, etc.

Other benefits of immobilization are enzyme reuse with decreased enzyme loss and easy separation of generated products, all provided by simple isolation of material support from the reaction medium. In other industrial applications, such separation is a complex process involving the use of highly concentrated solutions of products. Immobilized enzymes can be separated from products by physical removal of support when macro carriers are used, through precipitation, filtration or magnetism, depending on the characteristics of the support material [27,33]. The physical removal, filtration and precipitation are simple and inexpensive, but do not provide a high recovery of the biocatalyst and do not allow a good separation and recovery of products. The precipitation and filtration processes also generate aggregates and clusters of enzymes, which will change their catalytic activities. These processes are also more vulnerable to contamination [27,33,34].

Magnetic separation is an emerging technology that uses magnetism to efficient separation of iron-magnetic particles. In particular, the magnetic nanoparticles exhibit superparamagnetism, which means that the particles are attracted by a magnetic field, but not retain any residual magnetism after the field is removed. Therefore, the superparamagnetic particles in suspension can be removed of the solution using a magnet external, without the formation of enzyme agglomerates after removal of the external magnetic field [35].

There are several studies describing the use of magnetic nanoparticles for the immobilization of enzymes, however this technique is more complex, expensive and requires the synthesis of nanoparticles [36,37].

The selection of both the immobilization strategy and immobilization support directly affects the biocatalyst's properties. An

ideal support must be accessible and have certain characteristics, such as inertness, physical strength, regenerability, and stability. A support also should be able to increase enzyme specificity and activity and must decrease product inhibition, microbial contamination, and nonspecific adsorption [38].

3.1. Immobilization techniques

Each industrial process requires a specific operating condition for the desired product. Thus, selection of the immobilization technique is an extremely important step in the overall process and can lead to reductions in time and costs [39]. The main immobilization techniques are adsorption, crosslinked enzyme crystals (CLECs) and crosslinked enzyme aggregates (CLEAs), covalent binding, entrapment and encapsulation. These approaches are shown in Fig. 1.

3.2. Support materials

The properties of immobilization systems are defined by the enzyme and support characteristics. The interactions between enzyme and substrate properties generate specific chemical, biochemical, mechanical, and kinetic properties [11]. All supports belong to three categories: synthetic organic polymers, biopolymers, and inorganic solids [40].

Among synthetic polymers, the most used are acrylic resins; e.g., Eupergit C and polyketones polymers [41–43]. The most reported biopolymers are water-insoluble polysaccharides, such as cellulose, starch, agarose, and chitosan. There are many studies on hydrogels, such as polyvinyl alcohol [40,44–46]. Finally, among inorganic solids, there are several reports of silica, mesoporous silica, alumina, and conductive polymers.

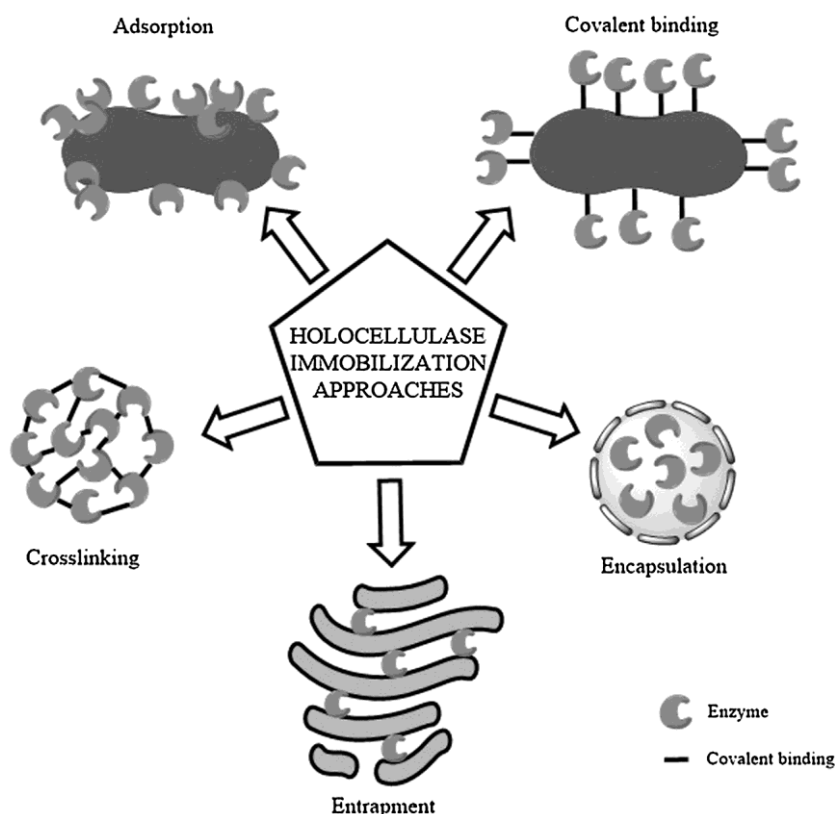


Fig. 1. Potential approaches of holocellulase immobilization.

Table 1
Immobilization of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by different approaches and their industrial applications.

Enzyme	Support material and technique	Suggested application	References
Cellulase (commercial)	CLEAs by plasma immersion ion implantation	Food, brewing, textile, pulp, and paper industries	[68]
Meicelase (commercial cellulase from <i>T. reesei</i>)	Aminosilica-1 (adsorption)	Cellulose hydrolysis	[69]
Celluclast (commercial cellulase from <i>T. reesei</i>) and Novozymes 188 (commercial β -glucosidase from <i>A. niger</i>)	Polyurethane foam (adsorption)	Cellulose hydrolysis and ethanol industry	[70]
Cellulase (from <i>T. reesei</i>)	Silicon wafers and amino-terminated surfaces (adsorption)	Ethanol industry	[71]
C30 (commercial cellulase from <i>T. reesei</i>)	DEAE-Macrosorb (adsorption)	Cellulose and lignocellulose hydrolysis	[72]
Cellulase (commercial from <i>T. reesei</i>)	Mesoporous silica and mesoporous silica nanoparticle (adsorption)	Ethanol industry	[73] [74]
Xylanase (from <i>T. reesei</i>)	Calcium alginate gel (entrapment)	Cellulose hydrolysis, pulp, paper, and feed industries	[75]
Celluclast BG (commercial cellulase) and Pentopan Mono BG (commercial xylanase)	Alginate-chitin and chitosan-chitin (adsorption and CLEA's)	Textile, pulp, paper, feed, biofuel, animal feed industries	[76]
Pectinex™ 3X (commercial cellulase and xylanase from <i>A. niger</i>)	Eudragit L-100 (adsorption and covalent binding)	Ethanol, paper, and pulp industries	[77] [78]
Xylanase (from <i>Aspergillus</i> sp.)	Eudragit S-100 (adsorption)	Food, pharmaceutical, and feed industries	
Endo-glucanase, exo-glucanase, and β -glucosidase	Au-doped magnetic silica nanoparticles (covalent binding)	Cellulose hydrolysis	[79]
Cellulase (commercial from <i>T. reesei</i>)	Magnetic nanoparticle (covalent binding and adsorption) and superparamagnetic nanoparticles (adsorption)	Ethanol industry	[34,80–82]
Xylanase (commercial from <i>Thermomyces lanuginosus</i>)			
β -glucosidase (commercial from <i>A. niger</i>)			
Xylanase (commercial from <i>Thermomyces lanuginosus</i>)			
Xylanase (recombinant from <i>Neocallimastix frontalis</i>)	Metal-chelate matrix (adsorption and covalent binding)	Xylan hydrolysis	[83]
Xylanase NS50014 (commercial)	Agarose and chitosan (covalent binding)	Pulp bleaching	[84]
Xylanase (from <i>A. niger</i>)	Dialdehyde-cross-linked chitosan (covalent binding)	Xylan hydrolysis	[85]
Xylanase (commercial from <i>T. reesei</i>)	Polysulfone acrylate membranes (covalent binding)	Biomass treatment	[86,87]
Novozymes 188 (commercial β -glucosidase from <i>A. niger</i>)	Silica gel and kaolin carriers (adsorption and covalent binding)	Cellulose hydrolysis	
Xylanase (recombinant from <i>T. reesei</i>)	Poly (ethylene glycol) methyl ether 500 (covalent binding)	Production of xylo-oligosaccharides	[88,89]
Xylanase and β -xylosidase (from <i>A. niger</i>)	Tannin-chitosan, Dowex-50W, chitosan, polyacrylamide (adsorption, ionic binding, covalent binding, and entrapment)	Cellulose pulping and hemicellulose hydrolysis	
Pulpzyme (commercial xylanase)	Radical grafting of acrylamide on cellulose acetate membranes (covalent binding)	Xylan hydrolysis	[90]
Xylanase (from <i>Talaromyces thermophilus</i>)	Glutaraldehyde-activated gelatin (covalent binding)	Production of xylo-oligosaccharides	[91,92]
Xylanase (recombinant from <i>Penicillium ocityanis</i>)	Metal-chelate Eupergit C (covalent binding)	Pulp, paper, food, and feed industries, and xylo-oligosaccharides production	

With the advent of nanotechnology in the XXI century, nanomaterials have attracted the attention of researchers in the field of enzyme immobilization. The main reason for this attraction is related to the fact that these nanoparticles show high volume/size ratio. Consequently, this may result in reducing the size of the bioreactors, since it is possible to load a greater amount of enzyme per unit weight of the carrier [47].

Nanomaterials constitute interesting and emerging matrices for enzyme immobilization. Some studies using nanomaterials as immobilization agents, such as gold and magnetic nanoparticles, carbon nanotubes, carbon derivatives, have also been reported [15,32–36,47–56].

Within the concept of nanotechnology, nanoporous materials are type of supports which consist of organic or inorganic regular structures (bulk materials or membranes) containing pores of 100 nm or less. These materials can be manufactured and also found in nature [55,56]. Nanoporous materials have special properties,

including catalytic, diffusion, sensory and adsorptive properties. Examples of these material supports are activated carbon, cells, mesoporous titanium dioxide, aerogels, polycarbonate and membranes [48–56].

4. Immobilized cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their applications

Several studies describing cellulase and hemicellulase immobilization on different supports are found in the literature. These studies are presented in Table 1, and the most relevant are discussed in the following sections.

4.1. Cellulases

Different approaches and material supports have been used for cellulase immobilization, which have led in most cases to optimiza-

tion of enzyme characteristics, such as thermostability, reusability, and gain of activity.

One of the first reports of cellulase immobilization was a β -glycosidase of *Aspergillus niger* and cellulase from *Trichoderma reesei* [57]. These enzymes were covalently co-immobilized to a hydrophilic polyurethane matrix. The co-immobilized enzymes were applied in the hydrolysis of soluble and insoluble cellulose and showed increases of 2.5 and four times in glucose production from that of the respective free enzymes. Furthermore, immobilized β -glycosidase was highly stable, with 95% of the activity retention after 1000 h of continuous use. Jones and Vasudevan [58] developed CLEAs of *T. reesei* cellulase and 1-ethyl-3-methylimidazolium. The CLEAs were used in the hydrolysis of cellulose and presented an initial reaction rate 2.7 times higher than that of the free enzyme. In addition, the immobilized enzymes were re-used five times in hydrolysis.

Other parameters commonly optimized by enzyme immobilization are temperature and pH. A cellulase from *T. reesei* was immobilized by entrapment in a calcium alginate matrix, which resulted in immobilization efficiency (difference between initial and final protein amounts, after immobilization process) of approximately 84%. This immobilized enzyme exhibited a gain of 5 °C in optimum temperature relative to that of the free enzyme and had higher activity in acidic pH at approximately pH 4.5. In addition, this system was re-used several times, with activity retention of 20.3% after eight cycles, which suggested the value of immobilized enzymes in industry [59].

Chen et al. [60] and Jabasingh [61] conducted immobilization studies of a commercial β -glycosidase and *A. nidulans* cellulase in magnetic nanoparticles and activated carbon surfaces, respectively. Both found that, although the kinetic parameters (K_m and V_{max}) were affected, the immobilized enzymes showed increases in the thermostability and operational stability, and they were reused about 15 times with 90% of the activity retention. The authors suggested that the increases in K_m and decrease in V_{max} were due to a higher number of interactions between the enzyme and support that promoted a smaller mass transfer from reaction medium to immobilized system. The immobilization decreased the substrate diffusion into the support interstices and decreased the substrate affinity of the enzyme and the reaction speed.

An immobilization study of endoglucanases onto superparamagnetic nanoparticles suggested other benefits and applications of immobilization. According to Khoshnevisan et al. [62], the high capacity of enzyme adsorption (31 mg/g) onto paramagnetic nanoparticles can be used for purification and long-term storage of such enzymes and can reduce the amount of enzymes required for industrial applications.

Hegedus and Nagy [63] immobilized endoglucanase, endo-xylanase, and β -xylosidase on a thin layer of polyacrylamide. They observed that the optimum temperature was 50 °C, which resulted in a two-fold increase in the half-lives of these immobilized enzymes from those of the free enzymes.

In another study, Borges et al. [64] observed increased saccharification of sugarcane bagasse using a commercial cellulose, Accellerase 1500, supplemented with a commercial β -glucosidase, Accellerase from *T. reesei*, immobilized on polyacrylic resins and agarose. According to the authors, supplementation with immobilized β -glucosidase decreased the inhibitory effect of some compounds and increased conversion rates by approximately 40% after 96 h of reaction.

Commercial cellulases have also been immobilized by covalent and noncovalent methods on a soluble matrix, Eudragit L-100, and were applied in steam-exploded straw hydrolysis [65]. The optimum temperature remained unchanged from that of the free enzymes; however, the immobilized enzymes were more stable

during storage at 4 °C than were the free enzymes and retained 50% of their activities after 5 cycles of hydrolysis.

Lee et al. [66,67] co-immobilized a cellulase and an isomerase from *T. reesei* and *Streptomyces rubiginosus*, respectively onto Fe₃O₄ loaded mesoporous silica nanoparticles (Fe₃O₄-loaded MSN). They used this system for a continuous cellulose-to-glucose and glucose-to-fructose conversion. This platform has generated a new concept of direct sequential conversion of cellulose to fructose, and reached high fructose yield up to 50%, which is the same yield obtained when using the free enzyme. In turn, fructose can be converted into 5-hydroxyfurfural (HMF), being a platform for obtaining biofuels such as 2,5-dimethylfuran (DMF). In addition, the use of enzyme-immobilized Fe₃O₄-loaded MSN provides excellent stability and recyclability.

4.2. Hemicellulases

Most of the studies on hemicellulase immobilization use endo- β -1,4-xylanase and β -xylosidases. Bibi et al. [93] reported high thermostability and 79% of activity retention at 80 °C for 30 min when an endo- β -1,4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* was immobilized on agar gel matrix by entrapping. The free enzyme had no activity at that temperature. They also reported high efficiency in recycling over six reaction cycles with minimal loss of activity.

Xylanase from *A. tamarii* was covalently immobilized on Duolite A147 pretreated with glutaraldehyde [94]. The immobilized system showed a lower optimum pH and a higher optimum temperature than the free enzymes did. The half-lives of the free enzyme were 186, 93, and 50 min at 40, 50, and 60 °C, respectively, and those of the immobilized enzyme at the same temperatures were 320, 136, and 65 min. Moreover, the inhibitory effects of metals and ions were also investigated and were less pronounced on the immobilized enzymes.

A general benefit arising from immobilization is the gain in enzyme activity. Yan et al. [95] reported an 80% increase in the enzymatic activity of xylanase immobilized on nanoporous gold. In another study, an *Armillaria gemina* xylanase was immobilized on silicon oxide nanoparticles with 117% of immobilization efficiency [96]. Immobilization of xylanase promoted a shift in the optimal pH and temperature of the enzyme and gave a four-fold increase in the half-life of the biocatalyst, 38% xylo-oligosaccharides production, and still showed 92% activity retention even after 17 cycles of use.

The response surface methodology was applied to xylanase immobilization on different supports. Pal and Khanum [97] covalently immobilized xylanase from *A. niger* on an alginate-activated matrix. The optimized immobilization process showed 91% efficiency, an increase of 5 °C in the optimum temperature of the enzyme, and increases in thermostability of approximately 67% at 45 °C and 15% at 70 °C. Thermodynamic studies have indicated that the increase in enthalpy (ΔH°) and free energy (ΔG°) after immobilization contributed to the increased thermal stability of xylanase when immobilized. In that study, immobilization also overcame the problem of reduced permeability of xylan (attributed to its high molecular weight), which enabled greater accessibility of the xylanase to the substrate.

Another study also employed the same response surface methodology for optimization of biobleaching conditions through the use of xylanase from *A. fischeri* immobilized on a polystyrene matrix [98]. An expanded bed bioreactor was developed using immobilized enzymes for paper pulp bleaching in continuous mode. The ideal temperature of the reaction was 60 °C, and there was a reduction of 87% of the kappa number. The system appeared more effective than the conventional chlorine-based bleaching pulp. A xylanase of *S. olivaceus* and *S. viridis* were immobilized

on Eudragit S-100 polymer and applied in hydrolyzing the corn-cob powder pretreated with 2% NaOH solution. Kinetic studies showed marginal increases in K_m values and significant increases in V_{max} values after enzyme immobilization. According to the authors, slight increases in K_m have been reported when insoluble or solid supports were used. The final extent of xylan hydrolysis of corn-cob by the immobilized enzymes was higher (84%) than that of the free enzymes (79%) [99].

An interesting and frequent finding is that some xylanases, when immobilized, tend to hydrolyze xylan short chains and produce xylobiose and xylotriose; free xylanase initially gave oligomer production with a higher degree of polymerization, which suggested that the xylanases act on long (insoluble) and short (soluble) xylan chains [92,100].

In addition to providing optimized biochemical and biophysical characteristics of enzymes, immobilization can be used as a tool for different purposes. For instance, Shah et al. [101] applied carbon nanotubes for simultaneous purification and refolding of denatured xylanase. In the first approach, the researchers performed denaturation of the purified enzymes at different concentrations of urea. Denatured enzymes showed only 5% retention of activity. After immobilization onto carbon nanotubes, 55% retention of activity was observed, which suggested that there was a refolding of the enzymes. Fourier-transform infrared spectroscopic analysis showed that denatured enzymes regained their secondary structures when immobilized onto carbon nanotubes and that they acquired structures very similar to those of native xylanases.

In the second approach, to investigate whether carbon nanotubes could be used as a purification matrix, the same experiment was repeated with crude xylanase (commercial preparation without purification). Under similar experimental conditions, 92% activity was recovered. Therefore, carbon nanotubes acted as a hydrophobic matrix for selective binding of xylanase. This phenomenon is similar to that observed in methods routinely used for purification by hydrophobic interaction chromatography [101]. This study suggests the possibility of different and simultaneous applications for immobilization.

5. New trends in immobilization for bioethanol production

Recent studies have reported new immobilization strategies for applications in the bioethanol industry. These strategies include the use of new and technological supports with specific properties that assist in the optimization of enzymatic properties, use of co-immobilized enzymes with different actions for promoting synergism, development of mathematical models based in co-immobilized yeasts and enzymes for bioethanol production optimization, co-cultivation and co-immobilization of microorganisms for simultaneous saccharification and fermentation processes (SSF), and creation of immobilized cell-free systems.

Nanoparticles have been widely studied and applied in various fields, such as bioremediation, drug delivery, biomedical, biosensors, and enzyme immobilization. However, there are few studies about holocellulase immobilization [102,103]. The use of nanomaterials in immobilization can increase the catalytic efficiency of enzymes by increasing enzyme loading because of the large surface areas of these nanoparticles. Furthermore, many nanomaterials exhibit specific properties, such as high mechanical strength, low mass transfer resistance, and electrical and thermal properties. Such properties help in product separation processes, promote greater accessibility of enzymes to substrates, and create greater resistance to abrupt changes in environmental conditions [102–104].

Cherian et al. [105] assessed the hydrolysis and bioethanol production efficiency of different organic residues through immo-

bilization of cellulase from *A. fumigatus* onto MnO_2 nanoparticles. In this case, enzymes were immobilized by covalent binding and subjected to simultaneous saccharification and fermentation processes for which pretreated sugarcane bagasse and *Saccharomyces* sp. were used, respectively. The enzyme immobilization, besides optimizing parameters, such as enzymatic activity, optimum temperature, and thermal stability, caused a significant increase in the production of reducing sugars and consequently promoted higher production of bioethanol than those of free enzymes (21.96 g/L and 18 g/L, respectively).

A study performed by Lee et al. [106] investigated optimization of β -glucosidase properties immobilized using two different approaches: CLEAs of β -glucosidase and CLEAs of β -glucosidase immobilized on polymers containing magnetic nanoparticles. The β -glucosidase activity was about 36-times higher for polymer nanofiber CLEAs. After 20 days of incubation, CLEAs immobilized on polymer nanofibers retained 91% of their activity, whilst CLEAs alone retained 33%. Furthermore, immobilized enzymes on nanostructured support were more easily recycled by magnetic separation. The researchers suggested possible applications of these immobilized enzymes on magnetic fibers for cellulosic ethanol production.

Damásio et al. [107] conducted a study of co-immobilization of hemicellulases aimed at achieving synergism of catalytic actions and optimization of bioethanol production processes. Arabinofuranosidase and endoxylanase of two isolates of *A. nidulans* were co-immobilized and separately immobilized on a glyoxyl agarose matrix and were subsequently applied in arabinoxylan hydrolysis. Enzymes immobilized separately but used simultaneously had higher hydrolysis efficiency and consequent higher product yield; however, hydrolysis using a co-immobilized multienzyme complex resulted in direct release of xylose and arabinose from the arabinoxylan substrate, which was very advantageous for application of these monosaccharides in bioethanol production.

Staniszewski et al. [108,109] conducted optimization studies of bioethanol production using predictive mathematical models. To generate the data, they used co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and β -galactosidase. The enzyme was crosslinked with glutaraldehyde and the yeast was entrapped in a sodium alginate matrix. According to the authors, the model can be used for predicting the degree of sugar utilization and ethanol productivity in the bioreactor, for investigation of the influence of operating conditions on fermentation yield and product concentration.

The approach of co-immobilization and co-cultivation of fungi spores and yeasts have been proposed for optimizing the production of bioethanol via SSF [110]. The researchers used sweet potato as carbon source for bioethanol production by co-cultivation and co-immobilization of saccharolytic fungi (*A. oryzae* and *Monascus purpureus*) and yeast (*S. cerevisiae*). The authors noted that the yeast immobilized on a gel matrix showed high viability (95.70%) in 6% ethanol, which suggested that immobilization increases the tolerance of yeast to ethanol. It has also been reported that co-immobilization of yeast with *A. oryzae* and *M. purpureus* in a 1:2 ratio gave a high rate of bioethanol production, 4.08 (v/v) and a high $Y_{E/s}$ (yield of ethanol production/consumption starch) after 9 days of fermentation. This approach has been considered to be very promising for applications in the bioethanol industry.

6. Future prospects

For industrial applications of immobilized complexes, the most important requirement is that a method can potentially be scaled up for large-scale production. Although most studies have presented interesting and promising data, most have only been applied at laboratory scale. Maintaining the robustness and efficiency of

small-scale systems during scale-up is a common difficulty in the development of many technologies at the industrial level, so consideration must be given to this problem during research on potential applications.

Another desired future target is the development of methods to efficiently immobilize enzyme cocktails for hydrolysis of complex substrates, such as agroindustrial wastes, for use in degradation of lignocellulosic biomasses. Allied to this, the construction of reactors adapted to these immobilized systems is a necessary goal to be achieved for ethanol production with high productivity on a large scale.

Screening of new material supports for use in immobilization is very important, with the aim of increasing enzyme loading, activity, and stability to decrease process costs [111]. Therefore, emerging technologies, such as nanotechnology, should be considered and thoroughly investigated. The major premise of using nanomaterials for immobilization is to reduce diffusion limitations and increase the surface area to increase enzyme loading [112]. Furthermore, the physical characteristics of nanomaterials, such as particle mobility, thermal stability, increased surface area, and irradiation resistance, can affect the catalytic activities of enzymes and consequently be used to optimize industrial processes [113]. However, there are few studies involving nanoparticles and carbon nanotubes in holocellular immobilization.

A common difficulty in all immobilization methods is their strictly specific nature. In this context, discovery, development, and manufacture of unique and universal immobilization supports capable of binding to all types of biocatalysts are needed.

Finally, development of optimized technological devices capable of being adapted to various reactors and in various stages of industrial processes may lead to broad application of effective, robust, and economical enzyme methods in various industries.

Acknowledgments

The authors acknowledge the receipt of financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF), Funding Authority for Studies and Projects (FINEP), and the National Institute for Science and Technology of Bioethanol.

References

- [1] L.L. Nass, P.A.A. Pereira, D. Ellisc, Biofuels in Brazil: an overview, *Crop Sci.* 47 (2007).
- [2] Global Agricultural Information Network (GAIN) Report, USDA Foreign Agricultural Service GAIN Report number: BR15006 2015.
- [3] W. Santos, E. Gómez, M.S. Buckeridge, Bioenergy and the sustainable revolution, in: M.S. Buckeridge, G.H. Goldman (Eds.), *Routes to Cellulosic Ethanol*, Springer, New York, 2011, pp. 15–26.
- [4] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* 409 (2001) 258–268.
- [5] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *Biotech* 3 (2013) 1–9.
- [6] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, X. Wang, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2 (2012).
- [7] P. Binod, P. Palkhiwala, R. Gaikawai, K.M. Nampoothiri, A. Duggal, K. Dey, A. Pandey, Industrial enzymes – present status and future perspectives for India, *JSIR* 72 (2013) 271–286.
- [8] J.E. Leresche, H.P. Meyer, Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and a biotechnologist, *Org. Process Res. Dev.* 10 (2006) 572–580.
- [9] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463.
- [10] P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, Enzyme stability and stabilization – aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochem.* 43 (2008) 1019–1032.
- [11] R.A. Sheldon, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.* 49 (2007) 1289–1307.
- [12] A.A. Khan, M.A. Alzohairy, Recent advances and applications of immobilized enzymes technologies: a review, *RJBSI* 8 (2010) 564–575.
- [13] C. Garcia Galan, A. Berenguer Murcia, R. Fernandez Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 2885–2904.
- [14] I. Es, J.D.G. Vieira, A.C. Amaral, Principles techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2065–2082.
- [15] J.B. Kim, J.W. Grate, P. Wang, Nanostructures for enzyme stabilization, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 1017–1026.
- [16] L. Wang, L. Wei, Y. Chen, R. Jiang, Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes, *J. Biotechnol.* 150 (2010) 57–63.
- [17] M. Asgher, M. Shahid, S. Kamal, H.M.N. Iqbal, Recent trend and valorization of immobilization strategies and lignolytic enzymes by industrial biotechnology, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101 (2014) 56–66.
- [18] B.C. Salles, V.S.J. Te'o, M.D. Gibbs, P.L. Bergquist, E.X.F. Filho, E.A. Ximenes, K.M.H. Nevalainen, Identification of two novel xylanase-encoding genes (xyn5 and xyn6) from *Acrophialophora nainiana* and heterologous expression of xyn6 in *Trichoderma reesei*, *Biochem. Lett.* 29 (2007) 1195–1201.
- [19] R. Kumar, S. Singh, O.V. Singh, Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular properties, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2005) 377–391.
- [20] P.V. Harris, F. Xu, N.E. Kreel, C. Kang, S. Fukuyama, New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19 (2014) 162–170.
- [21] X. Liu, Y. Ma, M. Zhang, Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation, *Biotechnol. Lett.* 37 (2015) 1541–1551.
- [22] P.K. Busk, L. Lange, Classification of fungal and bacterial lytic polysaccharide monoxygenases, *BMC Genomics* 16 (2015) 368.
- [23] G.R. Hemsworth, E.M. Johnston, G.J. Davies, P.H. Walton, Lytic polysaccharide monoxygenases in biomass conversion, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 747–761.
- [24] A. Liese, L. Hilterhaus, Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6236–6249.
- [25] C.J. Gray, M.J. Weissenborn, C.E. Eyers, S.L. Plitsch, Enzymatic reactions on immobilised substrates, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6378–6405.
- [26] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A.J. Poulouse, G. Bohlmann, Industrial use of immobilized enzymes, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6437–6474.
- [27] V.M. Balcão, A.L. Paiva, F.X. Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: state of the art, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 392.
- [28] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilisation techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463.
- [29] P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, Enzyme stability and stabilization – aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochem.* 10 (2008) 1019–1032.
- [30] G. Penzol, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, L. Rodes, J.M. Guisan, Use of dextran as long and hydrophilic spacer arms to improve the performance of immobilized proteins acting on macromolecules, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1998) 518–523.
- [31] K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente, Control of protein immobilization: coupling immobilization and site direct mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 107–122.
- [32] J. Jordan, C.S.S.R. Kumar, C. Theegala, preparation and characterization of cellulase bound magnetite nanoparticles, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68 (2011) 139–146.
- [33] N.M. Mubarak, J.R. Wonga, K.W. Tana, J.N. Sahuc, E.C. Abdulla, N.S. Jayakumar, P. Ganesane, Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 107 (2014) 124–131.
- [34] R.E. Abraham, M.L. Verma, C.J. Barrow, M. Puri, Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass, *Biotechnol. Biofuels* 7 (2014) (1–12B. D. Singh, *Biotechnology expanding horizons*, third ed., Kalyani, 2009).
- [35] S.C. Tsang, C.H. Yu, X. Gao, K. Tam, Silica-encapsulated nanomagnetic particles as a new recoverable biocatalyst carrier, *J. Phys. Chem: B* 110 (2006) 16914–16922.
- [36] G. Kouassi, J. Irudayaraj, G. McCarty, Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles, *Biomagn. Res. Technol.* 3 (2006) 1–10.
- [37] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2161–2175.
- [38] B.D. Singh, *Biotechnology Expanding Horizons*, third ed., Kalyani, 2009.
- [39] G.H. Cho, Y.C. Cha, D.C. Yang, H.H. Moon, Continuous ethanol production by immobilized yeast in a fluidized reactor, *Biotechnol. Lett.* 11 (1981) 667–671.
- [40] A.A. Homaei, R. Sairi, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: an update, *J. Chem. Biol.* 6 (2013) 185–205.
- [41] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10 (2000) 157–176.

- [42] T. Boller, C. Meier, S. Menzler, EUPERGIT oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis, *Org. Process Res. Dev.* 6 (2002) 509–519.
- [43] E. Agostinelli, F. Belli, G. Tempera, A. Mura, G. Floris, L. Toniolo, A. Vavatori, S. Fabris, F. Momo, R. Stevanato, Polyketone polymer: a new support for direct enzyme immobilization, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 670–678.
- [44] F. Van de Velde, N.D. Lourenço, H.M. Pinheiro, M. Bakker, Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilization techniques, *Adv. Synth. Catal.* 344 (2002) 815–835.
- [45] V.I. Lozinsky, I.Y. Galaev, F.M. Plieva, I.N. Savina, H. Jungvid, B. Mattiasson, Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 445–451.
- [46] B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enz. Microb. Technol.* 35 (2004) 126–139.
- [47] M.N. Gupta, M. Kaloti, M. Kapoor, K. Solanki, Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization, *Artif. Cells Blood Substit. Immobilization Biotechnol.* 39 (2011) 98–109.
- [48] L. Wu, Y. Liu, B. Chi, Z. Chu, X. Feng, S. Li, H. Xu, An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on e-poly-L-lysine modified mesoporous TiO₂, *Food Chem.* 187 (2015) 182–188.
- [49] P. Wang, S. Dai, S.D. Waezsada, A.Y. Tsao, B.H. Davison, Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis, *Biotechnol. Bioeng.* 74 (2001) 249–255.
- [50] A.X. Yan, X.W. Li, Y.H. Ye, Recent progress on the immobilization of enzymes on molecular sieves for the reactions in organic solvent, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 101 (2002) 113–129.
- [51] A. Borole, S. Dai, C.L. Cheng, M. Rodriguez, B.H. Davison, Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113 (2004) 273–285.
- [52] A. Petri, P. Marconcini, P. Salvadori, Efficient immobilization of epoxide hydrolase onto silica gel and use in the enantioselective hydrolysis of racemic para-nitrostyrene oxide, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 32 (2005) 219–224.
- [53] D. Moelans, P. Cool, J. Baeyens, E.F. Vansant, Using mesoporous silica materials to immobilize biocatalysis-enzymes, *Catal. Commun.* 6 (2005) 307–311.
- [54] S. Hudson, J. Cooney, E. Magner, Proteins in mesoporous silicates, *Angew. Chem.* 47 (2008) 8582–8594.
- [55] S. Dutta, A. Bhaumik, K.K.W. Wu, Hierarchically porous carbon derived from polymers and biomass: effect on interconnected pores on energy applications, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 3574–3592.
- [56] Z. Li, Y. Li, S. Duan, J. Liu, P. Yuan, H. Nakanishi, X. Gao, Bioconversion of D-glucose to D-psicose with immobilized D-xylose isomerase and D-psicose 3-epimerase on *Saccharomyces cerevisiae* spores, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42 (2015) 1117–1128.
- [57] A.C. Chakrabarti, K.B. Storey, Enhanced glucose production from cellose using coimmobilized celullase and β -glucosidase, *Appl. Biochem. Biotech.* 22 (1989) 263–278.
- [58] P.O. Jones, P.T. Vasudevan, Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 103–106.
- [59] T.K. Viet, N.P. Minh, D.T.A. Dao, Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate and its immobilized stability, *Am. J. Res. Commun.* 1 (2013) 254–267.
- [60] T. Chen, W. Yang, Y. Guo, R. Yuan, L. Xu, Y. Yan, Enhancing catalytic performance of β -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles, *Enzyme Microb. Tech.* 63 (2014) 50–57.
- [61] S.A. Jabasingh, C.V. Nashiyar, Immobilization of *Aspergillus nidulans* SU04 cellulase on modified activated carbon, *J. Therm. Anal. Calorim.* 109 (2012) 193–202.
- [62] K. Khoshnevisan, A. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, M. Tabatabaei, Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, *Chem Eng. J.* 171 (2011) 669–673.
- [63] I. Hegedus, E. Nagy, Stabilization of activity of cellulase and hemicellulase enzymes by covering with polyacrylamide layer, *Chem. Eng. Process.* 95 (2015) 143–150.
- [64] D.G. Borges, A.B. Junior, C.S. Farinas, R.L.C. Giordano, P.W. Tardioli, Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized β -glucosidase, *Bioresour. Technol.* 167 (2014) 206–213.
- [65] Y. Zhang, J. Xu, D. Li, Z. Yuan, Preparation of properties of an immobilized cellulase on the reversibly soluble matrix Eudragit L-100, *Bioact. Biotransform.* 28 (2010) 313–319.
- [66] Y. Lee, C. Chen, Y. Chiu, K.C.W. Wu, An effective cellulose-to-glucose-to-fructose conversion sequence by using enzyme immobilized Fe₃O₄-loaded mesoporous silica nanoparticles as recyclable biocatalysts, *ChemCatChem* 5 (2013) 2153–2157.
- [67] Y. Lee, S. Dutta, K.C.W. Wu, Integrated, cascading enzyme-/chemocatalytic cellulose conversion using catalysts based on mesoporous silica nanoparticles, *ChemSusChem* 7 (2014) 32–41–3246.
- [68] S.L. Hirsh, M.M.M. Bilek, N.J. Nosworthy, A. Kondyurin, C.G. dos Remedios, D.R. McKenzie, Comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture, *Langmuir* 26 (2010) 14380–14388.
- [69] M. Kitaoka, H. Taniguchi, T. Sasaki, A simple method of cellulase immobilization on a modified silica support, *J. Ferment. Bioeng.* 67 (1989) 182–185.
- [70] C. Tsai, A.S. Meyer, Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of β -glucosidase immobilized in calcium alginate, *Molecules* 19 (2014) 19390–19406.
- [71] I.R.M. Tebeka, A.G.L. Silva, D.F.S. Petri, Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase, *Langmuir* 25 (2009) 1582–1587.
- [72] N.E. Lee, J. Woodward, Kinetics of the adsorption of *Trichoderma reesei* C30 cellulase to DEAE-Macrosorb, *J. Biotechnol.* 11 (1989) 75–82.
- [73] S.B. Hartono, S.Z. Qiao, J. Liu, K. Jack, B.P. Ladewig, Z. Hao, G. Qing, M. Lu, Functionalized mesoporous silica with very large pores for cellulase immobilization, *J. Phys. Chem.* 114 (2010) 8353–8362.
- [74] R.H. Chang, J. Jang, K.C.W. Wu, Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to-glucose conversion, *Green Chem.* 13 (2011) 2844.
- [75] S. Kar, A. Mandal, P.K.D. Mohapatra, S. Samanta, B.R. Pati, K.C. Mondal, Production of xylanase by immobilized *Trichoderma reesei* SAF3 in Ca-alginate beads, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 245–249.
- [76] S. Romo-Sánchez, C. Camacho, H.L. Ramirez, M. Arévalo-Villena, Immobilization of commercial cellulase and xylanase by different methods using two polymeric supports, *Adv. Biosci. Biotechnol.* 5 (2014) 517–526.
- [77] M. Sardar, I. Roy, M.N. Gupta, Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer EudragitTM L-100, *Enzyme Microb. Technol.* 27 (2000) 672–679.
- [78] P.V. Gawande, M.Y. Kamat, Preparation, characterization and application of *Aspergillus sp.* xylanase immobilized on Eudragit S-100, *J. Biotechnol.* 66 (1998) 165–175.
- [79] E.J. Cho, S. Jung, H.J. Kim, Y.G. Lee, K.C. Nam, H. Leed, H. Bae, Co-immobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silica nanoparticles for the degradation of cellulose, *Chem. Commun.* 48 (2012) 886–888.
- [80] A. Soozanipour, A. Taheri-Kafrani, A.L. Isfahani, Covalent attachment of functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, *Chem. Eng. J.* 270 (2015) 235–243.
- [81] M.L. Verma, R. Chaudhary, T. Tsuzuki, C.J. Barrow, M. Puri, Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 2–6.
- [82] A. Landarani-Isfahani, A. Taheri-Kafrani, M. Amini, V. Mirkhani, M. Moghadam, A. Soozanipour, A. Razmjou, Xylanase immobilized on novel multifunctional hyperbranched polyglycerol-grafted magnetic nanoparticles: an efficient and robust biocatalyst, *Langmuir* 31 (2015) 9219–9227.
- [83] L. Mesta, A. Heyraud, J. Joseleau, P.R. Coulet, Catalytic properties of endoxylanase fusion proteins from *Neocallimastix frontalis* and effect of immobilization onto metal-chelate matrix, *J. Biotechnol.* 101 (2003) 253–265.
- [84] A. Manrich, A. Komesu, W.S. Adriano, P.W. Tardioli, R.L.C. Giordano, Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161 (2010) 455–467.
- [85] H. Chen, L. Liu, S. Lv, X. Liu, M. Wang, A. Song, X. Jia, Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on chitosan using dialdehyde starch as a coupling agent, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 24–32.
- [86] A. Cano, C. Minguillón, C. Palet, Immobilization of endo-1,4-xylanase on polysulfone acrylate membranes: synthesis and characterization, *J. Membr. Sci.* 280 (2006) 383–388.
- [87] H.K. Karagulyan, V.K. Gasparyan, S.R. Decker, Immobilization of fungal β -glucosidase on silica gel and kaolin carriers, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146 (2008) 39–47.
- [88] X. Li, Z. Shan, X. Song, J. Ouyang, Y. Xu, Q. Yong, S. Yu, Immobilization of xylanase on poly(ethylene glycol) methyl ether 5000 and its self-extractive bioconversion for the production of xylo-oligosaccharides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 2022–2029.
- [89] M.A. Abdel-Naby, Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and β -xylosidase, and properties of the immobilized enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38 (1993) 69–81.
- [90] A. Sarbu, M.N. Pinho, M.R. Freixo, F. Goncalves, I. Udrea, New method for the covalent immobilization of a xylanase by radical grafting of acrylamide on cellulose acetate membranes, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 125–130.
- [91] I. Maalej-Achouri, M. Guerfali, A. Gargouri, H. Belghith, Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59 (2009) 145–152.
- [92] D. Driss, A. Haddar, R. Ghorbel, S.E. Chaabouni, Production of xylooligosaccharides by immobilized His-tagged recombinant xylanase from *Penicillium occitanis* on nickel-chelate Eupergit C, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173 (2014) 1405–1418.
- [93] Z. Bibi, F. Shahid, S.A.U. Qader, A. Aman, Agar-agar entrapment increases the stability of endo-1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan, *Int. J. Biol. Macromol.* 75 (2015) 121–127.
- [94] M.K. Goudal, M.A. Abdel-Naby, Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamaris* xylanase, *Microbiol. Res.* 157 (2002) 275–281.
- [95] X. Yan, X. Wang, P. Zhao, Y. Zhang, P. Xu, Y. Ding, Xylanase immobilized nanoporous gold as a highly active and stable biocatalyst, *Micropor. Mesopor. Mat.* 161 (2012) 1–6.
- [96] S.S. Dhiman, D. Kalyani, S.S. Jagtap, J. Haw, Y.C. Kang, J. Lee, Characterization of a novel xylanase from *Armillaria gemina* and its immobilization onto SiO₂ nanoparticles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 1081–1091.

- [97] A. Pal, F. Khanum, Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: characterization of immobilized enzyme, *Process Biochem.* 46 (2011) 1315–1322.
- [98] S.R. Senthilkumar, M. Dempsey, C. Krishnan, P. Gunasekaran, Optimization of biobleaching of paper pulp in an expanded bed bioreactor with immobilized alkali stable xylanase by using response surface methodology, *Bioresource Technol.* 99 (2008) 7781–7787.
- [99] Z. Ai, Z. Jiang, L. Li, W. Deng, I. Kusakabe, H. Li, Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production, *Process Biochem.* 40 (2005) 2707–2714.
- [100] Y. Lin, M. Tseng, W. Lee, Production of xylooligosaccharides using immobilized endo-xylanase of *Bacillus Halodurans*, *Process Biochem.* 46 (2011) 2117–2121.
- [101] S. Shah, M.N. Gupta, Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes, *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 363–367.
- [102] C. Rao, A. Muller, A. Cheetham, *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KgaA, Weinheim, 2004.
- [103] S. Panchakarla, A. Govindaraj, Covalent and non-covalent functionalization and solubilization of double-walled carbon nanotubes in nonpolar and aqueous media, *J. Chem. Sci.* 120 (2008) 607–611.
- [104] M. Puri, C.J. Barrow, M.L. Verma, Enzyme immobilization on nanomaterials for biofuel production, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 215–216.
- [105] E. Cherian, M. Dharmendirakumar, G. Baskar, Immobilization of cellulase onto MnO₂ nanoparticles for bioethanol production by enhanced hydrolysis of agricultural waste, *Chin. J. Catal.* 36 (2015) 1223–1229.
- [106] S. Lee, L.H. Jin, J.H. Kim, S.O. Han, H.B. Na, T. Hyeon, Y. Koo, J. Kim, J. Lee, β -Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33 (2010) 141–147.
- [107] A.R.L. Damásio, B.C. Pessela, T.M. Silva, L.H.S. Guimarães, J.A. Jorge, J.M. Guisán, M.L.T.M. Polizeli, Co-immobilization of fungal endo-xylanase and α -L-arabinofuranosidase in glyoxyl agarose for improved hydrolysis of arabinoxylan, *J. Biochem.* 154 (2013) 275–280.
- [108] M. Staniszewski, W. Kujawski, M. Lewandowska, Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product –kinetic model predictions, *J. Food Eng.* 82 (2007) 618–625.
- [109] M. Staniszewski, W. Kujawski, M. Lewandowska, Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product –kinetic model predictions considering glucose repression, *J. Food Eng.* 91 (2009) 240–249.
- [110] W. Lee, I. Chen, C. Chang, S. Yang, Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*, *Renewable Energy* 39 (2012) 216–222.
- [111] S.A. Ansari, Q. Husain, Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 512–523.
- [112] T. Xie, A. Wang, L. Huang, H. Li, Z. Chen, Q. Wang, Recent advances in the support and technology used in enzyme immobilization, *Afr. J. Biotechnol.* 8 (2009) 4724–4733.
- [113] H. Jia, G. Zhu, P. Wang, Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility, *Biotechnol. Bioeng.* 84 (2003) 406–414.

2. Objetivo geral da tese

A presente tese objetivou a realização de estudos de imobilização de uma holocelulase (pectinase) produzida pelo fungo *Aspergillus terreus*, visando à compreensão dos mecanismos envolvidos na imobilização enzimática, e a avaliação do potencial de aplicação dessa tecnologia. Para tal, foram executados testes de seleção da enzima e suporte para imobilização, e realizados estudos de caracterização e comparação entre enzima livre e imobilizada.

3. Justificativa geral da tese

A demanda atual por processos industriais sustentáveis que enquadrem nos princípios de química verde têm tornado a catálise enzimática uma alternativa cada vez mais atrativa para aplicação em diversos setores.

Diferentemente dos catalisadores químicos, as enzimas são capazes de discriminar reações, substratos, partes específicas das moléculas e, até mesmo, isômeros óticos. Entretanto, além de possuírem um alto custo de produção, a grande maioria das enzimas exibe alta atividade catalítica somente em condições ambientais brandas (SOUZA *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2013). Essas propriedades intrínsecas das enzimas torna-as, a maioria das vezes, inviáveis para aplicação em muitos dos processos industriais em larga escala. Além disso, o uso de catalisadores de alto custo, como no caso das enzimas, requer processos de recuperação e reutilização para tornar o processo economicamente viável (HOMAEI *et al.*, 2013).

Dessa forma, a imobilização enzimática tem sido considerada uma das alternativas mais promissoras para tornar competitiva a aplicação das enzimas na indústria. A imobilização pode proporcionar a otimização da estabilidade e das propriedades naturais da enzima, além de promover a recuperação e reutilização do biocatalisador, e proporcionar uma fácil separação dos produtos gerados (SHELDON, 2007). É importante ressaltar que esta técnica pode ser utilizada em conjunto com outras abordagens que visem à otimização das propriedades enzimáticas, como engenharia proteica, biologia molecular e computacional.

Várias enzimas e suportes naturais e sintéticos já foram avaliados quanto à sua eficiência na imobilização enzimática (ES *et al.*, 2015; ASGHER *et al.*, 2014; DATTA *et al.*, 2013; GARCIA GALAN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010). No entanto, até o presente momento, não foi relatado um método universal aplicável para todas as enzimas e suportes. Dessa forma, tornam-se imprescindíveis estudos e investigações na área de imobilização enzimática para um maior conhecimento e aperfeiçoamento de técnicas para fornecer novas perspectivas para o setor industrial.

Para o presente estudo foram escolhidas como ferramenta de trabalho as holocelulases, pois elas são enzimas com grande potencial de aplicação em diversos setores, sendo excelentes candidatas para imobilização enzimática e aplicação em processos industriais.

4. Referências

ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trend and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes - Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotechnology**, v. 3, p. 1-9, 2013.

ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065-2082, 2015.

GARCIA GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885-2904, 2011.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185-205, 2013.

Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022. Disponível em: <
https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html?gclid=EAlalQobChMI1YGN2oD13wIVFAWRCh26yghIEAAYAiAAEgJgBPD_BwE>. Acesso em: 17/01/2019.

KAWAGUTI, H. Y.; MANRICH, E.; SATO, H. H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 270-277, 2006.

KIM J. B.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes. Structure, function and applications**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2007. 641 p. ISBN 978-1-4020-5377-1.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest of Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007.

SINGH, R. K.; TIWARI, M. K.; SINGH, R.; LEE, J. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 1232-1277, 2013.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES A. A. Imobilização enzimática: Princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. Cap. 15, p. 529-568.

WANG, L.; WEI, L.; CHEN, Y.; JIANG, R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 57-63, 2010.

Capítulo II: Seleção da enzima:
Produção e purificação parcial de uma
pectinase de *Aspergillus terreus*

1. Introdução

A pectina é um polissacarídeo complexo contido na lamela média e parede celular primária das plantas superiores, e representa cerca de um terço do peso seco do tecido vegetal (FISSORE *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2008; JAYANE *et al.*, 2005). Ela é constituída de uma longa cadeia linear de ácidos galacturônicos unidos por ligações do tipo α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster, podendo conter cadeias laterais de arabinose, galactose e xilose (VORAGEN *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2007).

As pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas de alta massa molecular que agem sinergicamente na degradação das substâncias pécticas. Essas enzimas são amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas (GUMMADI *and* PANDA, 2003). No entanto, as pectinases de origem microbiana são as mais comumente utilizadas, e representam cerca de 10% da produção total de enzimas no mercado mundial (KHOLI *et al.*, 2015).

As enzimas pectinolíticas podem ser classificadas de acordo com suas propriedades físico-químicas e seu mecanismo de ação. Considerando as propriedades físico-químicas, as pectinases podem ser divididas em ácidas e alcalinas (KASHYAP *et al.*, 2001). As pectinases ácidas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia de sucos e vinhos, e possuem origem predominantemente fúngica, com prevalência no gênero *Aspergillus* (HEERD *et al.*, 2012; KASHYAP *et al.*, 2001). Já as pectinases alcalinas são mais comuns em bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, e são empregadas no tratamento de resíduos industriais e maceração de fibras vegetais (KASHYAP *et al.*, 2001).

Em relação ao mecanismo de ação, essas enzimas podem ser classificadas em pectinas esterases, poligalacturonases, pectato liases e pectina liases (Figura 1) (GOMES *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2001).

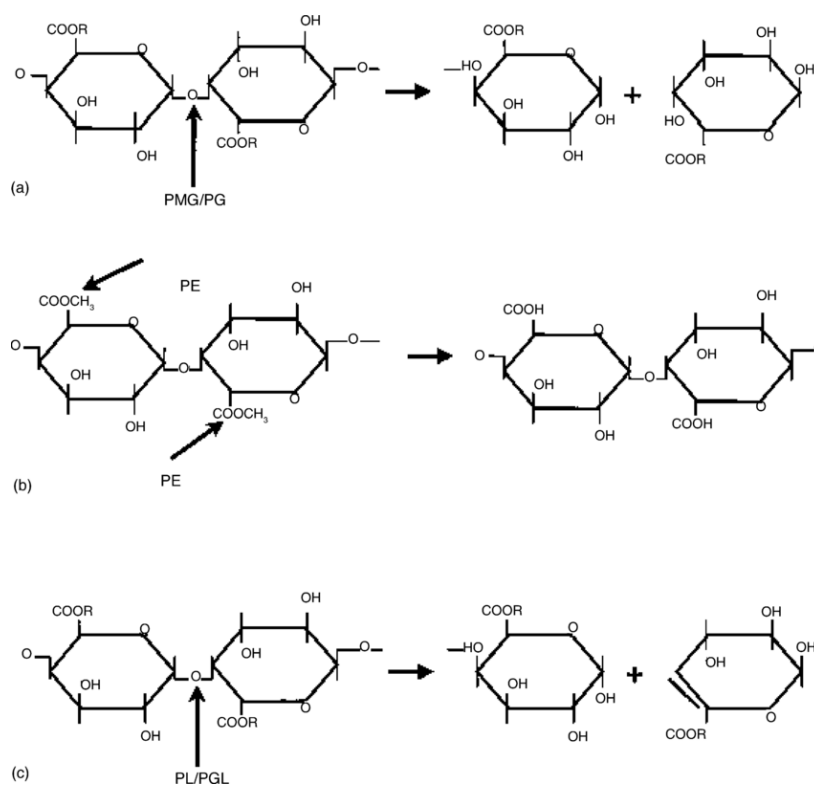


Figura 1 - Diferentes tipos de pectinases e suas ações sobre a pectina. As setas indicam o local de ação da enzima. (a) R = H para PG e CH₃ para PMG, (b) PE, (c) R = H para PGL e CH₃ para PL. PG: poligalacturonase, PMG: polimetilgalacturonase, PE: pectina esterase, PGL: pectato liase, PL: pectina liase. Fonte: GUMMADI and PANDA, 2003.

As polimetilgalacturonases (PMG) realizam a hidrólise de ligações do tipo α -1,4 no cerne da estrutura da pectina, gerando 6-metil-D-galacturonato. Essas enzimas agem preferencialmente em cadeias de pectina altamente esterificadas (JAYANI *et al.*, 2005). Já as poligalacturonases (PG) realizam a catálise de ligações do tipo α -1,4 na cadeia de ácido poligalacturônico, produzindo D-galacturonato. Ambos os grupos abrangem enzimas com ação endo-, que catalisam a quebra randômica do substrato, e exo-, que catalisam a hidrólise na extremidade não redutora da pectina, produzindo mono e digalacturonato (PEDROLLI *et al.*, 2009).

As pectina esterases (PE) catalisam a desesterificação do grupo metoxil, formando ácido péctico e metanol. Elas agem nos grupos metil-éster de unidades de galacturonato localizadas, preferencialmente, próximas a outras unidades não esterificadas (KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectato liases (PGL) atuam no rompimento de ligações glicosídicas do ácido poligalacturônico, formando produtos insaturados através de

mecanismos de transeliminção. Elas também podem agir de forma endo ou exo no substrato (JAYANI *et al.*, 2005). Já as pectina liases (PL) são enzimas que agem de forma randômica em cadeias altamente esterificadas de pectina, produzindo metiloligogalacturonatos insaturados, através de mecanismos de transeliminção de ligações glicosídicas (PEDROLLI *et al.*, 2009; JAYANI *et al.*, 2005).

A importância comercial das pectinases deriva, principalmente, do seu uso na indústria alimentícia na clarificação/redução de viscosidade de sucos de frutas, e extração de sumo e corantes necessários para a preparação de néctares e purês. Adicionalmente, as pectinases também podem ser aplicadas nas indústrias têxteis, de papel e celulose, rações animais e tratamento de resíduos (SOROOR *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2010).

Os principais entraves à exploração e ampla utilização de enzimas comerciais na indústria são a baixa estabilidade, baixo rendimento e alto custo de produção (SOROOR *et al.*, 2013). Nesse contexto, a aplicação de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, e o uso da fermentação em estado sólido não só reduzem o custo de produção, como também ajudam a superar os problemas ambientais de manejo dos resíduos sólidos (SILVA *et al.*, 2002). Aliado a isso, a imobilização enzimática também representa uma alternativa potencial para o aumento da produtividade e redução de custos (WANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2006).

Diante do cenário apresentado, o presente capítulo propõe a produção de holocelulases, através do cultivo do fungo *A. terreus*, utilizando o bagaço de cana como fonte de carbono, e a purificação dessas enzimas para posteriores estudos de caracterização, e futura aplicação em imobilização.

O fungo filamentoso *A. terreus* foi escolhido como ferramenta de estudo, pois é um microrganismo capaz de secretar grandes quantidades de holocelulases quando crescido em substratos lignocelulósicos, como relatado por alguns autores (NAGHVI *et al.*, 2013; NARRA *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2008) e corroborado por estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (MOREIRA, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2010). Além disso, esse gênero é relatado como o principal produtor de pectinases ácidas (KASHYAP *et al.*, 2001).

A fermentação em estado sólido (SSF) foi escolhida como abordagem para a produção de enzimas, pois quando comparada à fermentação submersa, apresenta-se mais vantajosa. A SSF é um procedimento de baixo custo, alta produtividade volumétrica, proporciona uma menor degradação proteica, possui uma menor probabilidade de contaminação, além de ser um processo mais sustentável e ambientalmente correto, uma vez que produz menor quantidade de água residual (SHINGANIA *et al.*, 2010; BHARGAV *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2003; VINIEGRA-GONZALES *et al.*, 2003).

O bagaço de cana-de-açúcar foi selecionado como fonte de carbono para produção de holocelulases, pois o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, dessa forma, o bagaço de cana é um resíduo produzido em escala crescente no país (Conab, 2018). A procura por estratégias de utilização desse resíduo visa minimizar os danos causados por seu acúmulo, objetivando o desenvolvimento sustentável (PINTO, 2012). Nesse cenário, a utilização do bagaço em estado sólido como indutor da produção e secreção enzimática pode ser uma estratégia de grande potencial para a produção de enzimas em larga escala.

2. Objetivos específicos

- Cultivar o fungo *A. terreus* em bagaço de cana por SSF.
- Analisar o perfil enzimático do extrato bruto quanto às atividades de holocelulases, visando à seleção de uma enzima candidata a imobilização.
- Purificar uma pectinase de *A. terreus* para posteriores experimentos de caracterização e imobilização enzimática.

3. Metodologia

3.1. Reagentes

Os reagentes pectina de frutas cítricas, xilana de aveia, carboximetil-celulose (CM-celulose) e manana foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). As colunas cromatográficas HiPrep16/60 Sephacryl S-100 HR, HiTrap Q FF e o kit de marcador de massa molecular Low Molecular

Weight (LMW) foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA).

3.2. Resíduos agroindustriais

O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela usina Jalles Machado, localizada no município de Goianésia- GO.

3.3. Pré-tratamento do resíduo

O bagaço de cana-de-açúcar foi autoclavado a 121°C por 2 horas, sendo posteriormente lavado em água corrente. Em seguida, o material foi submetido à secagem em estufa a 60°C, por 48 horas. Por fim, o material foi triturado em moinho industrial para obtenção de partículas com tamanho homogêneo.

3.4. Origem do microrganismo e manutenção

O fungo *A. terreus* foi isolado da compostagem de resíduos de uma indústria de beneficiamento de algodão, na região do Vale do Itajaí, Gaspar-Santa Catarina. Sua identificação morfológica foi realizada pelo Prof. Dr. Luís Roberto Batista, do Laboratório de Microbiologia Agrícola, da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. A identificação molecular da cepa foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Nádia Pachin, do Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), conforme descrito por Moreira (2013).

O isolado de *A. terreus* encontra-se depositado na coleção de cultura do Laboratório de Enzimologia na UnB, que possui Autorização de Acesso e Remessa de Componente do Patrimônio Genético, com número de processo 010237/2015-1. O local de depósito de subamostras é o Banco de Germoplasma de Microrganismos/CENARGEN, EMBRAPA.

As amostras do isolado foram armazenadas em tubos contendo glicerol 50% (v/v), e mantidas em ultrafreezer a -80°C para posterior uso.

3.5. Cultivo em estado sólido

A fermentação em estado sólido foi realizada em erlenmeyers de 250 mL contendo 5 g de bagaço de cana pré-tratado e esterelizado, umedecidos com meio mínimo (KH_2PO_4 – 7 g, K_2PO_4 – 2 g, $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,6 g) na proporção 1:8 (m/v), visando a obtenção de 65% de umidade (SIQUEIRA, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

O inóculo foi realizado através da raspagem de esporos das placas de *A. terreus* e homogeneização em solução de NaCl 0,9% (m/v), previamente esterelizada, formando um suspensão de esporos. A contagem dos esporos viáveis foi realizada por meio de observação em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Newbauer. A adição do inóculo na amostra ocorreu através do cálculo do volume de solução de esporos correspondente a 1×10^8 esporos para cada grama de resíduo. O cultivo foi realizado em câmara de demanda biológica de oxigênio (BOD), a 28°C, por 7 dias, sem agitação (SIQUEIRA, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

A extração de enzimas foi realizada através da adição de 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, homogeneização, e incubação em *shaker* por 1h a 28°C e 120 rpm. Posteriormente, as amostras foram filtradas em bomba a vácuo com papel filtro, e centrifugadas para remoção dos esporos remanescentes (PINTO *et al.*, 2012). Por fim, acrescentou-se azida sódica 0,01% às amostras, e as mesmas foram congeladas para posterior uso. Os cultivos foram realizados em triplicata.

3.6. Determinação da atividade enzimática de holocelulases

Para determinação da atividade de xilanase, pectinase, CMCase e mananase foram realizados ensaios pelo método de DNS, conforme descrito por Miller (1959) e adaptado por Vale (2012). Os substratos pectina, xilana e manana foram preparados na concentração final de 1%, enquanto que a carboximetilcelulose foi preparada na concentração final de 4%. Nesse protocolo foi utilizado 5 μL de enzima e 10 μL de substrato. A mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 30 μL de DNS, e a mistura foi fervida por 10 minutos a 97°C (MILLER, 1959). Posteriormente adicionou-se 150 μL de água destilada. A quantidade de

açúcares redutores foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm através de um leitor de placa (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA).

As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, sendo definidas como a quantidade de açúcares redutores liberados na unidade de tempo por mililitro de enzima (μmol de açúcar redutor/min/mL).

Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas curvas de calibração com ácido D-galacturônico, D-xilose, D-glicose e D-manose. Estas foram realizadas com uma solução estoque de 2 mg/mL de cada monossacarídeo, variando a concentração do açúcar redutor entre 0,2 - 1,6 mg/mL, totalizando o volume final de 15 μL . Do gráfico foi obtida a equação da reta, que foi utilizada para quantificar os açúcares redutores totais após a leitura.

3.7. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EUA). Uma solução de BSA (albumina sérica bovina) de concentração 0,1 mg/mL foi usada para construção da curva padrão.

3.8. Ultrafiltração do extrato bruto enzimático

O extrato bruto enzimático foi concentrado 10 vezes pelo processo de ultrafiltração, utilizando uma membrana com retenção de 50 kDa (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, USA) no sistema Amicon Filtration System-Stirred Cells, com pressão de 75 psi a 4°C. O corte da membrana foi selecionado baseado na alta massa molecular das pectinases (SIDDIQUI *et al.*, 2012; DAMÁSIO *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2008; SINITSYNA *et al.*, 2007; JAYANI *et al.*, 2005). As alíquotas de concentrado e ultrafiltrado foram armazenadas para posterior avaliação do perfil enzimático.

3.9. Purificação parcial da pectinase

A purificação de proteínas foi realizada a 28°C, no sistema cromatográfico automatizado Akta Purifier (GE Healthcare Life Sciences), com *software* Unicorn 5.0 integrado.

Primeiramente, a fração concentrada da ultrafiltração foi dialisada contra tampão tris-HCl 50 mM pH 7.5, *overnight*, a 4°C sob agitação. A amostra resultante foi fracionada em coluna de troca iônica HiTrap Q FF (1mL de volume de coluna) pré-equilibrada com tampão tris-HCl 50 mM pH 7.5. O volume aplicado de amostra foi de 1 mL. Um gradiente crescente de NaCl (de 0 a 1 M) foi aplicado à coluna a partir do 10° tubo. Foram coletadas 28 frações de 1mL, em um fluxo de 1mL/min. A atividade enzimática de cada fração foi determinada, assim como a absorbância a 280 nm. As frações correspondentes aos picos de atividade enzimática do cromatograma foram coletadas e armazenadas em câmara fria a 4°C, com 0,01% (m/v) de azida sódica.

Posteriormente, as amostras correspondentes aos picos de atividade enzimática resultantes da cromatografia de troca iônica foram submetidas a fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep16/60 Sephacryl S-100 HR (120 mL de volume de coluna), pré-equilibrada com tampão tris-HCl 50 mM pH 7.5. Foram aplicados 5 mL de amostra a um fluxo de 0,5 mL/min, e foram coletadas 47 frações de 5 mL, conforme metodologia do *software*. A atividade enzimática e absorbância foram determinadas para cada fração, e as frações correspondentes aos picos de atividade enzimática foram coletadas e armazenadas em câmara fria a 4°C, com 0,01% (m/v) de azida sódica para posterior avaliação do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e zimograma.

3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

O grau de pureza da enzima parcialmente purificada foi analisado por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As amostras do concentrado e frações da exclusão molecular (Sephacryl S-100) foram precipitadas em solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% em água, e incubadas por 1 h a 4°C. Em

seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14.000 rpm por 15 min, a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por três vezes em acetona PA refrigerada, e foram centrifugadas conforme mencionado anteriormente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 15 min para secagem.

Após esse período, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra (tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,05%, glicerol 20% e β-mercaptoetanol 5%), fervidas por 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida 12%.

A eletroforese foi realizada em sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contendo SDS 0,1% (v/v). Para cada corrida, foram utilizados 1 µL de marcador de massas moleculares LMW, contendo: fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa) e inibidor de tripsina (20 kDa). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3), à temperatura ambiente, e submetida a 25 mA constantes por 60 min. Uma concentração de 15 µg/mL de proteína foi definida para cada amostra.

3.11. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida eletroforética as bandas proteicas foram coradas pelo método de nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). Primeiramente, o gel foi incubado por 1 h em solução fixadora (metanol 40% e ácido acético 7%). Após a incubação, o gel foi lavado por 20 minutos em solução de etanol 50% (v/v). Este processo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, o gel foi incubado por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v), lavado em água, e incubado na solução de coloração (nitrato de prata 0,2% m/v, formaldeído 0,03% v/v) por 15 min. Por fim, o gel foi lavado três vezes em água destilada e submetido à solução reveladora (carbonato de sódio 6,0% m/v, tiosulfato de sódio 0,004% v/v, formaldeído 0,02% v/v). Após o surgimento das bandas, a reação foi interrompida com solução fixadora. O gel foi foto-documentado em *scanner* comercial.

3.12. Zimograma

As amostras do extrato bruto concentrado e da fração semi-purificada (PEC2) foram submetidas à técnica de zimograma através da eletroforese em gel SDS-PAGE 12% (v/v), como descrito no item 3.10 do presente capítulo, co-polimerizado com solução de pectina de frutas cítricas 0,1% (v/v), como descrito por Cruickshank e Wade (1980).

Após a eletroforese, o gel foi incubado duas vezes em solução de triton X-100 2,5% (v/v) por 30 minutos, a 28°C sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 por 90 minutos, a 50°C sob agitação. A reação foi interrompida pela incubação do gel a 4°C por 1 hora.

Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e imerso em solução de vermelho de rutênio 0,02% (m/v) por 30 minutos sob agitação. Por fim, o gel foi descorado com água destilada até o aparecimento das bandas translúcidas. Uma concentração de 50 µg/mL de proteína foi definida para o zimograma. O gel foi foto-documentado em *scanner* comercial.

As corridas de eletroforese em SDS-PAGE e Zimograma foram realizadas simultaneamente, no mesmo gel de corrida.

4. Resultados e discussão

4.1. Perfil enzimático do extrato bruto de *A. terreus*

A Figura 2 apresenta o perfil enzimático de holocelulases do extrato bruto de *A. terreus* crescido em bagaço de cana por SSF.

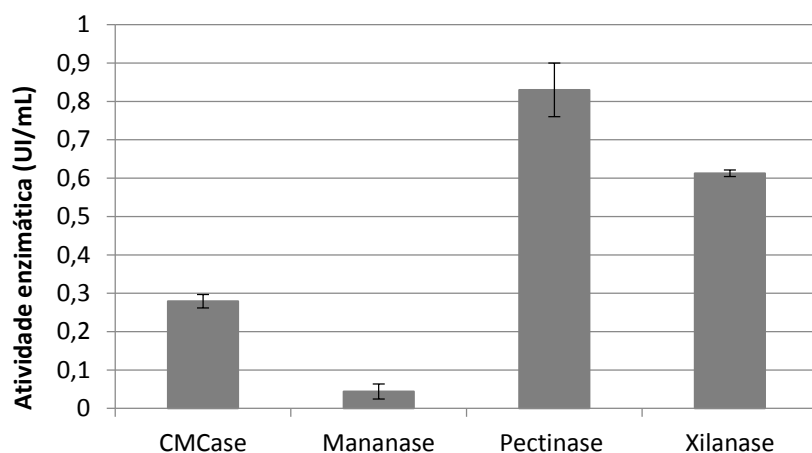


Figura 2 - Determinação da atividade de holocelulases no extrato bruto de *A. terreus*.

Observa-se que o *A. terreus* foi capaz de produzir CMCCase, mananase, pectinase e xilanase quando crescido em bagaço de cana. Diversos estudos relatam que este fungo é capaz de produzir grandes quantidades de holocelulases quando crescido em substratos lignocelulósicos (MOREIRA, 2013; NAGHVI *et al.*, 2013; NARRA *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2008).

Ao analisar o gráfico, nota-se uma maior atividade das enzimas pectinase (0,83 UI/mL) e xilanase (0,62 UI/mL). Esses dados condizem com outros descritos na literatura para *A. terreus* crescido em bagaço de cana por SSF (SIQUEIRA, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010). Além disso, o gênero *Aspergillus* é frequentemente relatado como um grande produtor de pectinases (KASHYAP *et al.*, 2001). No entanto, as atividades enzimáticas aqui descritas são relativamente menores que as apresentadas por Siqueira (2010), de 1,48 UI/mL de xilanase e 1,81 UI/mL de pectinase. Dessa forma, se fazem necessários estudos de otimização das condições de cultivo do fungo, de modo a ser alcançado melhores resultados de produção de enzimas.

Comparado a um estudo onde foi utilizada a casca de banana como fonte de carbono, o presente trabalho revelou uma maior atividade de pectinase (0,51 UI/mL e 0,83 UI/mL, respectivamente), embora a casca de banana apresente maior porcentagem de pectina em sua constituição (REHMAN *et al.*, 2014). Sabe-se que a proporção de celulose, hemicelulose e pectina contida na fonte de carbono usada para o cultivo do fungo é um

parâmetro importante para produção de enzimas (HALTRICH *and* STEINER, 1994). As diferenças na constituição físico-química da biomassa lignocelulósica leva a um acesso diferenciado das enzimas às fibras de cada substrato, culminando em produções enzimáticas diferenciadas para cada resíduo agroindustrial. No caso específico do *A. terreus*, existem estudos que afirmam que a presença de substâncias pécicas no meio/substrato/biomassa induz a expressão de genes responsáveis pela produção de pectinases (RUNCO *et al.*, 2001).

Embora o bagaço de cana tenha um teor de pectina menor (8 -10%) (MOORE *et al.*, 2013) que a casca de banana (11-21%) (EMAGA *et al.*, 2008), a possível disposição da pectina em regiões mais expostas do bagaço pode influenciar na indução de alta produção de pectinases, justificando o padrão observado no presente trabalho.

Diante dos resultados de maior atividade de pectinase, optou-se por esta enzima como candidata para estudos de purificação, caracterização, e posteriores experimentos de imobilização enzimática.

4.2. Ultrafiltração

O extrato bruto de *A. terreus* foi fracionado por ultrafiltração usando membrana de corte de 50 kDa. Os volumes correspondentes ao extrato bruto, fração do ultrafiltrado e concentrado foram de 300 mL, 270 mL e 30 mL, respectivamente. A presença de atividade pectinolítica no ultrafiltrado se deve ao fato que as pectinases apresentam ampla faixa de peso molecular, variando de 35 a 115 kDa (JAYANI *et al.*, 2005). O perfil de holocelulases de cada uma das frações é apresentado na Tabela 1. Após o processo de ultrafiltração houve um aumento de 875% da atividade de pectinase no concentrado, quando comparado ao extrato bruto.

Tabela 1 - Perfil de holocelulases de *A. terreus* no extrato bruto, concentrado e ultrafiltrado.

Fração/Enzima	Atividade enzimática volumétrica (UI/mL)	Atividade enzimática específica (UI/mg)
Extrato bruto		
CMCase	0,27 ± 0,13	24,06
Mananase	0,043 ± 0,007	3,78
Pectinase	0,83 ± 0,06	71,53
Xilanase	0,61 ± 0,03	52,79
Ultrafiltrado		
CMCase	0,22 ± 0,008	61,33
Mananase	0,035 ± 0,0007	9,84
Pectinase	0,28 ± 0,009	78,64
Xilanase	0,50 ± 0,016	141,27
Concentrado		
CMCase	0,55 ± 0,088	7,02
Mananase	0,09 ± 0,019	1,21
Pectinase	8,1 ± 0,035	101,62
Xilanase	0,81 ± 0,008	10,26

A escolha da fração concentrada para estudos de purificação se deu em função da grande diferença entre a atividade específica da pectinase e das outras enzimas.

4.3. Cromatografia de troca iônica

O perfil cromatográfico do concentrado em resina HiTrap Q FF é apresentado na Figura 3.

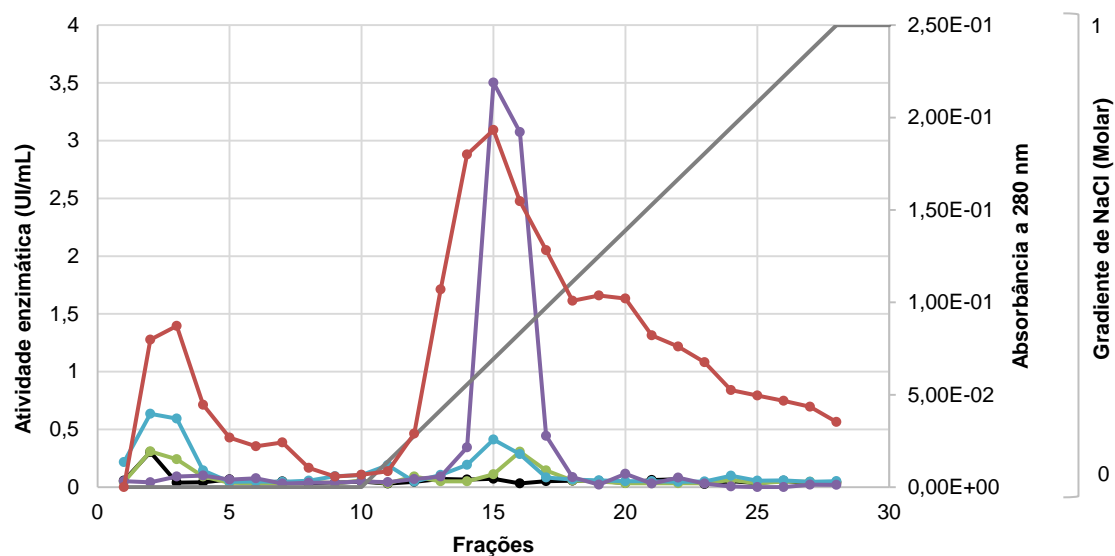


Figura 3 - Perfil cromatográfico da troca iônica em resina HiTrap Q FF. Volume de coluna = 1 mL, volume de amostra = 1 mL, gradiente de NaCl (0 a 1 M) aplicado a partir do 10° tubo, coletadas 28 frações de 1mL em fluxo de 1mL/min. —●— Mananase, —●— CMCase, —●— Xilanase, —●— Pectinase, —●— Proteínas totais, — Gradiente de NaCl.

Analisando o cromatograma nota-se que parte das proteínas presentes no concentrado não se ligaram a HiTrap Q FF, saindo antes do gradiente de NaCl aplicado a partir do 10° tubo. No entanto, a pectinase apresentou interação com a resina de troca aniônica, pois eluiu após o gradiente de NaCl, exibindo basicamente um único pico de atividade.

Este pico começou na fração 14, com uma atividade de 0,34 UI/mL, (eluído com 14 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.5 e aproximadamente 0,23 M de NaCl) e terminou na fração 17, com uma atividade enzimática de 0,44 UI/mL (18 mL de tampão fosfato de sódio e aproximadamente 0,39 M de NaCl).

Observa-se que as frações 14-17 também exibiram atividade, ainda que baixa, de xilanase e CMCase, sugerindo a não purificação da amostra. As frações 14-17 (nomeadas PEC1) foram reunidas para a posterior cromatografia de exclusão molecular.

4.4. Cromatografia de exclusão molecular

Na cromatografia de exclusão molecular, em resina HiPrep16/60 Sephacryl S-100 HR, a amostra resultante da cromatografia de troca iônica

(PEC1) foi fracionada gerando um perfil de eluição contendo um pico principal e bem definido com atividade da pectinase (Figura 4).

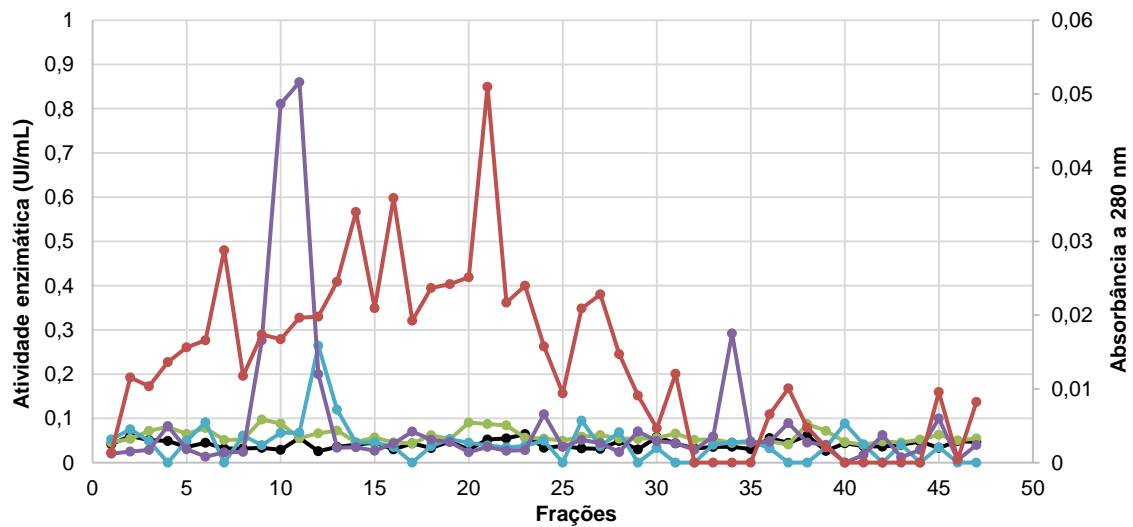


Figura 4 - Perfil cromatográfico da fração PEC1 em resina HiPrep16/60 Sephacryl S-100 HR de exclusão molecular. Volume de coluna = 120 mL, volume de amostra = 5 mL, coletadas 47 frações de 5 mL fluxo de 0,5 mL/min. ● Mananase, ● CMCCase, ● Xilanase, ● Pectinase, ● Proteínas totais.

No pico predominante observa-se que a pectinase foi eluída a partir da fração 9, com uma atividade de 0,27 UI/mL, correspondente a 45 mL de corrida, até a fração 12, com uma atividade de 0,19 UI/mL, correspondente a 60 mL de corrida. Nota-se também que a grande maioria das proteínas foi eluída após a fração 12, indicando uma separação significativa entre as proteínas totais e PEC1.

As frações 9 e 12 apresentaram atividade de pectinase, xilanase e CMCCase, indicando a presença de enzimas não pectinolíticas. Como a atividade de pectinase era baixa nestas frações, optou-se por descartar o uso das mesmas. Dessa forma, as frações 10 e 11 (nomeadas PEC2), que apresentaram atividades mais intensas de pectinase (F. 10 = 0,81 UI/mL e F. 11 = 0,85 UI/mL) foram reunidas para posteriores análises.

Um esquema simplificado dos passos de purificação da pectinase de *A. terreus* é apresentado na Figura 5.

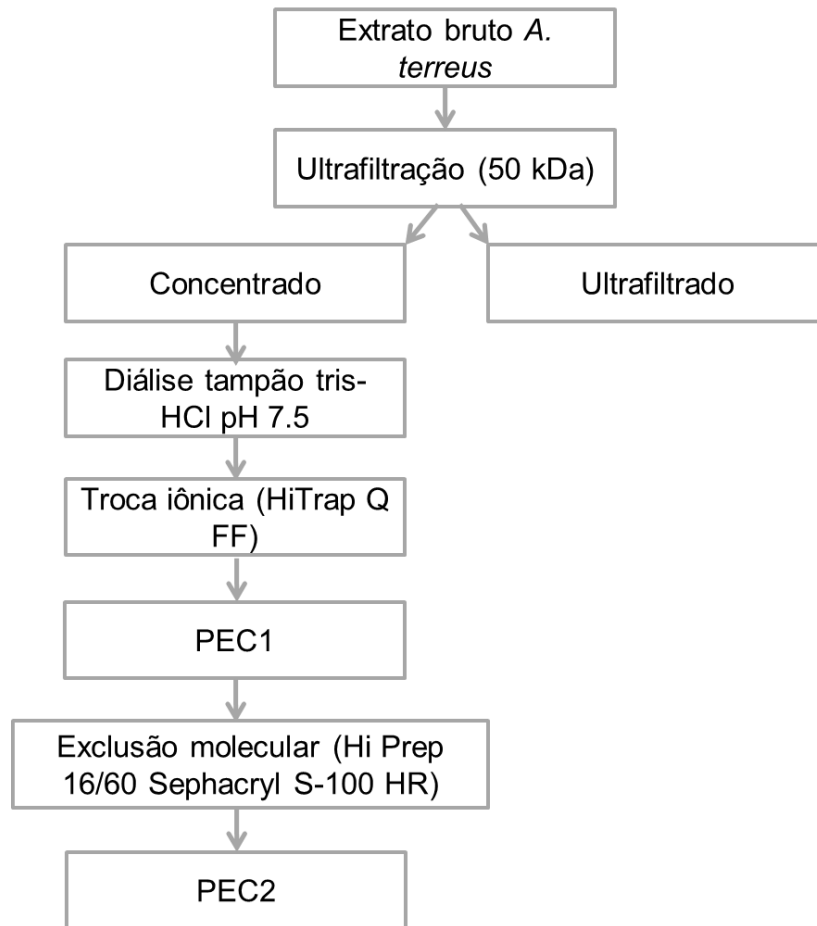


Figura 5 - Fluxograma das etapas de purificação da PEC2.

4.5. Eletroforese: SDS-Page e Zimograma

Os perfis protéicos do concentrado e da fração PEC2, e atividade da pectinase são apresentados na Figura 6.

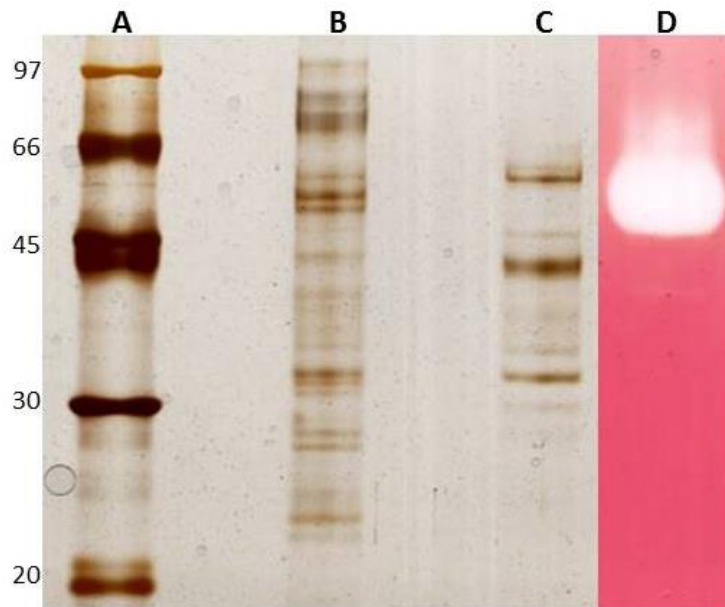


Figura 6 - Gel de eletroforese em condições desnaturantes e zimograma. (A) Marcador de massa molecular em kDa, (B) Concentrado, (C) PEC2, (D) Zimograma do concentrado.

A multiplicidade de proteínas da amostra do concentrado é evidenciada pelas diversas bandas formadas no gel de eletroforese (Figura 6 B). Após todas as etapas de purificação, nota-se que a multiplicidade de bandas reduz expressivamente, sendo visível a presença de aproximadamente 6 bandas após a etapa de filtração em gel (Figura 6 C), confirmando a purificação parcial da pectinase.

Através do zimograma (Figura 6 D) é possível confirmar a presença de pelo menos uma forma de pectinase com alta atividade enzimática, e massa molecular de aproximadamente 50 kDa. A massa molecular observada é condizente com as relatadas na literatura para diferentes pectinases purificadas de fungos e bactérias, onde se observa massas moleculares variando entre 35 e 115 kDa (SIDDIQI *et al.*, 2012; DAMÁSIO *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2008; SINITSYNA *et al.*, 2007; JAYANI *et al.*, 2005).

A Tabela 2 apresenta os cálculos de rendimento e índice de purificação parcial da enzima.

Tabela 2 - Rendimento e índice de purificação parcial de PEC2.

Etapa	Atividade (UI)	Proteína (mg)	Atividade específica (UI/mg)	Rendimento (%)	Índice de purificação (Veze)
Extrato bruto inicial	249	3,48	71,53	100	1
Ultrafiltração (50 kDa)	243	2,38	101,62	97,6	1,42
HiTrap Q FF	220	0,96	228,75	88,4	3,20
HiPrep16/60					
Sephacryl S-100 HR	199	0,31	638,46	79,9	8,92

Após as etapas de ultrafiltração e cromatografias foi constatado um rendimento de purificação de 79,9%, porém, como confirmado pelo perfil de proteínas da Figura 6 C, não foi possível alcançar a purificação total da pectinase.

Várias pectinases fúngicas têm sido purificadas por diversas metodologias, com diferentes rendimentos (CELESTINO *et al.*, 2006; GUMMADI *and* PANDA, 2003). Pedrolli e Carmona (2010) purificaram uma exopoligalacturonase de *A. giganteus* em apenas uma etapa de cromatografia de troca aniônica - Sephadex DEAE A-50, com um rendimento de 86,4% da atividade pectinolítica. Yadav e colaboradores (2009) relataram a purificação de uma pectina liase de *A. terricola* após cromatografias de troca iônica e filtração em gel, com rendimento de 45% da atividade inicial. Sethi e colaboradores (2016) relataram a purificação de uma pectinase de *A. terreus* crescido em casca de banana por SSF (SETHI *et al.*, 2016). Eles utilizaram como estratégia de purificação a precipitação com sulfato de amônio, seguida por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100, alcançando um rendimento de 8,08% da atividade pectinolítica inicial.

No presente trabalho, o alto rendimento de purificação parcial e o perfil de bandas apresentado pela fração PEC2 (Figura 6 C) apontam a necessidade de etapas adicionais para se alcançar a purificação total da enzima. No entanto, para os experimentos de imobilização não é necessário

o emprego de enzimas completamente purificadas, de modo que as condições alcançadas no presente trabalho já suprem a demanda para os estudos posteriores.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O presente capítulo teve como objetivos a produção e purificação de uma enzima candidata para estudos de imobilização enzimática. O fungo *A. terreus* revelou um potencial de produção de diferentes holocelulases, sendo predominante a atividade de pectinase. Conseqüentemente, essa enzima foi selecionada para os passos posteriores de purificação e imobilização.

Foram aplicadas diferentes abordagens de purificação, no entanto não foi possível chegar a purificação total da pectinase. De fato, para uma potencial aplicação industrial das enzimas imobilizadas é mais viável economicamente utilizar o próprio extrato bruto. Entretanto, a purificação de enzimas auxilia nos estudos de caracterização da enzima e do próprio processo de imobilização, ajudando a compreender os processos físico-químicos envolvidos. Dessa forma, como perspectivas futuras pretende-se, novamente, testar outras abordagens de purificação da pectinase.

6. Referências

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical & Biochemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 49-70, 2008.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CELESTINO, S. M. C.; MARIA DE FREITAS, S.; JAVIER MEDRANO, F.; VALLE DE SOUSA, M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33-42, 2006.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de açúcar, v. 5 - Safra 2018/19, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-86, agosto 2018. ISSN 2318-7921. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 20/02/2019.

CRUICKSHANK, R. H.; WADE, G. C. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 177-81, 1980.

DAMÁSIO, A. R. DE L.; SILVA, T. M. DA; MALLER, A.; et al. Purification and partial characterization of an exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1496-507, 2010.

EMAGA, T. H.; ROBERT, C.; RONKART, S. N.; WATHELET, B.; PAQUOTM M. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4346-4354, 2008.

FILHO, E. X. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo-B-1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of industrial microbiology**, v. 11, p. 171-180, 1993.

FISSORE, E. N.; ROJAS A. M.; GERSCHENSON, L. N.; WILLIAMS, P. A. Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 172-182, 2013.

GAO, J.; WENG , H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 281-287, 2011.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987-996, 2003.

GUPTA, s.; KAPOOR, M.; SHARMA, K. K.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 937-945, 2008.

HALTRICH, D.; STEINER, W. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: Effect of medium components. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 3, p. 229-235, 1994.

HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHOPE, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. In solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 102-110, 2012.

JACOB, N.; ASHA POORNA, C.; PREMA, P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6697-701, 2008.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KIM J. B.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.

KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 279-285, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, L. R. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus***: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. 2013. 297 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. John Wiley & Sons, Inc. 2014.

NAGHAVI, N. S. Partial Purification and Immobilization of Cellulase Enzymes from the Fungus *Aspergillus terreus* Isolated from Rotten Wood. **Journal of Life Sciences and Technologies**, v. 1, n. 1, 2013.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolysaccharidase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 567-73, 2010.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, V. 3, P. 9-18, 2009.

PINTO, A. C. R. T. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana**. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

REHMAN, S.; ASLAM, H.; AHMAD, A.; KHAN, S. A.; SOHAIL, M. Production of plant cell wall degrading enzymes by monoculture and co-culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* under SSF of banana peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1485-1492, 2014.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, S. M. B.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 635-641, 2010.

RUNCO, R.; NAVARRO, A. R.; MALDONADO, M. C. Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 487-491, 2001.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. **3 Biotech**, v. 6, n. 36, p. 1-15, 2016.

SIDDIQUI, M. A.; PANDE, V.; ARIF, M. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* Isolated from Decomposing Orange Peels. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 318-324, 2002.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; LEITE, R. S. R.; DA SILVA, R.; FERREIRA, V.; GOMES, E. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, 1237-1243, 2007.

SIQUEIRA, F. G. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases**. 2010. 277 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

SIQUEIRA, F. G.; SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SINITSYNA, O. A.; FEDOROVA, E. A.; SEMENOVA, M. V.; et al. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. **Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 565-71, 2007.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R. DA; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 79-82, 2001.

SOROOR, M. A. M.; GHAZY, A. M.; MAHDY, E. M. S.; EL-BADERY, M. O.; SHOUSA, W. G.; EL-KHONEZY, M. I. Purification and Characterization of Polygalacturonases Produced by *Trichoderma reesei* F418 using Lemon Peels and Rice Straw under Solid-State Fermentation. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 94, p. 3184-3198, 2013.

VALE, L. H. F. DO. **Regulação da produção de enzimas celulolíticas por fungos em resposta a efetores metabólico**. 2012. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

VINIEGRA-GONZALES, G.; FAVELA-TORRES, E.; NOE AGUILAR, C.; JESUS ROMERO-GOMEZ, J. ; DIAZ-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering**, v. 13, p. 157-167, 2003.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263-275, 2009.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Purification and Characterization of Pectin Lyase Produced by *Aspergillus terricola* and its Application in Retting of Natural Fibers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 270-283, 2009.

WANG, L.; WEI, L.; CHEN, Y.; JIANG, R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 57-63, 2010.

Capítulo III:
**Funcionalização/caracterização dos
nanotubos de carbono e sua utilização
em imobilização enzimática**

1. Introdução

A nanociência inclui o estudo e manipulação de partículas e sistemas em nanoescala (1 nanômetro = 10^{-9} metros), de modo a se descobrir novas propriedades e comportamentos para esses materiais. Já a nanotecnologia compreende o *design*, caracterização e produção de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, visando à aplicação dos nanomateriais (NNI, 2013; ABU-SALAH *et al.*, 2010).

A grande premissa da ciência em nanoescala baseia-se no fato de que os materiais, quando em escala nanométrica, apresentam propriedades (químicas, elétricas, magnéticas, mecânicas e ópticas) bem diferentes dos seus homólogos em escala maior. Essas novas propriedades são, principalmente, devido ao efeito de confinamento quântico de elétrons, e podem ser exploradas em diversas áreas, como física, ciência dos materiais, engenharia, biologia e biomedicina (ABU-SALAH *et al.*, 2010; MANSOORI, 2005)

Os nanotubos de carbono (CNT's) foram descobertos por Sumio Iijima em 1991 (IJIMA, 1991). Eles consistem de folhas de grafite enroladas em formato cilíndrico contendo meia esfera de fulereno C60 em cada uma de suas extremidades (Figura 7). Esses materiais possuem diâmetro entre 1 e 100 nanômetros, com comprimento variando de centenas de nanômetros a micras (TASIS *et al.*, 2006; HARRIS, 1999).

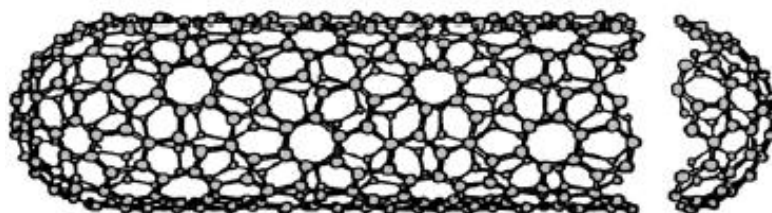


Figura 7 - Representação esquemática da estrutura básica de um nanotubo de carbono.

Fonte: SINHA *and* YEOW, 2005.

Existem diferentes rotas de síntese de nanotubos de carbono, como deposição química de vapor (CVD), vaporização de átomos de carbono, decomposição de monóxido de carbono a altas pressões e temperaturas

(CHIANG *et al.*, 2001), e pirólise do benzeno na presença de hidrogênio (HARRIS, 1999). No entanto, a CVD é a rota mais comum.

Os nanotubos podem ser divididos em duas categorias (Figura 8): nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs), que consistem em apenas uma folha de grafite enrolada com diâmetro de 0.4 a 2nm; e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), formados por múltiplas folhas de grafite enroladas concêntricamente com diâmetros de 2 a 100 nm (LEE *et al.*, 2006; GONG *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2001).

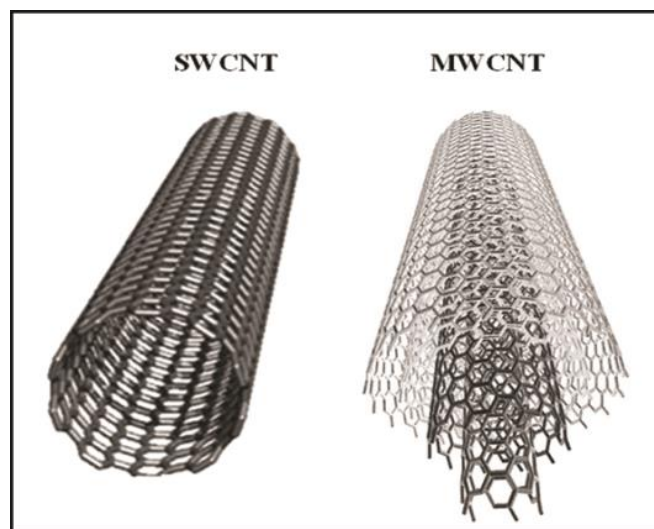


Figura 8 - Nanotubo de parede única (SWNT's) à esquerda e nanotubo de parede múltipla à direita (MWCNT's).

Fonte: CHOUDHARY *and* GUPTA, 2011.

Os CNT's apresentam propriedades estruturais, eletrônicas e mecânicas únicas, e por este motivo vêm despertando atenção especial desde seu descobrimento (JOSHI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006). Várias aplicações potenciais para os nanotubos são propostas no ramo da nanotecnologia, incluindo a obtenção de compostos condutores e de alta resistência mecânica, dispositivos semicondutores em escala nanométrica e dispositivos emissores de elétrons (GONG *et al.*, 2005).

No ramo da biotecnologia, os nanomateriais vêm sendo amplamente pesquisados como agentes de imobilização de enzimas, pois apresentam algumas características que os fazem ótimos suportes para catalisadores, como extensa área de superfície, menor resistência à transferência de massa e eficaz carregamento das moléculas (WANG *et al.*, 2010; JIA *et al.*,

2003). Essas características geram grande potencial para otimização das técnicas de imobilização, pois viabilizam um maior carregamento de enzimas no suporte, proporcionam um aumento da transferência de massa entre enzima e substrato, e, desta forma, promovem maior rendimento e produtividade aos processos.

Dentre os nanomateriais, os nanotubos de carbono destacam-se em relação aos outros, pois apresentam propriedades físicas e químicas específicas, como flexibilidade, rigidez, extensa área de superfície e biocompatibilidade, o que favorece a aplicação em biorreatores (WANG *et al.*, 2010; JIA *et al.*, 2003).

Vários autores sugerem que a imobilização de enzimas aos nanotubos de carbono é uma aplicação biotecnológica muito promissora, podendo ser aplicada na fabricação de células de biocombustíveis, indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (LEE *et al.*, 2010; WILLNER *et al.*, 2009).

2. Objetivos específicos

- Funcionalizar os nanotubos de carbono.
- Caracterizar os nanotubos de carbono primitivos (não funcionalizados) e funcionalizados através de técnicas de termogravimetria, espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura.
- Aplicar os nanotubos de carbono como suportes de imobilização enzimática.

3. Metodologia

3.1. Amostra

A amostra de nanotubos de carbono de paredes múltiplas não funcionalizadas (lote HP2627) foi cedida pelo Laboratório de Nanomaterias, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2. Funcionalização

A carboxilação dos nanotubos de carbono foi realizada com ácido sulfúrico e nítrico concentrados (3:1 em volume), com posterior exposição a ultrassom aquecido a 70°C, e agitação mecânica de 430 rpm. O tempo de exposição foi variado (5 min, 20 min e 50 min) visando à obtenção de diferentes graus de funcionalização. A separação e lavagem dos nanotubos foram realizadas por filtração em funil de vidro sinterizado (porosidade de 16 a 40 microns) até o alcance de pH neutro. A secagem foi feita em estufa a 100°C, por 8 horas. Todo o procedimento foi realizado no Instituto de Ciências Exatas da UFMG.

A funcionalização dos MWCNT's permite a inserção de grupamentos carboxílicos (-COOH) que promovem uma maior dispersão em água e solventes, além de disponibilizar grupamentos livres para reações químicas com outras moléculas e componentes biológicos.

3.3. Teste de solubilidade dos nanotubos de carbono

Para o teste de solubilidade, 1 mg de MWCNT's foi disperso em 10 mL de água deionizada com auxílio de um ultrassom de ponta (Viracell, Sonics), na potência de 20%, por 30 segundos. Após a sonicação as amostras foram mantidas em repouso e observadas por 7 dias.

3.4. Análise termogravimétrica e térmica diferencial

Através da análise termogravimétrica (TGA) é possível fazer uma relação da variação de peso da amostra em função da temperatura, proporcionando a identificação dos componentes do analito, a análise de pureza e cálculo do grau de funcionalização dos nanotubos de carbono.

A termogravimetria foi realizada no Instituto de Ciências Exatas da UFMG. As análises foram feitas em duplicata, no equipamento Q500 (TA Instruments), com razão de aquecimento de 5°C min⁻¹, da temperatura ambiente até 900°C, em atmosfera de ar sintético e vazão de 25 mL min⁻¹. Foram pesados aproximadamente 3 mg de nanotubos para cada análise. A alumina foi utilizada como padrão para calibração.

3.5. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que oferece informações químicas e estruturais de compostos orgânicos e inorgânicos, permitindo uma rápida identificação da amostra (BANTZ *et al.*, 2011).

Nessa técnica uma fonte de luz monocromática incide sobre a amostra, e a luz espalhada é coletada por um detector. Quando a luz incide sobre o analito os fótons são espalhados inelasticamente, podendo perder (Stoks shift) ou ganhar (anti-Stokes shift) energia a partir do movimento vibracional das moléculas presentes na amostra (ANKER *et al.*, 2008).

O espectro resultante da medida do espalhamento consiste em bandas correspondentes às transições vibracionais específicas da estrutura molecular. Isso gera um *fingerprint* que é utilizado como ferramenta para identificação do analito, provendo uma alta especificidade à técnica (BANTZ *et al.*, 2011).

As análises espectroscópicas foram realizadas no Laboratório de Óptica do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Foi utilizado o equipamento T64, com laser 785 nm, potência de 3 mW, objetiva de 50x, tempo de aquisição de 30 segundos e 3 acumulações.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV foram obtidas no microscópio Quanta 200- FEG/FEI com canhão de emissão por efeito de campo (Centro de Microscopia da UFMG e Laboratório de Microscopia da UnB). O preparo das amostras foi feito por sonicação dos nanotubos em álcool isopropílico e posterior deposição em grades de cobre/carbono de 200 *mesh*. A determinação da distribuição de comprimento foi realizada com auxílio do *software* Image J, através da medição de aproximadamente 170 nanotubos observados isoladamente para cada amostra.

3.7. Ensaio de imobilização enzimática nos nanotubos de carbono

Os experimentos de imobilização foram realizados com os nanotubos funcionalizados e não funcionalizados. As amostras enzimáticas utilizadas foram o extrato bruto de *A. terreus* e a pectinase parcialmente purificada (descritas no Capítulo II).

As amostras de nanotubos testadas foram: MWCNT's primitivos cedidos pelo Laboratório de Nanomaterias do Departamento de Física da UFMG, e MWCNT's com 9% de funcionalização. O último foi selecionado após análises do teste de solubilidade e termogravimetria, que evidenciaram alto grau de carboxilação. A alta disponibilidade de grupamentos carboxílicos aumenta a dispersabilidade dos nanotubos em água/tampão (ambientes da reação) e confere uma maior quantidade de grupamentos livres para reação com as enzimas.

A abordagem de imobilização escolhida foi a adsorção física conforme descrito por Shah (2008), Mubarak (2014) e Oliveira (2016). Nesse protocolo, os nanotubos são dispersos em solução contendo enzimas, e a mistura é incubada sob agitação *overnight*. Após a reação, o derivado (enzima+nanotubo) foi centrifugado por 3 vezes para remoção dos componentes que não reagiram. Foram realizadas variações na concentração de enzimas e nanotubos, e foram testados pH's de reação diferentes, utilizando tampões diversos.

Para confirmação da imobilização das enzimas ao suporte foram realizados ensaios enzimáticos pelo método de DNS (descrito no Capítulo II) no derivado (enzima+nanotubo) e nos sobrenadantes gerados pelo processo de centrifugação.

4. Resultados e discussão

4.1. Teste de solubilidade

A Figura 9 apresenta o teste de solubilidade dos nanotubos em água.

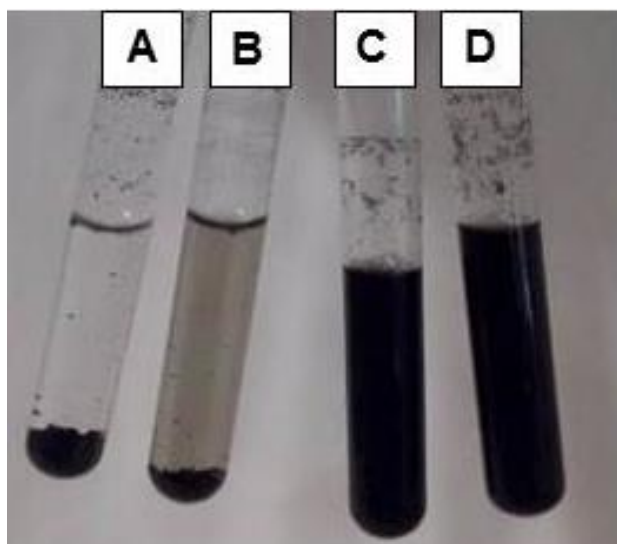


Figura 9 - Teste de solubilidade dos MWCNT's. (A) não funcionalizado, (B) 5 min, (C) 20 min, (D) 50 min de ultrassom.

Nota-se uma clara diferença entre o grau de dispersão dos nanotubos não funcionalizados e com diferentes tempos de funcionalização.

A amostra não funcionalizada (Figura 9 A) apresenta nanotubos “decantados” no fundo tubo de ensaio, indicando a não dispersão em água. A amostra com 5 min de funcionalização (Figura 9 B), ainda que tenha apresentado certo grau de solubilidade, também exibiu formação de agregados. Já nas amostras de 20 e 50 min de carboxilação (Figura 9 C e D respectivamente) é notável a alta dispersão dos nanotubos, uma vez que a água encontra-se totalmente preta e sem presença de agregados. A imagem do teste de solubilidade demonstra uma expressiva mudança de comportamento dos nanotubos após o processo de funcionalização.

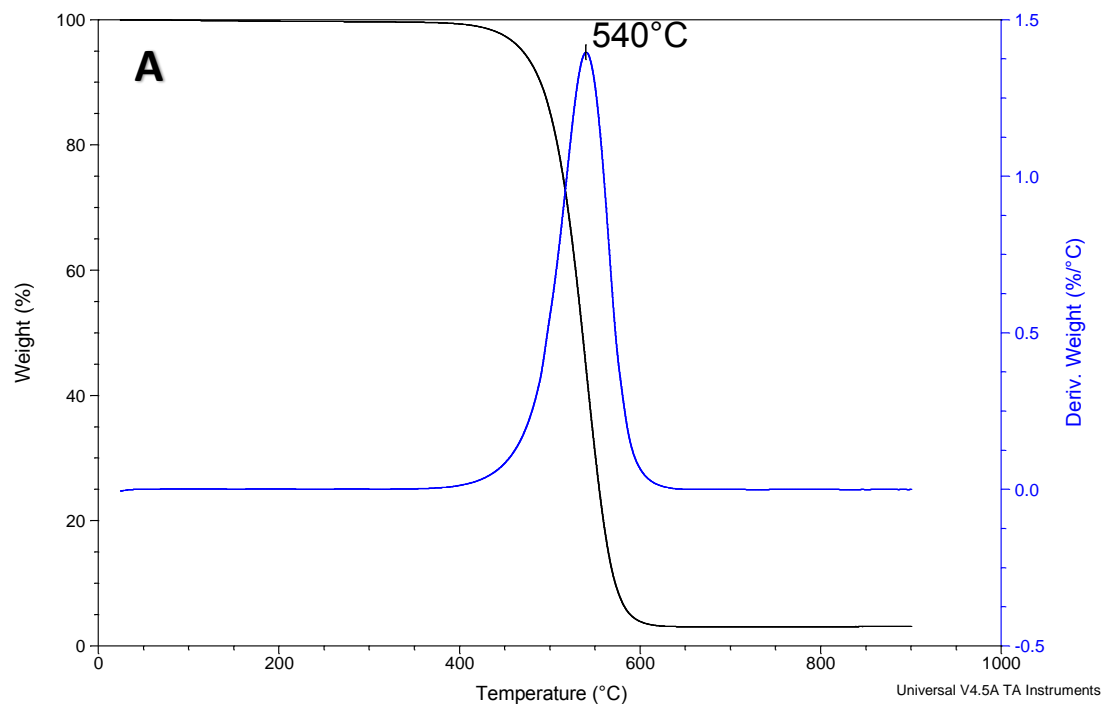
Na amostra não funcionalizada (Figura 9 A) a ocorrência de interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas entre os nanotubos justificam a formação de agregados, indicando insolubilidade (BERGIN *et al.*, 2008). Esse padrão também pode ser observado na amostra com apenas 5 minutos de funcionalização (Figura 9 B). Já no caso dos nanotubos com maior tempo de funcionalização (Figura 9 C e D), a alta dispersão pode ser atribuída à ocorrência de dois fenômenos. O primeiro é formação de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxílicos presentes na superfície dos MWCNT's e a água (AGHABOZORG *et al.*, 2010). O outro fenômeno é o

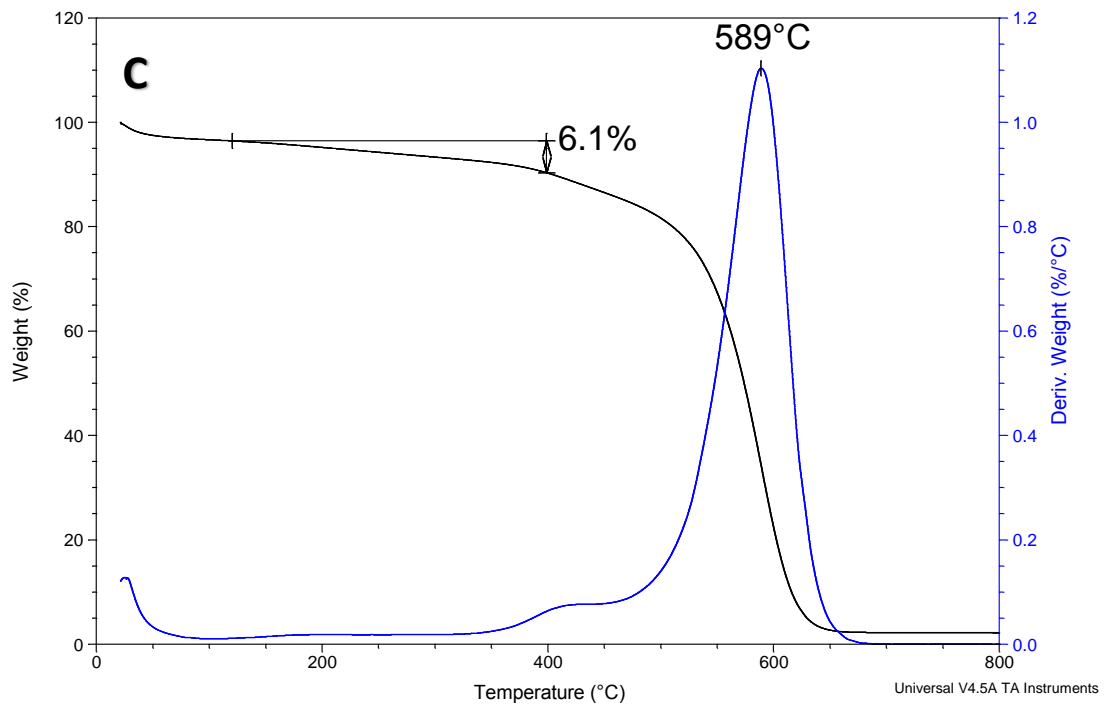
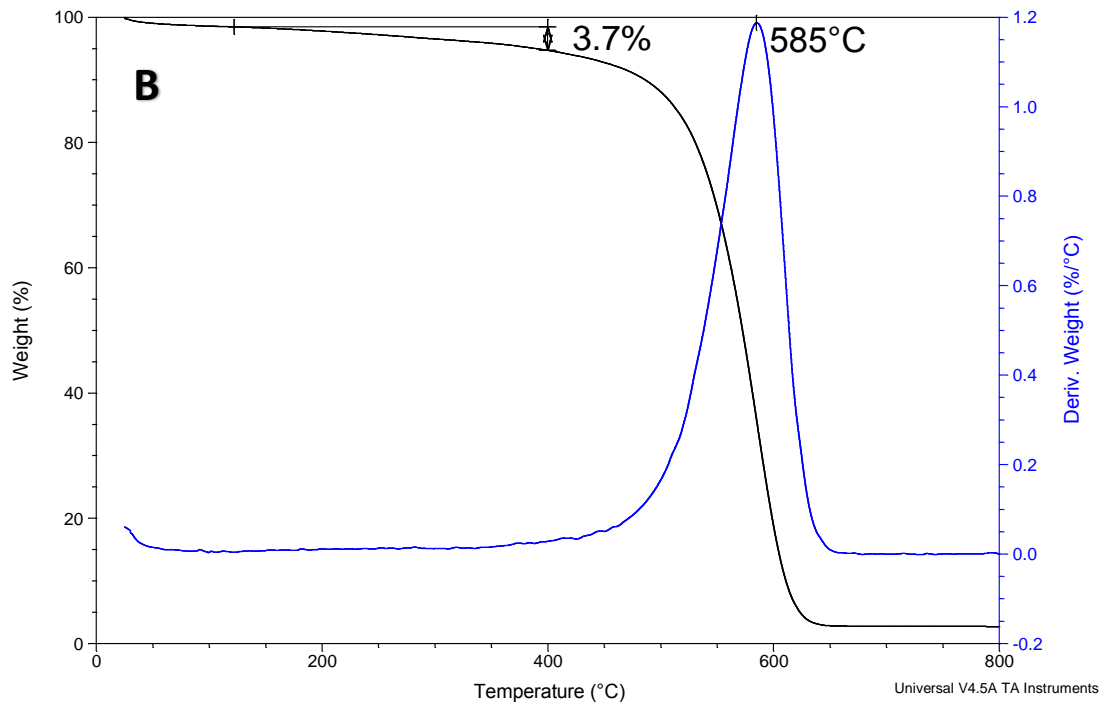
forte repelimento entre os nanotubos gerado pelas cargas igualmente negativas dos grupos funcionais de sua superfície (OSORIO *et al.*, 2008).

Através do teste de solubilidade também foi possível notar uma relação linear entre tempo de funcionalização e dispersabilidade. Quanto maior o tempo de reação, maior o grau de dispersão dos nanotubos em água, e menor a formação de agregados no fundo do tubo. Entretanto, somente com dados semi-qualitativos não é possível afirmar que os nanotubos possuem graus de carboxilação diferentes. Análises termogravimétricas quantitativas podem confirmar a existência de graus de carboxilação diferentes entre as amostras.

4.2. Análise termogravimétrica e térmica diferencial

A Figura 10 exibe os gráficos da análise termogravimétrica e térmica diferencial dos nanotubos de carbono primitivos e com diferentes tempos de funcionalização.





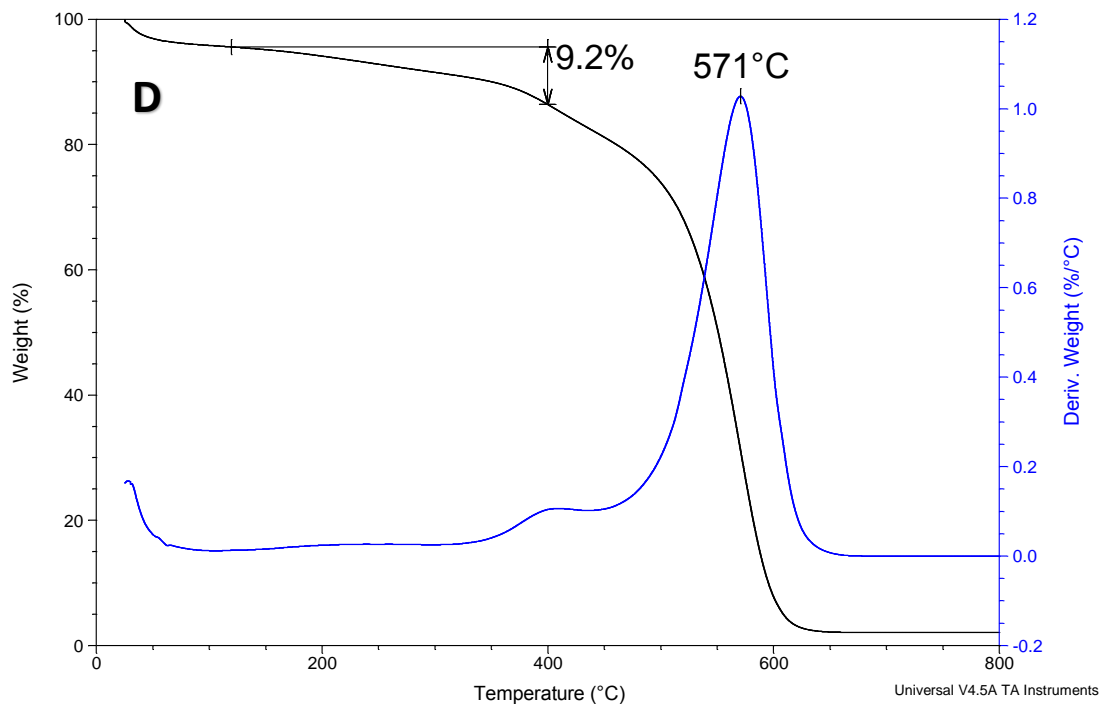


Figura 10 - Análise termogravimétrica dos MWCNT's. (A) não funcionalizado, (B) 5 min, (C) 20 min, (D) 50 min de ultrassom. Em preto a porcentagem de perda de peso da amostra, em azul a derivada da perda de peso da amostra.

Observa-se que, tanto na amostra de nanotubos não funcionalizados (Figura 10 A), quanto nas amostras funcionalizadas (Figura 10 B, C e D) houve uma significativa perda de peso no intervalo de 450-650°C, como evidenciado pela curva de TGA (preto). Na curva de DTA (azul), observam-se picos entre 540-589°C, correspondente à temperatura média onde houve expressiva perda de peso.

Sabe-se que os nanotubos de carbono possuem alta estabilidade térmica e se decompõe somente em altas temperaturas, entre 500 e 700°C. Este intervalo corresponde à temperatura onde ocorre a degradação do esqueleto de carbono (AGHABOZORG *et al.*, 2010).

Para a amostra de nanotubos não funcionalizados (Figura 10 A) a perda de peso corresponde à faixa de 450 a 700°C foi de aproximadamente 98%. Os outros 2% representam a presença de material amorfo, que degrada entre 200 e 400°C, e de metais utilizados como catalizadores no processo de síntese, que degradam em temperaturas superiores a 750°C (ANDERSSON, 2011). Já para as amostras carboxiladas observam-se outras perdas de peso expressivas fora do intervalo de 450-700°C. Esse

dados é evidenciado pelo decaimento da curva de TGA e pelo surgimento de outros picos na curva de DTA em temperaturas abaixo de 450°C. Esses dados sugerem a presença de componentes não-nanotubos nas amostras.

A composição dos gases gerados pela degradação de materiais depende diretamente dos grupos funcionais presentes na sua superfície. Grupos carboxílicos, quando decompostos, geram CO₂ e H₂O e apresentam faixa de queima entre 200 e 600°C (AGHABOZORG *et al.*, 2010). A perda de peso observada abaixo de 450°C nas amostras funcionalizadas pode ser atribuída a perda de CO₂ resultante da descarboxilação dos grupos funcionais, sendo diretamente proporcional aos conteúdos de -COOH presentes na superfície do nanotubo (JAIN *et al.*, 2013).

Partindo desse princípio, e baseando-se na literatura (JAIN *et al.*, 2013), foi possível calcular o grau de carboxilação das amostras através da perda de peso entre 120 e 400 °C. As amostras de 5, 20 e 50 minutos de reação apresentam graus de carboxilação de aproximadamente 4, 6 e 9%, respectivamente.

4.3. Espectroscopia Raman

O gráfico da Figura 11 apresenta o espectro Raman dos MWCNT's primitivos.

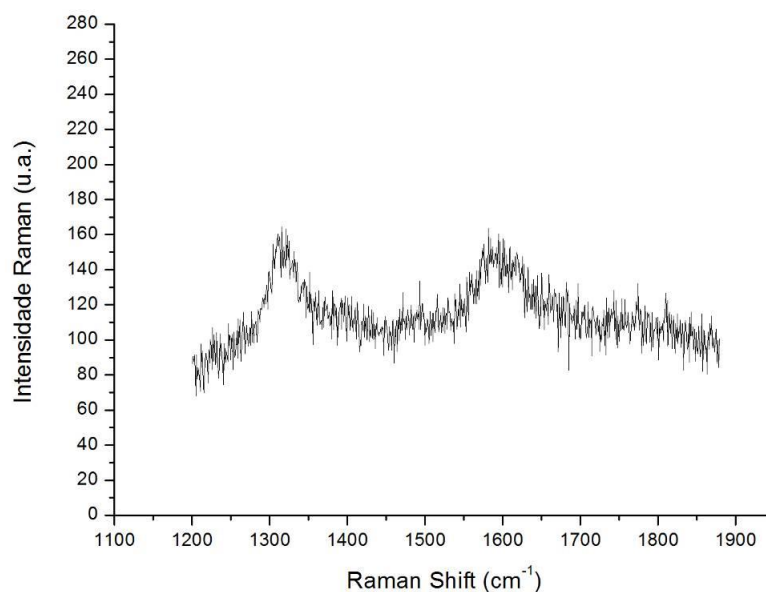


Figura 11 - Espectro Raman dos MWCNT's não funcionalizados.

A partir deste gráfico é possível observar a presença de dois picos, um em 1320 cm^{-1} e outro 1580 cm^{-1} . Esses picos são nomeados banda D e banda G respectivamente, e são característicos de nanotubos de carbono (ANDERSSON, 2011).

A banda D, ou banda de desordem, é um modo vibracional que reflete defeitos na parede dos nanotubos (hibridizações sp^3) e a presença de carbono amorfo no material (ANDRADE *et al.*, 2013; MUSSI *et al.*, 2010). Nos MWCNT's, a banda D possui uma maior intensidade, que é correlacionada à desordem estrutural do material (ANDRADE *et al.*, 2013).

Já a banda G é característica de materiais compostos por grafite, e representa os modos de vibração tangencial das ligações entre os átomos de carbono (LESIK *et al.*, 2010). Nos nanotubos de parede única a banda G é composta por dois picos bem definidos (G+ e G-) de alta intensidade, já nos MWCNT's essa banda apresenta morfologia pouco definida, com presença de apenas um pico de baixa intensidade (ANDERSSON, 2011), como corroborado pelos dados apresentados.

4.4. Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 12 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de nanotubos primitivos e carboxilados.

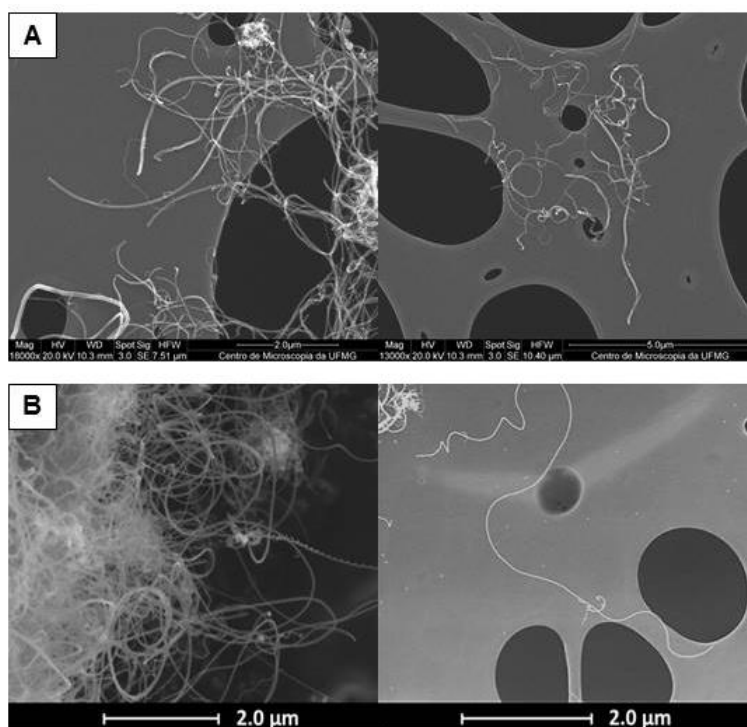


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura dos MWCNT's. (A) não funcionalizados e (B) funcionalizados por 20 min.

Ambas as imagens evidenciam uma morfologia tubular, típica de nanotubos de carbono (ATIEH *et al.*, 2010), e uma distribuição heterogênea, verificada pela presença de nanotubos com diferentes diâmetros e comprimentos. O diâmetro médio das amostras foi de 19 nm. A partir desses dados, pode-se inferir que os nanotubos observados eram de múltiplas paredes, pois nanotubos de parede única possuem diâmetros menores, entre 0,4 e 2 nm (GONG *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006).

Apesar de não ser evidente nas imagens microscópicas, as diferentes amostras de nanotubos de carbono apresentaram comprimento médios distintos, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do comprimento médio e grau de funcionalização para os MWCNT's funcionalizados por diferentes tempos de tratamento ácido.

Tempo de tratamento ácido (min)	Grau de funcionalização (%)	Comprimento médio (μm)
0	0	6,5
5	4	5,5
20	6	3,5
50	9	2,0

Sugere-se que a mudança de comprimento possa ser consequência do processo de funcionalização. Durante o tratamento, o aumento do tempo de exposição das amostras ao ultrassom pode culminar na fragmentação dos tubos.

4.5. Ensaio de imobilização enzimática

Após o procedimento de imobilização descrito no item 3.7 não foram detectadas enzimas imobilizadas ao suporte, todo conteúdo proteico e atividade enzimática foram detectadas somente no sobrenadante da imobilização (correspondente às enzimas não imobilizadas). Em amostras de nanotubos não funcionalizados, a base química da imobilização é a interação hidrofóbica, uma vez que os nanotubos não carboxilados apresentam alto grau de hidrofobicidade (AGHABOZORG *et al.*; 2010; LEE *et al.*, 2006). No entanto, as holocelulases são enzimas extremamente hidrofílicas e, dessa forma, não estabelecem ligações do tipo hidrofóbica com o suporte. Já nas amostras de nanotubos funcionalizados, a presença de grupos carboxílicos (-COOH) gera um aumento da solubilidade do material (ATIEH *et al.*, 2010) e promove o estabelecimento de ligações com os grupamentos amina presentes na enzima (WANG *et al.*, 2010). No entanto, com o aumento da solubilidade dos nanotubos no meio líquido, houve a formação de uma coloração preta que gerou grandes interferentes nos ensaios.

Dessa forma, as abordagens e o suporte de imobilização escolhidos mostraram-se ineficientes para imobilização de holocelulases. Além disso, a coloração negra da amostra de nanotubos gerou interferentes significativos nas leituras de absorção óptica pelo método de DNS.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O presente capítulo objetivou a funcionalização e caracterização dos nanotubos de carbono, e sua posterior aplicação como suporte de imobilização enzimática. Sabe-se que as nanoestruturas apresentam um grande potencial de aplicação em imobilização, pois possuem características intrínsecas que proporcionam a otimização dos processos, através da

promoção de alto carregamento de moléculas e aumento da transferência de massa entre enzima e substrato.

O processo de funcionalização dos nanotubos de carbono mostrou-se muito eficiente, gerando maior dispersabilidade do material em ambientes aquosos, possibilitando a sua aplicação em sistemas biológicos. Também foi possível padronizar, com sucesso, técnicas de controle do grau de funcionalização do material.

Entretanto, quando realizados os experimentos de imobilização verificou-se que não houve ligação de enzimas ao suporte, indicando a ineficiência da abordagem de imobilização empregada. Adicionalmente, características intrínsecas do próprio material, sua coloração negra, geraram um entrave metodológico no processo.

Devido à ineficácia da abordagem de imobilização, optou-se pela realização de estudos de *screening* de outros suportes e abordagens para imobilização de enzimas (descritos no Capítulo IV). Sabe-se que não existe um método universal de imobilização enzimática; as características únicas da superfície de cada enzima e suporte interferem muito na química de ligação (VAZ *et al.*,2016). Dessa forma, para uma seleção mais racional da abordagem de imobilização, é fundamental a realização de testes prévios de triagem de diferentes suportes, e a avaliação da eficiência e rendimento de cada abordagem.

6. Referências

ABU-SALAH, K.M.; ANSARI, A.A.; ALROKAYAN, S.A. DNA-Based Applications in Nanobiotechnology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-15, 2010.

AGHABOZORG, H. R.; KISH, S. S.; RASHIDI, A. M. Solubility of functionalized carbon nanotubes in different solvents. **Journal of Applied Chemical Researches: Winter**, v. 3, n. 12, p. 29-33, 2010.

ANDRADE, N. F.; MARTINEZ, D. F.; PAULA, A. J.; SILVEIRA, J. V.; ALVES, O. L.; FILHO, A. G. S. Temperature effects on the nitric acid oxidation of industrial grade multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1-11, 2013.

ANDRESSON, C. H. **Chemistry of Carbon Nanostructures**. 2011. 64 p. Dissertation – Faculty of Science and Technology. Uppsala, 2011.

ANKER, J. N.; HALL, W. P.; LYANDRES, O.; SHAH, N. C.; ZHAO, J.; VAN-DUYNE, R. P. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials**, v. 7, n. 6, p. 442-453, 2008.

ATIEH, M. A.; BAKATHER, o. Y.; AL-TAWBINI, B.; BUKHARI, A. A.; ABUILAIWI, F. A.; FETTOUHI, B. Effect of Carboxylic Functional Group Functionalized on Carbon Nanotubes Surface on the Removal of Lead from Water. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2010, 9 p., 2010.

BANTZ, C. K.; MEYER, A. F.; WITTENBERGB, N. J.; IMB, H.; KURTULUŞA, O.; LEEC, S. H.; LINDQUISTB, N. C.; OHB, S. H.; HAYNES, C. L. Recent Progress in SERS Biosensing. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 24, p. 11551-11567, 2011.

CHIANG, I. W.; BRINSON, B. E.; SMALLEY, R. E.; MARGRAVE, J. L., HAUGE, R. H. Purification and characterization of single-wall carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, p. 1157-1167, 2001.

CHOUDHARY, V.; GUPTA, A. **Carbon nanotubes – Polymer Nanocomposites**. Rijeka: Siva Yellaampalli, 2011, 410 p.

GONG, K., YAN, Y., ZHANG, M., XIONG, S., MAO, L. Electrochemistry and eletroanalytical applications of carbon nanotubes: A review. **Analytical Sciences**, v. 21 p. 1383-1393, 2005.

HARRIS, P. J. F. **Carbon nanotubes and related structures-New materials for the twenty-first century**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, 279 p.

IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

JAIN, S.; KUMAR, S.; DAS, M.; SINGH, R. P.; DATIR, S.; CHAUHAN, D. S. Mathematical models for the oxidative functionalization of multiwalled carbon Nanotubes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 419, p.156-165, 2013.

JIA, H.; ZHU, G.; WANG, P. Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 406-414, 2003.

JOSHI, K. A.; PROUZA, M.; KUM, M.; WANG, J.; TANG, J.; HADDON, R.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. V-type nerve agent detection using a carbon nanotube-based amperometric enzyme electrode. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 331-336, 2006.

LEE, Y.; KWON, O.; YOON, Y.; RYU, K.; Immobilization of horseradish peroxidases on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 39-43, 2006.

LEE, J. Y.; SHIN, H. Y.; KANG, S. W.; PARK, C.; KIM, S. W. Improvement of electrical properties via glucose oxidase-immobilization by actively turning over glucose for an enzymebased biofuel cell modified with DNA-wrapped single walled nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2685–2688, 2010.

LESIAK, B.; STOBINSKI, L.; KOVER, L.; TOTH, J.; BINIAK, S.; TRYKOWSKI, G.; JUDE, J. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 501, p. 77-84, 2010.

LUO, H.; SHI, Z.; LI, N.; GU, Z.; ZHUANG, Q. Investigation of the electrochemical and eletrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotubes film on a glassy carbon electrode. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 915-920, 2001.

MANSOORI, G. A. **Principles of Nanotechnology: Molecular Based-Study of Condensed Matter in Small Systems**. Pasadena: World Scientific Pub Co Inc, 2005. 329 p.

MUBARAK, M. N.; WONG, J. R.; TAN, K. W.; SAHU, J. N.; ABDULLAH, E. C.; JAYAKUMAR, N. S.; GANESAN, P. Immobilization of cellulose enzyme on funcionalized multiwall carbon nanotubes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 124-131, 2014.

MUSSI, V.; BIALE, C.; VISENTIN, S.; BARBERO, N.; ROCCHIA, M.; VALBUSA, U. Raman analysis and mapping for the determination of COOH groups on oxidized single walled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 48, p. 3391-3398, 2010.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (NNI). Disponível em: <<http://www.nano.gov.br>>. Acesso em: 04/04/2017.

OLIVEIRA, S. F.; LUZ, J. M. R.; KASUYA, M. C. M.; JUNIOR, A. C. Enzymatic Extract Containing Lignin Peroxidase Immobilized on Carbon Nanotubes: Potential Biocatalyst in Dye Decolourization. **Saudi Journal of Biological Science**, 2016.

OSORIO, A. G.; SILVEIRA, I. C. L.; BUENO, V. L.; BERGMANN, C. P. H₂SO₄/HNO₃/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 2485-2489, 2008.

SHAH, A.; GUPTA, M. N. Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1784, p. 363-367, 2008.

SINHA, N.; YEOW, J.T.W. Carbon nanotubes for biomedical applications. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 4, n. 2, 2005.

TASIS, D.; TAGMATARCHIS, N.; BIANCO, A.; PRATO, M. Chemistry of carbon nanotubes. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 1105-1136, 2006.

VAZ, R. P.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.133, p. 127-135, 2016.

WANG, L.; WEI, L.; CHEN, Y.; JIANG, R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 57-63, 2010.

WILLNER, I.; YAN, Y. M.; WILLNER, B.; TEL-VERED, R. Integrated enzyme-based biofuel cells - a review. **Fuel Cells**, v. 1, p. 7-24, 2009.

Capítulo IV: *Screening* de diferentes suportes para imobilização

1. Introdução

A catálise enzimática têm sido aplicada em diversos setores industriais, como na produção de alimentos, energia, síntese de químicos e derivados, área cosmética e farmacêutica (RODRIGUES *et al.*, 2013; MATEO *et al.*, 2007). Em qualquer tipo de indústria, a busca por maior produtividade é imprescindível para cada etapa do processo produtivo, uma vez que ela é diretamente correlacionada aos custos globais. Portanto, há uma necessidade real, por parte das indústrias, de sistemas inovadores que proporcionem uma produção mais eficiente, que resulte em produtos de alta qualidade e com custo e consumo de tempo reduzido (ES *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a imobilização de enzimas é uma ferramenta com grande potencial que tem sido estudada e melhorada desde o século passado. Diversas técnicas de imobilização e tipos de suporte têm sido utilizadas, tanto em escala laboratorial, como em escala industrial (ES *et al.*, 2015). A imobilização enzimática permite a reutilização do catalisador e um melhor controle do processo, visto que a reação pode ser interrompida por simples filtragem, separando a enzima do meio de reação. Adicionalmente, ela pode melhorar as propriedades enzimáticas, como atividade, estabilidade, seletividade, e diminuir a inibição da enzima por produtos gerados pelo processo químico (RODRIGUES *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; MATEO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006).

No entanto, a imobilização também pode causar alterações negativas nas propriedades físicas e químicas da enzima, afetando sua estabilidade, propriedades cinéticas, além de ocasionar redução na difusão e transferência de massa entre enzima e substrato (RODRIGUES *et al.*, 2013; GUIBAN, 2006). Nesta perspectiva, podem-se delinear diversos protocolos de imobilização para diferentes enzimas, gerando catalisadores mais específicos para a reação desejada. De maneira simplificada, cada técnica de imobilização deve ser aplicada para uma produção específica, avaliando a relação custo vs benefício do processo global (SHANMUGAM *and* SATHISHKUMAR, 2009).

Existem diversas técnicas de imobilização, como a simples adsorção em suportes porosos, interações químicas fracas (troca iônica e interação

hidrofóbica), imobilização por ligação covalente unipontual ou multipontual, encapsulação, entre outras (GUISAN, 2006). Neste capítulo abordaremos as ligações covalentes multipontuais, ligações reversíveis e encapsulação, focos do presente estudo.

A imobilização por ligação covalente multipontual (Figura 13) é do tipo irreversível, com formação de ligações fortes e estáveis que impedem a recuperação da enzima. Elas empregam suportes do tipo glioxil agarose e ativados por glutaraldeído. A ligação ocorre entre as cadeias laterais dos aminoácidos da superfície exposta da enzima (grupos NH_2 das lisinas) e grupos funcionais presentes na superfície do suporte, gerando ligações do tipo amida. Essas reações precisam ocorrer em pH's extremamente básicos, acima dos pKas dos grupamentos envolvidos, condição que pode ser extrema para a atuação da enzima (GUISAN, 2006; GUISAN *et al.*, 1997; SRERE *and* UYEDA, 1976).

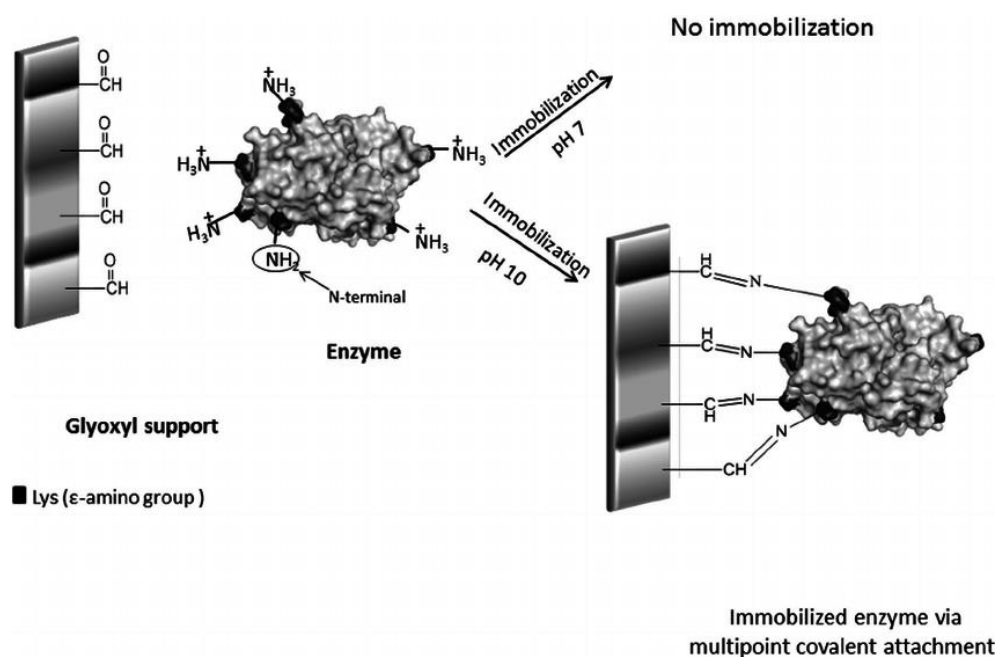


Figura 13 - Exemplo de imobilização covalente multipontual irreversível utilizando suporte glioxil agarose.
Fonte: BARBOSA *et al.*, 2015

A imobilização do tipo reversível (Figura 14) ocorre através do estabelecimento de ligações fracas entre enzima e suporte, de forma que a enzima pode ser recuperada por estratégias de dessorção. Nesse caso, a imobilização pode ocorrer por interação iônica (Figura 14 A), utilizando

suportes como o dietilaminoetil (DEAE), carboximetil (CM) e monoamino-N-aminoetil (MANAE); ou interação hidrofóbica (Figura 14 B), utilizando suportes do tipo butil, octil, fenil, etc (GUISAN, 2006; PALOMO *et al.*, 2002).

Na abordagem iônica a imobilização ocorre através de interações de cargas superficiais presentes na enzima e no suporte (GUISAN, 2006; PALOMO *et al.*, 2002). Quando utilizados suportes com carga global positiva, como o MANAE e DEAE, as reações devem ocorrer em pH's acima do ponto isoelétrico da enzima, de forma que a carga global da mesma torne-se negativa, proporcionando a interação com o suporte. Já para suportes que possuem carga global negativa, como por exemplo, o CM, as reações devem ocorrer em pH's abaixo do ponto isoelétrico da enzima, gerando cargas positivas em sua superfície que, então, irão interagir com o suporte.

As interações hidrofóbicas ocorrem através da adsorção de regiões expostas da enzima que contenham aminoácidos hidrofóbicos e regiões hidrofóbicas presentes no suporte (GUISAN, 2006; PALOMO *et al.*, 2002).

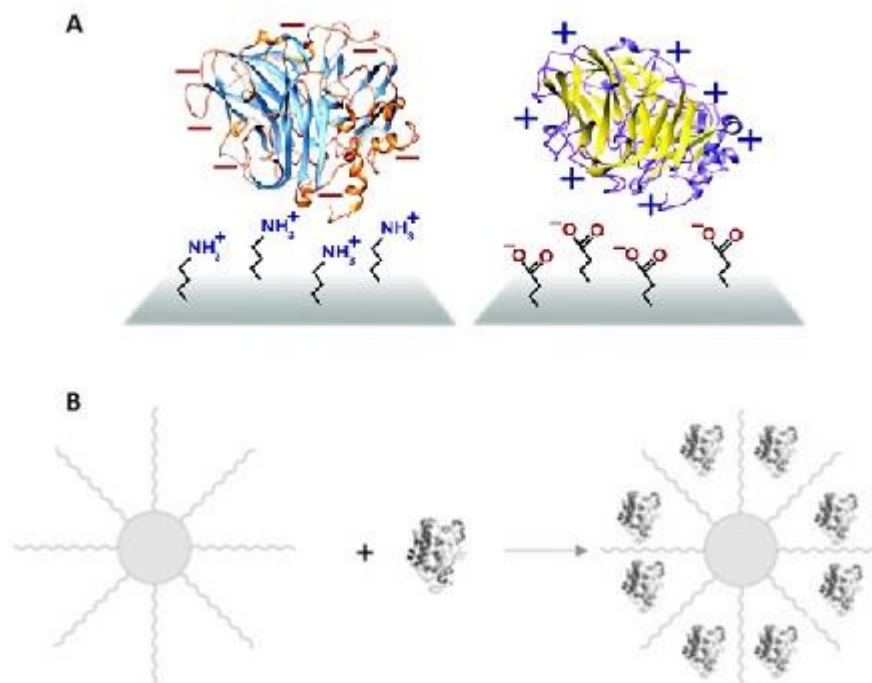


Figura 14 - Exemplos de imobilização reversível (A) Interação iônica e (B) Interação hidrofóbica.

Fonte: (A) PUTZBACH *and* RONKAINEN, 2013. (B) BASSO *et al.*, 2016.

A encapsulação (Figura 15) compreende o aprisionamento de enzimas em suportes (géis, polímeros, fibras) através de ligação covalente ou não covalente (VAZ *et al.*, 2016). É uma das técnicas de imobilização mais antigas e simples, podendo ser reversível ou não. O suporte mais amplamente utilizado para essa técnica é o alginato de cálcio (FRASER *and* BICKERSTAFF, 1997).



Figura 15 - Imobilização por encapsulação.
Fonte: Adaptado de SINGH *et al.*, 2013.

Entretanto, dentre as abordagens descritas, a imobilização do tipo reversível, mais especificadamente por interação iônica, têm sido proposta como a ferramenta de imobilização enzimática mais viável para aplicações industriais, uma vez que é uma alternativa tecnicamente simples, de baixo custo e alta eficiência (ES *et al.*, 2015; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, foi elaborado um capítulo de livro, já submetido e aceito para publicação, intitulado “*Ion exchange Chromatography for Enzyme Immobilization*”. O capítulo fará parte do livro “*Application of Ion Exchange Materials in Biomedical Industries*”, produzido pela Springer Nature Switzerland AG, e será publicado no ano de 2019. O capítulo aborda o uso da interação iônica como ferramenta de imobilização, apresenta as diversas resinas utilizadas para fins de imobilização, revisa as diferentes enzimas já imobilizadas por interação iônica, propõe variadas aplicações do uso dessa tecnologia na indústria, e, por fim, expõe perspectivas futuras para o ramo.

Metadata of the chapter that will be visualized in SpringerLink

Book Title	Applications of Ion Exchange Materials in Biomedical Industries	
Series Title		
Chapter Title	Ion Exchange Chromatography for Enzyme Immobilization	
Copyright Year	2019	
Copyright HolderName	Springer Nature Switzerland AG	
Author	Family Name	Vaz
	Particle	
	Given Name	Raissa Pieroni
	Prefix	
	Suffix	
	Role	
	Division	Department of Cell Biology
	Organization	University of Brasilia
	Address	70910-900, Brasilia, Distrito Federal, Brazil
	Email	
Corresponding Author	Family Name	Filho
	Particle	
	Given Name	Edivaldo Ximenes Ferreira
	Prefix	
	Suffix	
	Role	
	Division	Department of Cell Biology
	Organization	University of Brasilia
	Address	70910-900, Brasilia, Distrito Federal, Brazil
	Email	eximenes@unb.br
Abstract	<p>The use of ion exchange materials for separation and purification of proteins is a widely studied and applied tool since the twentieth century. Following the same basic principle of charge interactions, new applications for ion exchange materials have emerged in recent decades. Enzymatic immobilization technology is one of the most promising applications in terms of bioconversion processes. The main current demands of the biotechnology industries that use enzymatic catalysis in conversion processes are the increase in productivity and reduction of overall costs. These needs can be met mainly by optimizing the enzymatic properties provided by enzyme immobilization in several carrier/materials. Enzymatic immobilization in ion exchange materials is exceptionally simpler when compared to other immobilization methods. It basically involves electrostatic/ionic interactions of weak nature between protein and resin. These weak interactions generate minimal conformational changes, improving enzyme chemical and physical stabilities, and increases specificity, enzyme selectivity, and catalytic activities. All these advantages make this application more attractive to industry. However, much research and incentives are still needed to make this technology more robust, efficient and widespread in several industrial sectors. This chapter pays particular attention to ion exchange chromatography as a robust tool to improve enzyme immobilization.</p>	

Chapter 2

Ion Exchange Chromatography for Enzyme Immobilization



Raissa Pieroni Vaz and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Abstract The use of ion exchange materials for separation and purification of proteins is a widely studied and applied tool since the twentieth century. Following the same basic principle of charge interactions, new applications for ion exchange materials have emerged in recent decades. Enzymatic immobilization technology is one of the most promising applications in terms of bioconversion processes. The main current demands of the biotechnology industries that use enzymatic catalysis in conversion processes are the increase in productivity and reduction of overall costs. These needs can be met mainly by optimizing the enzymatic properties provided by enzyme immobilization in several carrier/materials. Enzymatic immobilization in ion exchange materials is exceptionally simpler when compared to other immobilization methods. It basically involves electrostatic/ionic interactions of weak nature between protein and resin. These weak interactions generate minimal conformational changes, improving enzyme chemical and physical stabilities, and increases specificity, enzyme selectivity, and catalytic activities. All these advantages make this application more attractive to industry. However, much research and incentives are still needed to make this technology more robust, efficient and widespread in several industrial sectors. This chapter pays particular attention to ion exchange chromatography as a robust tool to improve enzyme immobilization.

2.1 Introduction

The use of enzymes in chemical and biological processes goes back to the beginning of human history. Consciously or not, the Egyptians used enzymatic catalysis in bread, wines, and in the production of fermented products [1]. However, only during the last few decades, the wide applications of biocatalysts have been possible in the industry owing to the exponential growth of knowledge on both enzyme structure and mechanism of their action, along with the development of extraction, purification, and protein engineering techniques for enzymes [1, 2].

R. P. Vaz · E. X. F. Filho (✉)
Department of Cell Biology, University of Brasilia, 70910-900 Brasilia, Distrito Federal, Brazil
e-mail: eximenes@unb.br

© Springer Nature Switzerland AG 2019
Inamiddin (ed.), *Applications of Ion Exchange Materials in Biomedical Industries*,
https://doi.org/10.1007/978-3-030-06082-4_2

1

27 Enzymes are biocatalysts with the enormous potential for application in different
28 chemical and biological industries [3–5]. Their broad applications are attributed to
29 high selectivity and specificity, along with easy production [6].

30 However, these characteristics are possible only under mild environmental condi-
31 tions, whereas many industrial processes require extreme reaction environments
32 [4]. In addition, in most industries, productivity is vital for the overall process, both
33 economically and operationally. Therefore, recovery and recycling procedures are
34 essential for the use of enzymes in large-scale industrial processes [6–9].

35 In order to satisfy the current requirements of industrial-scale production with
36 higher productivity, enzymatic immobilization is one of the possible alternatives.
37 Enzymatic immobilization allows catalyst recovery and reuse, improve enzyme
38 chemical and physical stabilities, and increases specificity, enzyme selectivity, and
39 catalytic activities. It also provides easy product separation and an enhanced resis-
40 tance to inhibitory agents [3, 10–12].

41 Several immobilization approaches and different carriers have been developed at
42 laboratory scale as well as industrial scale. Despite the long history and advantages of
43 enzymatic immobilization, till 2002, only 20% of industrial processes were reported
44 to use immobilized enzymes [13]. It is estimated that a wide range of industries
45 including food, pharmaceutical, biomedical, textile, wastewater treatment, and bio-
46 fuel production industries are currently using this technology [3]. However, adequate
47 information on the industrial use of this technology is limited and difficult to obtain,
48 because it involves intellectual property and market competition.

49 For the application of immobilized biocatalysts in industry, it is essential to design
50 efficient, robust, and stable systems [14]. Among the possible approaches for enzy-
51 matic immobilization, physical absorption—ionic interaction, Van der Waals forces,
52 hydrophobic interactions, and hydrogen bonds [15]—are considered simple and cost-
53 effective for industrial use.

54 2.2 Enzyme Immobilization

55 Enzyme immobilization, by definition, is the confinement of the free/soluble enzyme
56 to a phase (matrix, carrier, support, or aggregate) different from its substrate or
57 product [6, 10, 16].

58 From a historical point of view, the first scientific article that reported enzyme
59 immobilization was published in 1916 [17]. This report demonstrated that the inver-
60 tase had the same catalytic activity as the free enzyme when it was adsorbed on
61 charcoal and aluminum hydroxide carriers.

62 It was not until 1967 that the first enzyme immobilization industrial application
63 was reported. In this case, immobilized aminoacylase on the solid support was used
64 for amino acid resolution [18]. Since then, immobilization technology has attracted
65 a great deal of attention, with the increase of publications and patents involving
66 immobilization of different enzymes from diverse carriers. Consequently, consider-
67 able advances have been observed in industrial applications of these systems [1].

Several advantages exist in the industrial application of enzyme immobilization. Among these advantages, include increased thermal stability, a wide working pH range, catalyst recovery and reuse, catalyst loss reduction, catalytic activity maintenance after repeated cycle use, easy enzyme and product separation from the reaction medium, inhibition reduction by substrate and by-products, and a possibility of reaction in non-aqueous media [2, 10, 19–21]. All of these advantages make global industrial processing more productive and cost-effective.

The choice of the immobilization approach is a key step in the design of effective and robust systems, which directly influence biocatalyst properties. Catalytic efficiency variations and limitations of mass transfer between the enzyme and the substrate were similar to carrier and immobilization technique properties [16].

2.2.1 Immobilization Approaches

Each industrial production process requires a specific operating condition for the desired product. Thus, the appropriate selection of immobilization approach is an extremely important step for overall yield, because it saves both time and money [22]. The immobilization approaches are classified as presented below.

(a) Encapsulation and entrapment

The encapsulation/entrapment approach encompasses encasing enzymes in support (gels, polymers, and fibers) by non-covalent or covalent bonding [23]. The most frequent approach involves the encapsulation of enzymes in sol–gel matrices [24].

(b) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) and cross-linked enzyme crystals (CLEC's)

Cross-linking is an approach that combines entrapment and covalent attachment (Taylor and Schultz 1996). For this immobilization approach, binding agents (such as glutaraldehyde) are required, which promote binding between enzymes in order to create aggregates [25, 26].

There are two different cross-linking approaches: CLECs and CLEAs. CLECs are highly active, crystallized, and immobilized enzymes [1, 27], and CLEAs are aggregates produced by simple enzyme precipitation with the use of salts, water-miscible organic solvents, or nonionic polymers.

(c) Covalent bonding

Covalent bond immobilization is based on the covalent bond formation between biomolecules (enzymes) and carrier/matrices [28].

Normally, covalent bonds form directly between the enzyme's side chain amino acids enzyme (aspartic acid, histidine, and arginine) and the carrier. However, specific changes can be made to the carrier surface [8].

(d) Adsorption

Adsorption is a non-covalent immobilization method that uses physical interactions between carriers and enzymes [29]. These interactions may be Van

108 der Waals forces, ionic, hydrophobic, or hydrogen bond interactions [30]. In a
109 simplified manner, this approach involves passive adsorption on hydrophobic
110 surfaces and/or electrostatic interactions on charged surfaces [1]. Adsorption
111 is the most common approach in the industry [31], because it does not require
112 additional binding agents or enzyme modification reagents, allows carrier and
113 biocatalyst reuse, and is reversible [1]. In addition, because the physical bond
114 is usually weak, this technique does not alter the native enzyme structure and
115 avoids enzyme active sites disturbances, allows for enzyme activity retention
116 [32]. Owing to all these properties, adsorption is an efficient, simple, and cost-
117 effective approach [3, 10].

118 However, the weak-binding nature also disadvantageous because of enzymes
119 losing interaction from their appropriate carriers under industrial conditions of
120 high reagent/product concentrations as well as under the conditions of high ionic
121 strength, which leads to activity loss [24]. Moreover, this process also suffers
122 from the lacking of adsorbed enzyme density control, resulting in activity loss
123 by agglomeration. Therefore, overall system strength is affected [1].

124 2.3 Ion Exchange as an Immobilization Tool

125 Immobilization by ionic/electrostatic interactions is an adsorption immobilization
126 approach that follows the same principles as ion exchange chromatography [33].
127 The charged groups on the protein surface interact with opposite charges on the ion
128 exchange resin (Fig. 2.1). The overall protein load depends directly on the medium
129 pH (operational pH). The pH whose global protein charge is equal to zero is termed
130 the isoelectric point. When operational pH is greater than the protein's isoelectric
131 point, it will exhibit a negative net charge and will interact with positively charged
132 exchange media. When the operational pH is lower than the protein's isoelectric
133 point, it will retain a positive net charge and therefore will interact with negative
134 exchange agents [34].

135 Thus, it is possible to use cationic and anionic media and resins for enzyme
136 separation and immobilization based on their net surface charge. Owing to differing
137 charge properties, molecules vary considerably and exhibit differential interaction
138 with chromatography media [34–37].

139 Ion exchange methodology is one of the oldest approaches in enzymatic immobi-
140 lization that is simple, fast, and cost-effective. It consists of the enzyme and carrier
141 mixture in conditions that favor adsorption, with rigorous pH and ionic strength
142 control [38, 39].

143 Enzyme immobilization through ion exchange is a multistep process, where the
144 enzyme is attached only to the carrier when the differential charge interactions are
145 high enough to compensate the medium's ionic strength [40, 41]. Because adsorption
146 involves weak interactions, the effects of immobilization on enzyme conformational
147 structure tend to be less drastic, promoting high catalytic activities [3, 42, 43]. How-
148 ever, owing to weak interactions, enzyme retention becomes a problem, because

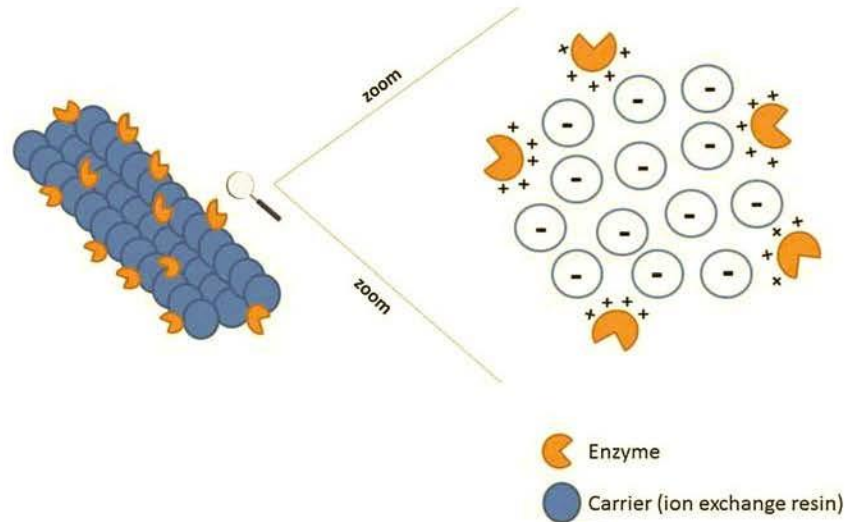


Fig. 2.1 Enzyme immobilization by ion exchange

149 small changes in the medium's pH or ionic strength can culminate in the desorp-
 150 tion and subsequent loss of enzymes [44]. This problem can be minimized using
 151 cross-linking agents, such as glutaraldehyde [45]. After adsorption, these agents
 152 allow system stabilization by forming stable and strong covalent bonds [43, 44, 46].
 153 Another possible solution to increase the adsorption strength is the use of polymer-
 154 coated carriers. Polymers increase the load-bearing capacity using a flexible and
 155 adaptable bed for the enzyme. This allows the adsorption of the larger part of the
 156 protein surface by increasing the contact surface [37].

157 Another intrinsic advantage of the ion exchange immobilization approach is carrier
 158 reuse after enzyme inactivation. This is possible by changing the pH or ionic
 159 strength of the medium, which provides the removal of the enzyme and the reuse of
 160 unmodified free carrier [37].

161 There are several reports related to the use of ion exchange resins as immo-
 162 bilization carriers, mainly in the food industry [43, 47]. These carriers are inex-
 163 pensive, commercially abundant, mechanically strong, chemically stable, non-toxic,
 164 non-polluting, and can be easily regenerated after use [43, 46]. Ion exchange resins
 165 also have the adequate density for column compacting or batch suspension, fed-batch,
 166 fluidized bed, or continuous stirred tank reactor [48].

167 Several types of resins have been examined for enzymatic immobilization, such as
 168 diethylaminoethyl cellulose (DEAE-C), Amberlite IRA-94, Amberlite IRC-50, Q-
 169 Sepharose, carboxymethyl cellulose-cellulose (CMC), DOWEX, and various other
 170 resins [33]. These resins have great potential for application because of their high ion-
 171 exchange capacity and a long history of use in industry as well as in the laboratory,
 172 especially in chromatography columns for protein separation and purification [49].

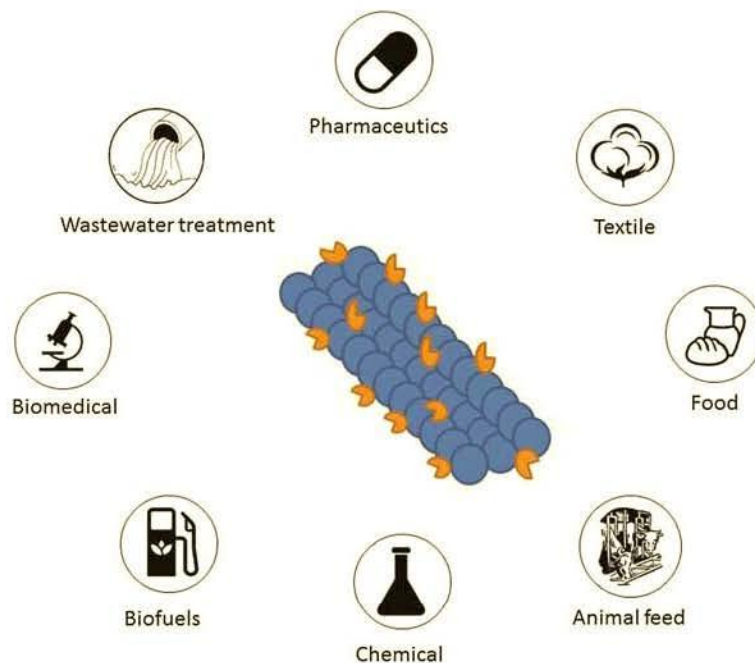


Fig. 2.2 Immobilization of enzymes by ion exchange and their potential biotechnological applications

173 Therefore, ion exchange resins have been widely investigated as carriers for enzyme
174 immobilization and for application in various industries (Fig. 2.2).

175 Many studies are available on the use of immobilized enzymes in ion exchange
176 resins for various industrial applications. Among the different applications proposed,
177 the use of immobilization in the food industry has attracted attention. The most suc-
178 cessful and valuable studies include glucose isomerase immobilization in DEAE-
179 cellulose for glucose and fructose isomerization [48], and (β)-galactosidase immo-
180 bilization in the Duolite A568 resin for lactose hydrolysis in lactose-free products
181 [47].

182 2.4 Enzyme Immobilization Research and Application 183 by Ion Exchange in the Laboratory and Industry

184 Ion exchange chromatography is a useful tool for simultaneous protein purification
185 and immobilization processes [50]. Because ion exchange chromatography has oper-
186 ational and economic advantages compared to other similar techniques, it has been
187 extensively studied for industrial application. Table 2.1 summarizes examples of

188 enzymes that have been immobilized, ion exchange resins/carriers applied, and the
189 type of application suggested/employed. ACQ4

190 *Applications in the food industry*

191 Enzyme immobilization has been extensively studied and applied in the food indus-
192 try, mainly in starch and fruit processing, cheese making and food preservation, etc.
193 This technique has been widely implemented because it increases yield and decreases
194 the overall cost of processing [10]. (α)-Amylase is an important industrial enzyme
195 for industrial starch processing. Gupta et al. [43] immobilized this enzyme on an ion
196 exchange resin and observed an increase in stability and a decrease in starch lique-
197 faction time after immobilization. Thus, the authors concluded that immobilization
198 could be a useful tool to optimize carbohydrate's processing stages for commercial
199 use.

200 Demir et al. [60] carried out a study utilizing pectinolytic enzyme immobiliza-
201 tion for the use in vegetable and fruit processing. The objective of this study was
202 to improve the clarification performance, along with milling and liquefaction steps
203 for puree, pulp, and juice preparation. These authors immobilized a commercial
204 pectinase (Pectinex Ultra SP-L) on an anion-exchange resin, performed carrot puree
205 hydrolysis assays with a free and immobilized enzyme, and analyzed viscosity reduction.
206 The immobilized enzyme showed a higher efficiency in the reduction of puree
207 viscosity, presenting a 17.7% increase in carrot juice yield when compared to the
208 free enzyme. In addition, this study used the immobilized enzyme five times in puree
209 processing with only a 6.5% activity loss. Also, the conclusions of this study found
210 that pectinase immobilization might have great potential for carrot puree processing
211 to obtain high yields of juice.

212 In another study, Gürdaş et al. [61] immobilized an *Aspergillus oryzae* β -
213 galactosidase on an anionic resin, Duolite A568, for application in lactose hydroly-
214 sis of milk and milk-derived products. As a result, the aim of this study was to
215 develop lactose-free products. This study demonstrated that both free and immo-
216 bilized enzymes exhibited maximum activity at 65 °C. However, the immobilized
217 enzyme was significantly more active at all temperatures compared to its free coun-
218 terpart. During lactose hydrolysis assay, in the packed bed reactor, the immobilized
219 enzyme showed 50% conversion within 60 s that is better performance compared to
220 other findings in the literature for immobilized β -galactosidases using other carri-
221 ers. After a reaction of 8 h, the immobilized enzyme had a 21% activity retention.
222 This activity retention percentage demonstrates an economic advantage for future
223 industrial applications.

224 *Applications in pharmaceutical/biomedical/chemical industries*

225 Enzyme immobilization can be useful for pharmaceutical, biomedical, and chemical
226 industries, especially in relation to biotechnological applications [10]. More prof-
227 itable, sensitive, and robust production systems are some of the main advantages in
228 favor of using enzyme immobilization in these industries.

229 In 1982, Kiba et al. [62] developed a thermal flow system for the determination
230 of glucose using glucose oxidase immobilized on Amberlite CGSO cationic resin.

Table 2.1 Immobilization of distinct enzymes in different carriers and their industrial applications

Enzyme	Support material	Suggested application	References
Invertase (β -D-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26)	DOWEX-1X8-50 [®] (anionic resin)	Analytical chemistry (biosensors) and in confectionery	[33]
Lipase (EC 3.1.1.3)	D152H (cation-exchange resin)	Food, detergent, cosmetic, organic synthesis, and pharmaceutical industries	[51]
β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)	Duolite A568 (anion-exchange resin)	Food industry (hydrolysis of lactose for the development of new products with no lactose in their composition)	[47]
β -Xylosidase (EC 3.2.1.37)	DEAE-Sepharose, Polyethyleneimine (PEI)-Sepharose, Q-Sepharose, CM-Sepharose, Sulfopropil-Sepharose, and MANAE-agarose	Xylooligosaccharides production (act as prebiotics and have many applications in food industry)	[52]
Epoxide hydrolase (EC 3.3.2.3)	DEAE-cellulose (anion-exchange resin)	Resolution of various racemic epoxides (organic synthesis)	[53]
Glucose isomerase (EC 5.3.1.5)	DEAE-cellulose (anion-exchange resin)	Food-processing industry to produce a sugar mixture	[54]
Urease enzyme (urea aminohydrolase, EC 3.5.1.5)	DOWEX [®] (anion-exchange resin)	Medical, pharmaceutical and chemical industries (hemodialysis membranes, enzymatic bioelectrochemical device, urea biosensors, quantization of cadmium and mercury) via its property as non-competitive inhibitor	[55]
Nuclease p1 (EC 3.1.30.1)	DEAE-cellulose (anion-exchange resin)	Food processing and the pharmaceutical industry	[56]

(continued)

Table 2.1 (continued)

Enzyme	Support material	Suggested application	References
Alkaline proteases (EC 3.4.21.14)	Dowex MWA-1 (anion-exchange resin)	Food, pharmaceutical, leather, and detergent industry	[57]
β -Galactosidases and lipases	DEAE/MANAE	Food, detergent, cosmetic, organic synthesis, and pharmaceutical industries	[37]
Cellulase (EC 3.2.1.4)	DEAE-Macrosorb (adsorption)	Food, textile, chemical industries (cellulose and lignocellulose hydrolysis)	[58]
α -Galactosidase (3.2.1.22)	MANAE-agarose, CM-agarose, and DEAE-agarose	Food industry (elimination of α -galactose oligosaccharides from soybean milk and elimination of raffinose in sugar beet industry)	[59]

231 These sensors were applied to detect glucose in mixtures containing mannose, xylose,
 232 fructose, and galactose. The authors observed a linear glucose detection response in
 233 a range of 0.01–0.4 mM (mM), confirming system efficiency. In addition, enzymes,
 234 when immobilized, provided sensor reuse because when the free enzyme was used,
 235 it was difficult to separate the biocatalyst from the reaction environment. This study
 236 suggested the application of these systems for effective glucose detection in biomedical,
 237 pharmaceutical, and chemical industries.

238 A continuous process for the production of lactulose, a prebiotic used by the
 239 pharmaceutical industry, was developed by a group of researchers [63], using β -
 240 glucosidase immobilized on the anionic resin Amberlite IRA-93. The enzymatic
 241 immobilization yield was 72%. Hydrolysis of the synthetic substrate using free and
 242 immobilized enzymes demonstrated that the immobilized enzyme had a higher lactu-
 243 lose yield than the free enzyme, with values of 41 and 43%, respectively. In addition,
 244 the immobilized enzyme showed 100% stability for up to 14 days, whereas the free
 245 enzyme reached its half-life in only 1.5 days. Authors concluded that this system,
 246 although efficient, is highly stable, with great potential for industrial application [63].

247 Takimoto et al. [64] have developed a cephalosporin-C deacetylase immobiliza-
 248 tion method using an anion-exchange resin KA-890 for antibiotic production process
 249 optimization. The immobilized enzyme's activity yield was 55% for the free enzyme.
 250 The immobilized enzyme had a higher pH stability range (pH 5–10) compared to
 251 the free enzyme. Conversion tests of diacetyl 7-aminocephalosporanic acid for 7-
 252 aminocephalosporanic acid were also performed using an immobilized enzyme. The
 253 proposed system exhibited only a minor initial activity, even after fifty-two cycles

254 over seventy days. Therefore, the system proves to be suitable for the production of
255 cephalosporin-type antibiotics.

256 *Other industrial applications*

257 Tannases are enzymes that catalyze the hydrolysis of ester and depsidic bonds in
258 phenolic compounds. These enzymes are used as food additives, in wine production,
259 waste treatment [65], and propyl gallate synthesis [66].

260 Gonçalves et al. [67] conducted a study comparing two immobilization
261 approaches: adsorption via ionic and covalent bonding. The authors immobilized
262 an extracellular tannase from *Emericella nidulans* on ion exchange resins (DEAE-
263 Sepharose and Q-Sepharose), as well as on covalent carriers. The authors then com-
264 pared the stability of the derivatives. Ion exchange resins produced derivatives which
265 were more thermally stable than derivatives produced by covalent bonding, which
266 had thermal stability temperature between 60 and 75 °C, with a half-time of 24 h
267 at 80 °C and at a pH of 5.0. In addition, the derivatives of DEAE-Sepharose and
268 Q-Sepharose were stable with the potent inhibitor: 1-propanol, whereas enzymes
269 immobilized by covalent bonding were strongly inhibited by 1-propanol. Immobi-
270 lized enzyme hyper-tolerance encouraged experiments for propyl gallate production
271 of propyl gallate. Gallic acid's conversion rate compared to propyl gallate (using a Q-
272 Sepharose derivative) was 88% higher than that observed when using a free enzyme.
273 Finally, the authors concluded that ion exchange resins were a stable support for
274 tannase immobilization and industrial application.

275 Biofuel production is another potential field for the application of immobilized
276 enzymes. The demand for energy is exponentially increasing around the world, and
277 with the shortage of fossil fuels, research is focused on alternative energy sources
278 [10]. In this case, immobilization reduces the global costs by increasing the conver-
279 sion process.

280 Li et al. [68] used immobilized *Rhizopus oryzae* lipases to produce biodiesel from
281 the enzymatic transesterification of *Pistacia chinensis bge* seed oil with methanol.
282 The enzymes were immobilized on macroporous resin (MI-ROL) as well as on an
283 anion-exchange resin (AI-ROL). Using both derivatives the biodiesel yields were
284 high (92% for MI-ROL and 94% for AI-ROL). However, after five transesterifica-
285 tion reaction cycles, using AI-ROL, the biodiesel yield was not significantly reduced,
286 whereas the biodiesel yield remained around 60% after four cycles of MI-ROL. Thus,
287 the nonionic resin (MI-ROL) had more efficient biodiesel yield in the first cycle,
288 whereas the anionic resin (AI-ROL) showed more stability for biodiesel produc-
289 tion using transesterification. Therefore, anion-exchange resin is more suitable for
290 commercial application.

291 **2.5 Conclusion and Future Prospects**

292 Enzymatic immobilization, with its inherent advantages, has attracted a great deal
293 of interest from the industrial sector. However, for wide application of this technol-

294 ogy, large-scale expansion of enzyme immobilization is required, while maintaining
295 process robustness and efficiency [14]. Currently, several studies are available on
296 the use of immobilization at laboratory scale. However, studies related to the use
297 of immobilization on an industrial scale are limited. Because of this, research and
298 incentives for university-industry partnership are necessary for focusing on the wide
299 application of new technologies.

300 Over decades, enzyme immobilization methods have been proposed. However, a
301 universal immobilization approach does not exist. The immobilization methods vary
302 according to the specific enzyme used, carrier employed, reactor type, and target
303 goal [18]. The main obstacle for enzymatic immobilization is not the selection of
304 carrier, but rather the design of the most appropriate methodology for each specific
305 case [69].

306 Guidelines are lacking for standardized immobilization approaches. As a result,
307 immobilization approaches are randomly chosen. This has been replaced by tech-
308 niques that rationalize classical methods using the three-dimensional structure of the
309 protein and unique properties of carriers [70]. Recent advances in directed (or ori-
310 ented) immobilization result in system optimization, providing greater activity and
311 enzymatic stability, and consequently more efficient productivity [18].

312 Directed immobilization involves the selection of interaction points between an
313 enzyme and a carrier, based on their detailed structures. The immobilized enzyme
314 properties depend on the immobilization conditions, along with both the carrier and
315 the enzyme's nature [18]. In this context, *in silico* analysis has become a power-
316 ful tool to predict regions involved in adsorption [70]. This analysis may help to
317 establish the best immobilization conditions, along with assisting in understanding
318 post-immobilization enzyme behavior.

319 In ion exchange immobilization, it is possible to predict the charged regions
320 and the density of the charges on an enzyme and a carrier, in order to guide the
321 immobilization process. In this approach, the adsorbed enzyme density depends on
322 the size of the protein, carrier volume and surface area, the pore size, and the available
323 sites for enzyme adsorption [70]. All of these factors can be predicted by *in silico*
324 analysis and spectroscopic, biophysical, and microscopic analyses, such as circular
325 dichroism, fluorescence confocal microscopy, zeta potential measurement, among
326 others. In addition, an *in the silico* model can be designed to measure immobilization
327 efficiency probability even before the start of the process. This would help to select
328 the most appropriate approach for the intended purpose [39].

329 Another important challenge of immobilization technology is the development of
330 customized carriers, with specific physical and chemical properties that can be used
331 in different reactors [70]. The development of optimized and adaptable devices for
332 different reactors and various stages of industrial processes will provide a wide appli-
333 cation of immobilized enzymes in a range of industries—pharmaceutical, biomed-
334 ical, food, textile, etc. [14]. In addition, the combination of different immobilization
335 approaches in a single system can provide several benefits, such as efficient enzyme
336 loading and effective activity retention [70].

337 The research activities on multi-enzymatic and co-immobilized systems [71] are
338 growing exponentially. These systems generate multi-enzymatic reactions by enzy-

339 matic cascade processes and individual biocatalyst compartmentalization [2]. As a
340 result, more productive and profitable processes were developed.

341 In a more optimistic scenario, information from protein sequences, three-
342 dimensional structures, carrier and enzyme properties, interaction mechanisms, and
343 the reaction environment should be matched with the available immobilization
344 approaches to create systems optimized for various industrial applications [18]. As
345 enzyme immobilization methods improve and become more and more widespread,
346 this technology is hoped to become a reality in industries around the world.

347 References

- 348 1. Homaei AA, Sairi R, Vianello F, Stevanato R (2013) Enzyme immobilization: an update. *J*
349 *Chem Biol* 6:185–205
- 350 2. Sheldon RA (2007) Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synth*
351 *Catal* 49:1289–1307
- 352 3. Hettiarachchy NS, Feliz DJ, Edwards JS, Horax R (2018) The use of immobilized enzymes
353 to improve functionality. In: Richey YY (ed) *Proteins in food processing*, 2nd edn. Woodhead
354 Pub, Duxford p, pp 569–597
- 355 4. Moehlenbrock MJ, Minteer SD (2017) In: Minteer S (ed) *Introduction to the field of enzyme*
356 *immobilization and stabilization*. Humana Press, New York p, pp 1–7
- 357 5. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001) Industrial biocatal-
358 ysis today and tomorrow. *Nature* 209:258–268
- 359 6. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS (2013) Enzyme immobilization: an overview on tech-
360 niques and support materials. *Biotech* 3:1–9
- 361 7. Iyer PV, Ananthanarayan L (2008) Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-
362 aqueous environment. *Process Biochem* 10:101910–101932
- 363 8. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007)
364 Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.
365 *Enzyme Microb Technol* 40:1451–1463
- 366 9. Leresche JE, Meyer HP (2006) Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some
367 thoughts of a chemist and a biotechnologist. *Org Process Res Dev* 10:572–580
- 368 10. Es I, Vieira JDG, Amaral AC (2015) Principles, techniques, and applications of biocatalyst
369 immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2065–2082
- 370 11. Wang L, Wei L, Chen Y, Jiang R (2010) Specific and reversible immobilization of NADH
371 oxidase on functionalized carbon nanotubes. *J Biotechnol* 150:57–63
- 372 12. Kim JB, Grate JW, Wang P (2006) Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci*
373 61:1017–1026
- 374 13. Straaathof AJJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransfor-
375 mation. *Curr Opin Biotechnol* 13:548–556
- 376 14. Vaz RP, Moreira LRS, Filho EXF (2016) An overview of holoocelulase-degrading enzyme
377 immobilization for use in bioethanol production. *J Mol Catal B Enzym* 133:127–135
- 378 15. Ligler FS, Taitt CR (2008) *Optical biosensors: today and tomorrow*. Elsevier, Amsterdam
- 379 16. Khan AA, Alzohairy MA (2010) Recent advances and applications of immobilize enzymes
380 technologies: a review. *RJBSI* 10:564–575
- 381 17. Gomes-Ruffi CR, Henrique R, Chang YK, Steel JK (2012) Effect of the emulsifier sodium
382 steraoyl lactylate and of the enzyme maltogenic amylose on the quality of pan bread during
383 storage. *LWT-Food Sci Technol* 49:96–101
- 384 18. Singh RK, Tiwari MK, Singh R, Lee J (2013) From protein engineering to immobilization:
385 promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int J Mol Sci* 14:1232–1277

- 386 19. Liese A, Hilterhaus L (2013) Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications.
387 Chem Soc Rev 42:6236–6249
- 388 20. Gray CJ, Weissenborn MJ, Evers CE, Plitsch SL (2013) Enzymatic reactions on immobilized
389 substrates. Chem Soc Rev 42:6378–6405
- 390 21. DiCosimo R, McAuliffe J, Poulou AJ, Bohlmann G (2013) Industrial use of immobilized
391 enzymes. Chem Soc Rev 42:6437–6474
- 392 22. Cho GH, Cha YC, Yang DC, Moon HH (1981) Continuous ethanol production by immobilized
393 yeast in a fluidized reactor. Biotechnol Lett 11:667–671
- 394 23. Singh BD (ed) (2009) Biotechnology expanding horizons. Kalyani Pub, Delhi
- 395 24. Sheldon RA (2007) Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Adv Synth
396 Catal 49:1289–1307
- 397 25. Arora DK (ed) (2003) Handbook of fungal biotechnology. CRC Press, Delhi
- 398 26. Panesar PS, Marwaha SS, Chopra HK (eds) (2010) Enzymes in food processing: fundamentals
399 and potential applications. I K International Pvt Ltd, Delhi
- 400 27. Ayala M, Horjales E, Pickard MA, Vazquez-Duhault R (2002) Cross-linked crystals of
401 chloroperoxidase. Biochem Biophys Res Commun 295:828–831
- 402 28. Kök FN, Bozoglul F, Hasirci V (2001) Immobilization of acetylcholinesterase and choline oxi-
403 dase in/on pHEMA membrane for biosensor construction. J Biomater Sci Polym 11:1161–1176
- 404 29. Hwang ET, Gu MB (2013) Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. Eng
405 Life Sci 13:49–61
- 406 30. Taitt CR, Shriver-Lake LC, Anderson GP, Ligler FS (2011) Surface modification and
407 biomolecule immobilization on polymer spheres for biosensing applications. Methods Mol
408 Biol 726:77–94
- 409 31. Cao L (ed) (2006) Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design.
410 John Wiley and Sons Inc, Weinheim
- 411 32. Hernandez K, R (2011) Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-
412 directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. Enzyme Microb Technol
413 48:107–122
- 414 33. Ribeiro RR, Vitolo M (2005) Anion exchange resin as support for invertase immobilization. J
415 Basic App Pharm Sci 26:175–179
- 416 34. Williams A, Frasca V (2001) Ion-exchange chromatography. In: Coligan JE (ed) Current pro-
417 tocols in protein science. John Wiley and Sons Inc, Weinheim
- 418 35. Fan J, Luo J, Wan Y (2017) Membrane chromatography for fast enzyme purification, immo-
419 bilization and catalysis: a renewable biocatalytic membrane. J Memb Sci 538:68–76
- 420 36. Rao CS (2001) Purification of large proteins using ion-exchange membranes. Process Biochem
421 37:247–256
- 422 37. Fuentes M, Pessela BCC, Maquiese JV, Ortiz C, Segura RL, Palomo JM, Abian O, Torres
423 R, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM (2004) Reversible and strong immobiliza-
424 tion of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. Biotechnol Prog
425 20:1134–1139
- 426 38. Tomotani EJ, Vitolo M (2006) Method for immobilizing invertase by adsorption on Dowex®
427 anionic exchange resin. Braz J Pharm Sci 42:245–249
- 428 39. Garcia-Galan C, Murcia AB, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC (2011) Potential of dif-
429 ferent enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. Adv Synth Catal
430 353:2885–2904
- 431 40. Tong XD, Dong XY, Sun Y (2002) Lysozyme adsorption and purification by expanded bed
432 chromatography with a small-sized dense adsorbent. Biochem Eng J 12:117–124
- 433 41. Lyddiatt A (2002) Process chromatography: current constraints and future options for the
434 adsorptive recovery of bioproducts. Curr Opin Biotechnol 13:95–103
- 435 42. Marquez LDS, Cabral BV, Freitas FF, Cardoso VL, Ribeiro EJ (2008) Optimization of invertase
436 immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. J Mol Catal B
437 Enzym 51:86–92
- 438 43. Gupta K, Jana AK, Kumar S, Maiti M (2013) Immobilization of α -amylase and amyloglu-
439 cosidase onto ion-exchange resin beads and hydrolysis of natural starch at high concentration.
440 Bioprocess Biosyst Eng 36:1715–1724

- 441 44. Kikani BA, Pandey S, Singh SP (2012) Immobilization of the α -amylase of *Bacillus amy-*
442 *loliouifaciens* TSWK1-1 for the improved biocatalytic properties and solvent tolerance. *Bio-*
443 *process Biosyst Eng* 36:567–577
- 444 45. Zaak H, Peirce S, Albuquerque TL, Sassi M, Fernandez-Lafuente R (2017) Exploiting the
445 versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to Immobilize β -galactosidase
446 from *Aspergillus oryzae*. *Catalysts* 7(250):1–14
- 447 46. Guidini CZ, Fischer J, Santana LNS, Cardoso VL, Ribeiro EJ (2010) Immobilization of
448 *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method
449 and cross-linking. *Biochem Eng J* 52:137–143
- 450 47. Guidini CZ, Fischer J, Resende MM, Cardoso VL, Ribeiro EJ (2011) β -galactosidase of
451 *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic-binding and
452 crosslinking methods: kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. *J Mol Catal B*
453 *Enzym* 71:139–145
- 454 48. Godfrey T, West S (eds) (1996) *Industrial enzymology*. Macmillan, New York
- 455 49. Li Y, Fan Y, Ma J (2001) Thermal, physical and chemical stability of porous polystyrene-type
456 beads with different degrees of crosslinking. *Polym Degrad Stab* 73:163–167
- 457 50. Albuquerque TL, Peirce S, Rueda N, Marzocchella A, Gonçalves LRB, Rocha MVB,
458 Fernandez-Lafuente R (2016) Ion exchange of β -galactosidase: the effect of the immobilization
459 pH on enzyme stability. *Process Biochem* 51:875–880
- 460 51. Yan Y, Zhang X, Chen D (2013) Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 im-
461 mobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids.
462 *Bioresour Technol* 131:179–187
- 463 52. Benassi VM, Silva TM, Pessela BC, Guisan JM, Mateo C, Lima MS, Jorge JA, Polizeli
464 MLTM (2013) Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glu-
465 cose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. *J Mol Catal B*
466 *Enzym* 89:93–101
- 467 53. Karboune S, Archelas A, Furstoss R, Baratti J (2005) Immobilization of epoxide hydrolase
468 from *Aspergillus niger* onto DEAE-cellulose: enzymatic properties and application for the
469 enantioselective resolution of a racemic epoxide. *J Mol Catal B Enzym* 32:175–183
- 470 54. Huitron C, Limon-Lason J (1978) Immobilization of glucose isomerase to ion-exchange mate-
471 rials. *Biotechnol Bioeng* 4:1377–1391
- 472 55. Al-Hakeim HK, Al-Shams JK, Kadhem MA (2012) Immobilization of Urease enzyme on
473 ion-exchange resin. *Pur Appl Sci* 20:1231–1236
- 474 56. Shi L, Yi Y, Tang Z, Xiong W, Mei J, Ying G (2010) Nuclease p1 immobilized on DEAE
475 cellulose. *Braz J Chem Eng* 27:31–39
- 476 57. Ohmiya K, Tanimura S, Kobayashi T, Shimizu (1978) Preparation and properties of proteases
477 immobilized on anion exchange resin with glutaraldehyde. *Biotechnol Bioeng* 1–15
- 478 58. Lee NE, Woodward J (1989) Kinetics of the adsorption of *Trichoderma reesei* C30 cellulase
479 to DEAE-Macrosorb. *J Biotechnol* 11:75–82
- 480 59. Filho M, Pessela BC, Mateo C, Carrascosa AV, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2008)
481 Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on poly-
482 meric ionic exchangers. *Process Biochem* 43:1142–1146
- 483 60. Demir N, Acar J, Sarioglu K, Mutlu M (2001) The use of commercial pectinase in fruit juice
484 industry. Part 3: immobilized pectinase for mash treatment. *J Food Eng* 47:275–280
- 485 61. Gürdaş S, Güleç HA, Mutlu M (2012) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase
486 onto Duolite A568 resin via simple adsorption mechanism. *Food Bioprocess Technol* 904–911
- 487 62. Kiba N, Ishida Y, Tsuchiya M, Furusawa M (1983) Use of an immobilized glucose oxidase
488 cation-exchange resin column in the determination of glucose. *Talanta* 30(3):187–189
- 489 63. Mayer J, Kranz B, Fischer L (2010) Continuous production of lactulose by immobilized ther-
490 mostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *J Biotech* 145:387–393
- 491 64. Takimoto A, Takakura T, Tani H, Yagi S, Mitsushima K (2004) Batch production of deacetyl
492 7-aminocephalosporanic acid by immobilized cephalosporin-C deacetylase. *Appl Microbiol*
493 *Biotechnol* 65:263–267

- 494 65. Aguilar CN, Gutiérrez-Sánchez G (2004) Review: sources, properties, applications and poten-
495 tial uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci Technol Int* 7:373–382
- 496 66. Lekha PK, Lonsane BK (1997) Production and application of tannin acyl hydrolase: state of
497 the art. *Adv Appl Microbiol* 44:215–260
- 498 67. Gonçalves HB, Jorge JA, Pessela BC, Lorente GF, Guisán JM, Guimarães LHS (2013) Char-
499 acterization of a tannase from *Emericela nidulans* immobilized on ionic and covalent supports
500 for propyl gallate synthesis. *Biotechnol Lett* 35:591–598
- 501 68. Li X, He X, Li Z, Wang Y, Wang C, Shi H, Wang F (2012) Enzymatic production of biodiesel
502 from *Pistacia chinensis bge* seed oil using immobilized lipase. *Fuel* 92:89–93
- 503 69. Cao L, Schmid RD (2005) Carrier-bound immobilized enzymes: principles. *Application and*
504 *Design*, Wiley-VCH, Weinheim
- 505 70. Torres-Salas P, Monte-Martinez A, Cutiño-Avila B, Rodriguez-Colinas B, Alcalde M, Balles-
506 teros AO, Plou JF (2011) Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding
507 enzymes to supports. *Adv Mater* 23:5275–5282
- 508 71. Zaak H, Kornecki JF, Siar E, Fernandez-Lopez L, Corberán VC, Sassi A, Fernandez-Lafuente
509 R (2017) Coimmobilization of enzymes in bilayers using PEI as a glue to reuse the most
510 stable enzyme: preventing PEI release during inactivated enzyme desorption. *Process Biochem*
511 61:95–110

2. Objetivos específicos

- Estabelecer protocolos de imobilização enzimática.
- Sintetizar suportes de imobilização.
- Realizar um *screening* de suportes, visando à seleção do melhor candidato.
- Imobilizar o extrato bruto de *A. terreus* e a pectinase parcialmente purificada (descritas no Capítulo II), analisando os perfis de imobilização (eficiência e rendimento da imobilização).

3. Metodologia

3.1. Amostras

Todos os experimentos de imobilização foram realizados utilizando o extrato bruto de *A. terreus* e a pectinase parcialmente purificada – PEC2 (Capítulo II). As amostras enzimáticas foram previamente dialisadas em água destilada para a remoção dos componentes químicos presentes no meio. Posteriormente, as amostras foram equilibradas com o tampão apropriado para cada abordagem de imobilização, numa concentração final de 10 mM.

Os suportes e abordagens de imobilização testadas foram: glioxil agarose (ligação covalente), CM e MANAE-agarose (interação iônica), e alginato de cálcio (encapsulação).

O suporte CM foi adquirido de fonte comercial (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Os suportes MANAE-agarose, glioxil agarose e alginato de cálcio foram sintetizados conforme descrito na próxima seção.

Parte dos experimentos foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, da Universidade de São Paulo (USP), sob a tutoria da Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Polizeli e da Dra. Ana Cláudia Vici.

3.2. Síntese do suporte glioxil agarose

O glioxil agarose é preparado a partir de um gel agarose (Sephacrose 4BCL -GE Healthcare, Uppsala, Sweden) ativado com grupos aldeído. A preparação é realizada em duas etapas: ativação do gel e oxidação a aldeídos.

- Ativação do gel: 105 g de agarose foram lavados em água, filtrados em filtro de vidro sinterizado, e foram adicionados 30 mL de água destilada. Acrescentou-se NaOH 1,7 N e 1,425 g de NaBH₄ à mistura, em banho de gelo. No passo seguinte, 36 mL de glicidol foram adicionados gota a gota para que não ocorresse aumento de temperatura. A amostra foi submetida à agitação *overnight* e, no dia seguinte, foi lavada em água destilada. No fim do processo obtém-se a agarose ativada com grupos dióis (VICI, 2015).
- Oxidação dos dióis: a amostra do gel ativado foi oxidada com auxílio de periodato de sódio (1 μmol de NaIO₄ oxida 1 μmol de -OH do gel). Adicionou-se 150 mL de NaIO₄ 100 mM aos 105 g de gel. A mistura foi ressuspendida em água destilada na proporção de 1:10, e agitada por 2 horas. Em seguida, o suporte foi lavado em água, filtrado e armazenado a 4°C (VICI, 2015).

3.3. Síntese do suporte MANAE-agarose

10 g de glioxil agarose foram adicionados a 140 mL de solução de etilenodiamina 2 M, pH 10. A solução foi mantida sob agitação suave por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 10 mg/mL de NaBH₄ e, novamente, a amostra ficou em agitação por 2 horas. Por fim, a amostra foi lavada em solução de NaCl (para eliminação do NaBH₄), depois em água destilada, e posteriormente foi armazenada para uso (VICI, 2015).

3.4. Imobilização das enzimas nos suportes CM, MANAE e glioxil agarose

Para a imobilização, 10 mL de extrato bruto de *A. terreus* e de pectinase parcialmente purificada (PEC2) foram adicionados em 1 g de cada suporte. Para a imobilização em glioxil agarose as enzimas foram equilibradas em

tampão bicarbonato de sódio 10 mM, pH 10. Já para a imobilização em CM e MANAE-agarose as enzimas foram equilibradas em tampão fosfato sódio 10 mM, pH 7 (VICI, 2015).

As misturas foram mantidas a 4°C, sob agitação suave. Periodicamente, foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante (com auxílio de um filtro de ponteira), as quais foram dosadas a atividade enzimática até estabilização da imobilização. Como controle, foi utilizado um branco com solução enzimática sem suporte para avaliação de possíveis perdas de atividade com o processo. Uma vez adsorvida à enzima, os suportes foram filtrados em funil de vidro sinterizado (porosidade de 16 a 40 microns), onde foram coletados os sobrenadantes e armazenados para posterior avaliação. Em seguida, os derivados (enzima+suporte) foram lavados abundantemente com água destilada e armazenados a 4°C para avaliação (VICI, 2015).

3.5. Imobilização em alginato de cálcio

Para a encapsulação em esferas de alginato foi preparada uma solução de alginato de sódio 2% (volume de 40 mL) em banho maria até solubilização completa. A solução foi resfriada a 40°C e, em seguida, foi adicionado 10 mL da enzima (extrato bruto de *A. terreus* ou pectinase parcialmente purificada). Uma solução de cloreto de cálcio 0,25 M foi armazenada em um béquer sob agitação, e a mistura de enzima e alginato de sódio foi gotejada na solução de cloreto, promovendo a formação de pequenas esferas de alginato de cálcio contendo as enzimas aprisionadas. A amostra foi lavada abundantemente em água corrente e armazenada a 4°C para posterior avaliação (VIET *et al.*, 2013).

3.6. Constatação da imobilização e cálculo das taxas de imobilização

Para a confirmação do processo imobilização, foram realizados ensaios de atividade enzimática, pelo método de DNS, no derivado (enzima+suporte), sobrenadantes coletados durante o processo de imobilização, e enzimas livres (controle da atividade inicial). Também foram realizados ensaios de quantificação de proteínas pelo método de Bradford, nos sobrenadantes.

O rendimento da imobilização foi calculado através da diferença entre a atividade enzimática da enzima livre (controle) e a atividade detectada nos sobrenadantes, considerando a atividade da enzima livre como 100%. O mesmo cálculo foi realizado utilizando a quantificação de proteínas. A atividade detectada no derivado (enzima+suporte) não pôde ser utilizada para o cálculo de rendimento, pois após o processo de imobilização a enzima pode apresentar perda ou ganho de atividade (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011), e esse fenômeno pode gerar sub ou superestimação dos resultados.

Adicionalmente, foram realizados géis de SDS-PAGE (metodologia descrita no Capítulo II) para análise do perfil de proteínas presente no sobrenadante da imobilização (enzimas não imobilizadas), objetivando a avaliação da eficiência do processo de imobilização. Não foi possível executar o mesmo com as amostras de enzimas imobilizadas, pois o suporte impediu a migração de proteínas durante a eletroforese.

Os derivados, que apresentaram maiores taxas de imobilização foram selecionados para posteriores testes de determinação do efeito do pH e temperatura, termoestabilidade, efeito de inibidores, experimentos de cinética enzimática, ensaios de hidrólise, e de aplicação industrial da enzima.

4. Resultados e discussão

4.1. Taxas de imobilização das enzimas nos suportes

A Tabela 4 apresenta as taxas de imobilização das enzimas nos suportes, evidenciando o rendimento da imobilização por atividade enzimática, por quantificação de proteínas, e a atividade enzimática por grama de suporte.

Tabela 4 - Taxa de imobilização da pectinase do extrato bruto e PEC2 em diferentes suportes e suas atividades enzimáticas após imobilização.

Fonte de enzima e suporte	Rendimento da imobilização por atividade enzimática* (%)	Rendimento da imobilização por quantificação de proteínas (%)	Atividade dos derivados* (UI/g derivado)
Extrato bruto			
CM	36	74	3,8
Glioxil	0	0	0
MANAE	66	72	7,3
Alginato	ND	ND	ND
PEC2			
CM	12	32	1,1
Glioxil	0	0	0
MANAE	98	100	4,5
Alginato	ND	ND	ND

* Triagem da enzima pectinase
 ND: não detectado

Primeiramente, observa-se que tanto para a pectinase do extrato bruto, quanto para PEC2 não foi detectada imobilização ao suporte glioxil agarose. A ausência de imobilização provavelmente ocorreu devido às condições de reação. Para a imobilização em glioxil agarose é necessário um alto pH (pH=11) e, possivelmente, as enzimas não resistiram ao ambiente extremo e perderam sua atividade catalítica. Também não detectada imobilização de enzimas ao suporte alginato de cálcio.

Analisando a amostra de pectinase do extrato bruto, consta-se que o suporte MANAE-agarose foi o que apresentou o maior rendimento de imobilização por atividade enzimática. Nesse caso, a abordagem de imobilização é a adsorção física, através de interações de cargas positivas presentes no MANAE e cargas negativas presentes na enzima. Sabe-se que a maioria das pectinases de *A. terreus* apresenta ponto isoelétrico entre 3,0 – 6,0 (SEMENOVA, *et al.*, 2003; MANZANARES *et al.*, 2000; KESTER *et al.*, 1994), de forma que em pH7, utilizado no experimento, ocorre a desprotonação dos grupamentos presentes nos aminoácidos, conferindo

uma carga global negativa para a enzima, e, conseqüentemente, proporcionando a imobilização ao suporte.

Também se observa que, para a amostra de extrato bruto, os rendimentos de imobilização por atividade enzimática e por quantificação de proteínas são ligeiramente diferentes. Nesse caso, foi detectado um maior rendimento por quantificação de proteínas, um resultado esperado, visto que foi utilizada uma mistura enzimática, e outras proteínas presentes no extrato bruto podem ter se imobilizado ao suporte.

Em relação à amostra PEC2 nota-se um alto rendimento de imobilização tanto por atividade enzimática, quanto por quantificação de proteínas. Nesse caso, os valores dos rendimentos são próximos, uma vez que a amostra está parcialmente purificada, e o conteúdo proteico é em grande parte composto pela enzima pectinase.

Verifica-se que o suporte CM também apresentou rendimentos de imobilização razoáveis, tanto para a pectinase do extrato bruto, quanto para PEC2; no entanto, sua eficiência de imobilização foi inferior a do suporte MANAE. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que em pH7 as pectinases, que possuem ponto isoelétrico entre 3,0 - 6,0, não apresentavam uma alta densidade de cargas positivas disponíveis para interação com as cargas negativas presentes no CM, culminando em baixos percentuais de imobilização. No entanto, foi detectada imobilização de enzimas, ainda que baixa, provavelmente devido à presença de outras isoformas de pectinases com pontos isoelétricos distintos, e pela possível formação de bolsões de cargas na superfície das enzimas.

Chauhan e colaboradores (2015) imobilizaram uma pectinase comercial por adsorção física no suporte celite e obtiveram um rendimento de imobilização de 43,18%. Oliveira e colaboradores (2018) realizaram um estudo de imobilização de uma pectinase de *A. aculeatus* em suporte de alginato e atingiram um rendimento de imobilização de 56,71%. Como demonstrado pela Tabela 5, os rendimentos de imobilização alcançados no presente estudo são superiores aos relatados na literatura, indicando que o MANAE é um potencial candidato para estudos mais detalhados.

Após a análise inicial das taxas de imobilização da pectinase do extrato bruto de *A. terreus*, foram realizados ensaios de atividade enzimática para

constatar se houve imobilização de outras enzimas presentes no extrato. A Tabela 5 apresenta os resultados de atividade enzimática de holocelulases obtidos a partir da amostra de extrato bruto não imobilizado (controle) e após imobilização.

Tabela 5 - Atividade de holocelulases do extrato bruto de *A. terreus* não imobilizado e do derivado (extrato bruto+suporte).

Amostra	CMCase (UI/mL)	Mananase (UI/mL)	Pectinase (UI/mL)	Xilanase (UI/mL)
Extrato bruto antes da imobilização	0,75 ± 0,006	0,24 ± 0,05	2,4 ± 0,12	2,3 ± 0,02
Derivado (extrato bruto + MANAE-agarose)	0,37 ± 0,06	0,09 ± 0,01	1,67 ± 0,04	0,23 ± 0,04

Observa-se que o derivado apresentou atividades de CMCase, mananase, xilanase e pectinase, sendo a última predominante, indicando a imobilização de todas essas enzimas ao suporte. Entretanto, observa-se uma diminuição significativa das atividades de CMCase, mananase, e xilanase após processo de imobilização. A redução de atividade dessas enzimas foi de 51, 62,5 e 90% respectivamente para CMCase, mananase e xilanase. A partir desses dados é possível supor duas hipóteses para as reduções de atividade observadas.

A primeira hipótese seria que as enzimas se ligaram ao suporte, mas perderam sua atividade catalítica após a imobilização. A literatura relata que durante o processo de ligação ocorrem novas interações entre a enzima e o suporte, e essas novas interações podem culminar na mudança da configuração do catalisador, gerando redução ou perda de atividade (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A segunda hipótese seria que o suporte MANAE-agarose estaria atuando como matriz de imobilização e purificação de enzimas, simultaneamente. Shah e Gupta (2008) relataram esse fenômeno quando realizaram um estudo de imobilização de uma preparação comercial de xilanase não purificada em nanotubos de carbono.

Para a confirmação desta hipótese foram realizadas análises do perfil de proteínas, através de experimentos de eletroforese em SDS-PAGE (Figura 16).

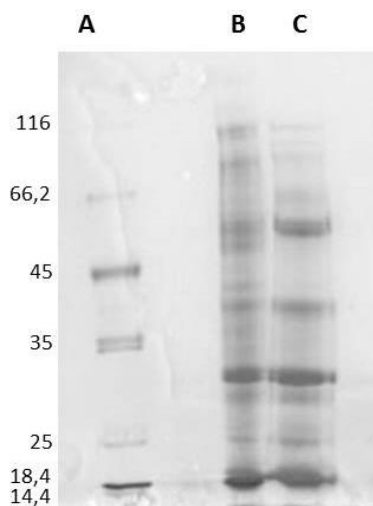


Figura 16 - Gel de eletroforese em condições desnaturantes. (A) Marcador de massa molecular, (B) Extrato bruto, (C) Sobrenadante da imobilização do extrato bruto em MANAE-agarose.

Após análise do perfil de proteínas é possível confirmar a hipótese de que o MANAE-agarose estaria atuando como suporte de imobilização e purificação de proteínas, uma vez que é possível notar um perfil abundante de bandas no sobrenadante da imobilização (Figura 16 C), que corresponde às proteínas não imobilizadas. De certo modo, a resina promove uma “limpeza” da amostra, proporcionando uma purificação parcial, com atividade predominante de pectinase, como corroborado pelo dados da Tabela 5.

Através da análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE também foi possível reafirmar a alta eficiência de imobilização de PEC2 ao MANAE-agarose, conforme apresentado pela Figura 17.

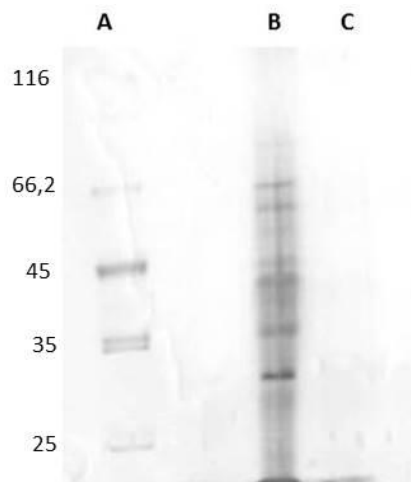


Figura 17 - Gel de eletroforese em condições desnaturantes. (A) Marcador de massa molecular, (B) PEC2, (C) Sobrenadante da imobilização PEC2 em MANAE.

Observa-se a ausência de bandas no sobrenadante da imobilização (Figura 17 C), indicando a ausência de proteínas. Dessa forma, pode-se afirmar que praticamente todas as proteínas presentes em PEC2 foram imobilizadas ao suporte, corroborando os altos rendimentos de imobilização apresentados na Tabela 4 (98 e 100%).

Considerando os resultados apresentados, o MANAE-agarose foi selecionado como suporte de imobilização para os experimentos de caracterização das enzimas livre e imobilizada, já que apresentou a melhor eficiência e rendimento de imobilização.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O *screening* de suportes e o estabelecimento de abordagens de ligação são uma importante etapa do processo de imobilização. Nesse capítulo foi possível concluir que o suporte MANAE-agarose mostrou-se um bom candidato para imobilização da pectinase. Embora o CM tenha alcançado consideráveis rendimentos de imobilização, o MANAE apresentou melhores resultados. Agregado a isso, o suporte MANAE pode ser facilmente sintetizado em laboratório, ao contrário do CM, um material comercial de alto custo.

O MANAE também atingiu rendimentos de imobilização superiores aos relatados em outros trabalhos descritos na literatura. Adicionalmente, esse

suporte mostrou uma capacidade de agir como agente de imobilização e purificação de enzimas, de maneira simultânea, agregando valor ao processo. Dessa forma, o MANAE-agarose foi eleito para os posteriores estudos de caracterização e aplicação da enzima imobilizada.

6. Referências

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 435-456, 2015.

BASSO, A.; HESSELER, M.; SERBAN, S. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. **Tetrahedron**, v. 72, n. 46, p. 7323-7328, 2016.

CHAUHAN, S.; VOHRA, A.; LAKHANPAL, A.; GUPTA, R.. Immobilization Of Commercial Pectinase (Polygalacturonase) On Celite And Its Application In Juice Clarification. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2015.

ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065-2082, 2015.

FRASER, J. E.; BICKERSTAFF, G. F. Entrapment in Calcium Alginate. In: **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press Inc, 1997. p. 61-66.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885- 2904, 2011.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. New Jersey: Humana Press, 2006. 449 p.

GUISAN, J. M.; POLO, E.; AGUADO, J.; ROMERO, M. D.; ALVARO, G.; GUERRA, M. J. Immobilization-stabilization of thermolysin onto activated agarose gels. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 15, n. 3, p. 159-173, 1997.

KESTER, H. C. M.; VISSER, J. Purification and characterization of pectin lyase B, a novel pectinolytic enzyme from *Aspergillus niger*. **Fems Microbiology Letters**, v. 120, p. 63-67, 1994.

KIM J. B.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.

MAZANARES, P.; OREJAS, M.; IBANEZ, E.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 198-202, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

OLIVEIRA, R. L.; DIAS, J. L.; SILVA, O. S.; PORTO, T. S. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9-18, 2018.

PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 775-783, 2002.

PUTZBACH, W. and RONKAINEN, N. J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: a Review. **Sensors**, v. 13, n. 4, p.4811-4840, 2013.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.

SEMENOVA, M. V.; GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V. Isolation and Properties of Pectinases from the Fungus *Aspergillus japonicas*. **Biochemistry**, v. 68, n. 5, p. 559-569, 2003.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, 363-367, 2008.

SHANMUGAM, S.; SATHISHKUMAR, T. **Enzyme technology**. New Dehli: I. K. International Publishing House Pvt, 2009. 110p.

SINGH, R. K.; TIWARI, M. K.; SINGH, R.; LEE, J. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, n.1, p. 1232-1277, 2013.

SRERE, P. A.; UYEDA, K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. **Methods in Enzymology**, v. 44, p. 11-19, 1976.

VAZ, R. P.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.133, p. 127-135, 2016.

VICI, A. C. **Clonagem, expressão e imobilização de uma lipase de *Beauveria bassiana* com aplicação em biocatálise**. 2015. 188 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIET, T. K.; MINH, N. P.; DAO, D. T. A. Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilized stability. **American Journal of Research Communication**, v. 1, n. 12, p. 254-267, 2013.

WANG, L.; WEI, L.; CHEN, Y.; JIANG, R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 57-63, 2010.

Capítulo V: Caracterização das enzimas livres e imobilizadas

1. Introdução

Após o *screening* de suportes, estabelecimento do protocolo de imobilização, e análise da eficiência e rendimento do método, é de suma importância a caracterização e comparação entre enzima livre e imobilizada. Essa etapa do estudo é determinante para a avaliação da aplicabilidade das enzimas imobilizadas na indústria.

Ainda que, na teoria, a imobilização possa promover inúmeras vantagens operacionais ao processo de biocatálise, é importante compreender que fatores como a abordagem de imobilização, química da enzima, natureza do suporte e tipo de aplicação podem interferir no comportamento apresentado pela enzima (RODRIGUES *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; MATEO *et al.*, 2007; GUIBAN, 2006; KIM *et al.*, 2006).

Nessa perspectiva, deve-se ter em mente que para cada produção específica deve-se avaliar a relação custo vs benefício do processo de imobilização (SHANMUGAM *and* SATHISHKUMAR, 2009). Se para determinada aplicação é imprescindível o controle das condições do meio (pH, temperatura, termoestabilidade), para outras este controle é irrelevante, sendo prioridade o aumento da produtividade (alta atividade catalítica e geração de produtos).

Dessa forma, é essencial traçar os objetivos prioritários para cada aplicação específica, analisando sempre a relação custo vs benefício que a imobilização pode proporcionar. Somente dessa maneira a aplicação de enzimas imobilizadas pode se tornar uma realidade viável para uso em biorrefinarias (ANEXO I), indústrias têxteis, alimentícias, farmacêuticas, biomédicas, entre outras.

Visando o potencial de aplicação de pectinases imobilizadas na indústria de sucos e bebidas, este capítulo focou no estudo de caracterização das enzimas livre e imobilizada, e comparação entre elas.

2. Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar as enzimas livre e imobilizada quanto ao efeito na atividade enzimática frente ao pH, temperatura, termoestabilidade, inibição por íons e composto fenólicos, e cinética enzimática.
- Comparar as enzimas livre e imobilizada quanto ao potencial de sacarificação através da hidrólise da pectina.
- Realizar testes de reuso da enzima imobilizada.
- Caracterizar fisicamente o processo de imobilização.
- Aplicar e comparar a eficiência das enzimas livre e imobilizada na redução da viscosidade da polpa do suco de goiaba.

3. Metodologia

3.1. Amostras

Os experimentos de caracterização foram realizados tanto para as enzimas não imobilizadas (livres), quanto para as enzimas imobilizadas (derivados), para fins de comparação. As amostras enzimáticas utilizadas foram o extrato bruto de *A. terreus* e a pectinase parcialmente purificada – PEC2 (Capítulo II). O suporte utilizado para imobilização foi o MANAE-agarose.

3.2. Determinação do efeito do pH na atividade enzimática

Para determinação o efeito do pH na atividade enzimática, as amostras de enzimas livre e imobilizada foram avaliadas na presença de tampões de diferentes valores de pH no intervalo de 3.0 - 9.0. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio 50 mM (pH 3.0 - 6.0), fosfato de sódio 50 mM (pH 6.0 - 7.5) e tris-HCl 50 mM (pH 7.5 - 9.0). Todos os tampões, independentemente do pH, foram ajustados para a mesma força iônica, com uso NaCl. A determinação do efeito do pH foi realizado através do método de DNS (MILLER, 1959). Os resultados dos ensaios de efeito do pH na atividade enzimática foram expressos como atividade relativa, considerando a maior atividade da enzima como 100% de atividade.

3.3. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática

Para avaliação o efeito da temperatura na atividade enzimática foram realizados ensaios enzimáticos com as amostras de enzimas livre e imobilizada, alterando a temperatura de incubação de 30°C a 80°C. A determinação do efeito da temperatura foi realizada através do método de DNS (MILLER, 1959). Os resultados dos ensaios foram expressos como atividade relativa, considerando a maior atividade da enzima como 100%.

3.4. Termoestabilidade

O estudo da termoestabilidade das enzimas livre e imobilizada foi realizado através da pré-incubação das amostras a 40 e 50°C, com retirada de alíquotas em tempos diferentes, por um período máximo de 48 horas. A atividade enzimática foi determinada da mesma forma descrita nos itens 3.2 e 3.3. Os resultados dos ensaios de termoestabilidade foram expressos como atividade relativa.

3.5. Determinação de parâmetros cinéticos

Para a determinação da constante de Michaelis-Mentem (K_m) e da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$), foram realizados ensaios de atividade enzimática com pectina solúvel. Foram utilizadas soluções de pectina da casca de frutas cítricas, com concentrações variando de 1 a 30 mg/mL. A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada pelo método de regressão não linear *Enzfitter* (LEATHERBARROW, 1999).

3.6. Determinação do efeito de íons e compostos fenólicos

Foi investigado o efeito de íons metálicos (K^+ , Na^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}), do SDS, EDTA, DDT e β -mercaptoetanol, sobre a atividade das enzimas. As amostras foram pré-incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos na presença desses compostos, em concentrações de 1 e 10 mM. Como controle, as amostras foram incubadas em água destilada. Após o período de incubação, as atividades enzimáticas foram avaliadas, e os resultados expressos em

atividade relativa, onde o valor de 100% correspondeu aos resultados obtidos do controle.

Também foi analisado o efeito de inibição enzimática causado pelos compostos fenólicos ácido ferúlico, vanilina, ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido 4-hidróxibenzoico e ácido tânico. Para os experimentos foram utilizadas soluções dos devidos compostos na concentração de 1 mg/mL. As atividades foram determinadas a partir de ensaio enzimático de DNS, e expressas em atividade relativa. Como controle, foram utilizadas amostras acrescidas de água ou etanol.

3.7. Caracterização física da amostra de enzima imobilizada

As caracterizações física e biofísica da imobilização enzimática foram realizadas através do emprego de quatro métodos: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia Raman, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espectroscopia de infravermelho (FTIR).

A microscopia de varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade de Brasília, sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Sônia Bao. As amostras de enzima imobilizada em MANAE-agarose e do suporte MANAE-agarose livre foram ressuspendidas em tampão fosfato 10 mM na concentração de 1:10, depositadas no *stub* de amostras, e metalizadas em equipamento Sputter Coater SCD 050 (Balzers, Alemanha). Posteriormente, as imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura modelo JMS 7001F (JEOL, Japão) utilizando voltagem de 15 kV.

3.8. Hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise foram realizados somente com a amostra de extrato bruto de *A. terreus*, dado que, para aplicações industriais, o uso de enzimas purificadas ou semi-purificadas não é justificado do ponto de vista econômico.

A hidrólise enzimática foi realizada em micro-tubos de 1,5 mL, com volume final de reação de 1,0 mL. Aos tubos foi adicionado o substrato - pectina de casca de frutas cítricas (SigmaAldrich, EUA) - na concentração de

1% (m/v), e uma carga de proteínas correspondente a 2 mg/g de substrato. As amostras foram incubadas a 40°C com agitação de 950 rpm. Foram retiradas amostras nos intervalos de 1, 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas, para a análise da produção de açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959). Todo o experimento foi realizado em triplicata, tendo como controle uma amostra enzimática em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico *R* versão 3.5.2. Os dados foram submetidos ao Teste t de Student, utilizando intervalo de confiança de 95%.

3.9. Teste de reuso da enzima imobilizada

Os experimentos de reuso da enzima imobilizada seguiram a mesma metodologia de hidrólise descrita no item 2.7, entretanto foi pré-estabelecido um tempo fixo de 1 hora de bateria de hidrólise. Após a primeira bateria, foram coletadas alíquotas para quantificação dos açúcares redutores. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante, contendo o substrato e os açúcares produzidos, foi descartado. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato de sódio 10 mM e centrifugadas novamente. A etapa de lavagem foi repetida 3 vezes para garantir a remoção do substrato e açúcar remanescente. Por fim, adicionou-se novamente o substrato à amostra de enzima imobilizada, e foi realizada nova bateria de 1 hora de hidrólise. Esse processo foi repetido sucessivas vezes, até não ser detectada a produção de açúcares redutores.

3.10. Experimento de redução de viscosidade de polpas de frutas

Para avaliar uma possível aplicação industrial das enzimas não imobilizadas e imobilizadas, foi determinado o efeito da ação enzimática na redução de viscosidade da polpa de goiaba-vermelha (*Psidium guajava* L), conforme protocolo modificado de Surajbhan e colaboradores (2012). Os experimentos foram realizados apenas com as amostras de extrato bruto de *A. terreus*, visto que, para uma possível aplicação industrial não seria economicamente viável utilizar a enzima parcialmente purificada.

A viscosidade foi determinada utilizando um viscosímetro rotacional digital da marca Brookfield, modelo DV-E (Brookfield Engineering, Stoughton, MA, USA) equipado com cilindros de diâmetros diferentes (spindles). Para a polpa de goiaba foi utilizado um cilindro número 3 (referencia RV-3) a 60 rpm.

A polpa foi produzida no laboratório utilizando um liquidificador caseiro simples. A proporção utilizada foi de 1:1 (m/v) de fruta e água destilada. Após a maceração, a polpa foi peneirada e acondicionada em frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de polpa. A cada frasco foi adicionada as enzimas livre e imobilizada, seguindo dois padrões de concentração (por atividade e por proteína). No primeiro teste foram utilizados 5 U da enzima pectinase para 100 mL de polpa, e no segundo, 50 µg de proteína para 100 mL de polpa. Por fim, as amostras foram incubadas a 40°C e 180 rpm, durante 60 minutos.

Após o período de incubação, procedeu-se a inativação enzimática aquecendo o material a 97°C por cinco minutos. Posteriormente, foi realizado o resfriamento por imersão em água, até atingir 28°C e, finalmente, foram realizadas as leituras de viscosidade. Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se para cada repetição uma nova amostra. O controle foi feito com a substituição da enzima pelo tampão fosfato de sódio, 10 mM pH 7.0, nas mesmas condições do ensaio.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico *R* versão 3.5.2. Os dados foram submetidos ao Teste t de Student pareado, para avaliação da viscosidade antes e após o tratamento enzimático, e à ANOVA *one-way* e post-hoc Teste Tukey, para avaliação da diferença entre amostras. Todas as análises utilizaram intervalo de confiança de 95%.

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação do efeito do pH na atividade enzimática

A Figura 18 apresenta o efeito do pH sobre as atividades enzimáticas da pectinase parcialmente purificada (PEC2) livre e imobilizada em MANAE-agarose. É importante ressaltar que todas as vezes que for citado o termo “enzima livre”, trata-se da sua forma não imobilizada.

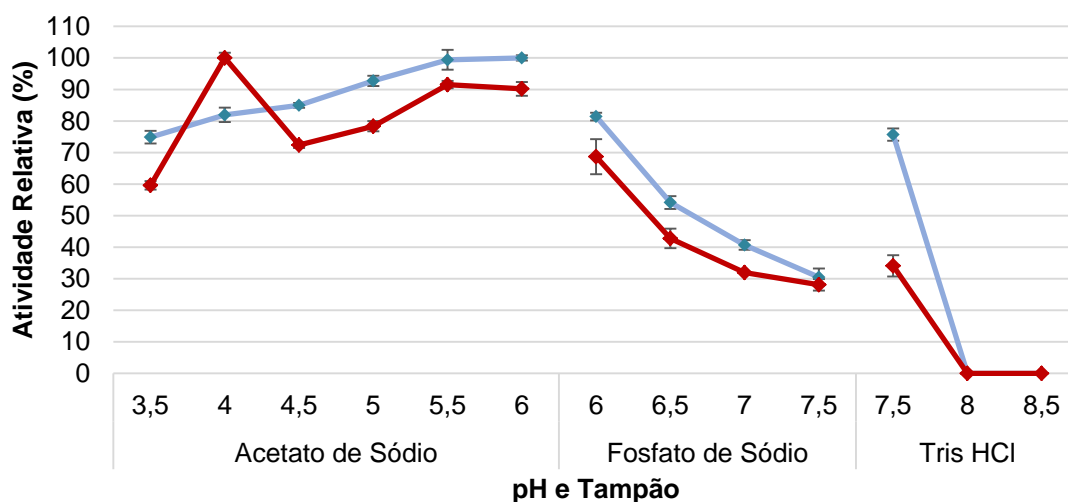


Figura 18 - Efeito do pH na atividade de PEC2 livre (◆) e imobilizada em MANAE-agarose (◇).

Tanto a enzima livre, quanto a imobilizada apresentaram maiores retenções de atividade na faixa de pH 3.5 - 6.0. Esse resultado era esperado, uma vez que os fungos, principalmente do gênero *Aspergillus*, são descritos na literatura como produtores de pectinases ácidas, justificando as altas atividades enzimáticas nesta faixa de pH (HEERD *et al.*, 2012; KASHYAP *et al.*, 2001). Entretanto, nota-se que a enzima livre apresentou maior atividade relativa em pH's 5.5 - 6.0, enquanto a enzima imobilizada em pH 4.0.

A alteração no pH de maior atividade após o procedimento de imobilização é frequentemente relatado na literatura para pectinases imobilizadas em diferentes suportes (RAJDEO *et al.*, 2016; CHAUHAN *et al.*, 2015). Entretanto, no presente estudo houve um deslocamento de aproximadamente 2.0 pontos na faixa de pH. Dai e colaboradores (2018) realizaram um estudo de imobilização de uma pectinase em suportes de alginato de sódio e óxido de grafeno, e analisaram o efeito do pH na atividade enzimática após imobilização. O pH de maior atividade da enzima livre foi de 4.5, já para a enzima imobilizada houve um deslocamento de apenas 0.5 ponto, atingindo, como no presente estudo, pH 4.

A mudança no pH de maior atividade observada para a enzima imobilizada pode ser explicada pelo fato do suporte proporcionar a formação de um arcabouço externo mais rígido para a ligação da enzima, além de

propiciar a estabilização física da estrutura molecular da proteína, fatos que consequentemente minimizam os efeitos da temperatura e pH extremo na ruptura de interações e no desdobramento de estruturas secundárias e terciárias da enzima (DICOSMIO *et al.*, 2013; BALCÃO *et al.*, 1996).

Essa alteração no pH pós-imobilização pode implicar na utilização da enzima imobilizada em aplicações diversas, como na clarificação e redução da viscosidade de bebidas ácidas (suco de laranja, limão e vinhos).

Os resultados em pH 3.0 e 9.0 não foram apresentados, pois houve a formação de agregados que interferiram nas leituras de absorvância, tornando os dados não confiáveis.

A Figura 19 apresenta o efeito do pH na atividade enzimática da pectinase do extrato bruto.

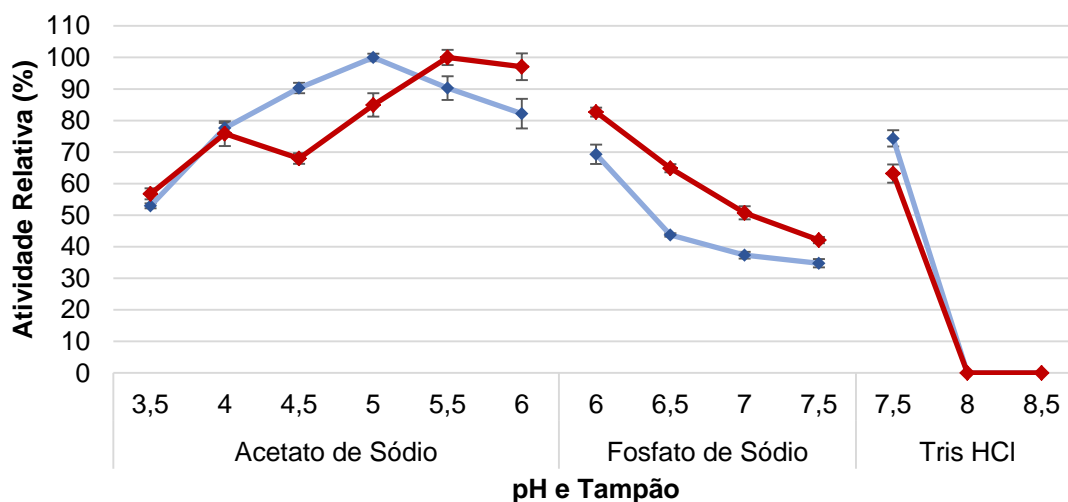


Figura 19 - Efeito do pH na atividade da pectinase do extrato bruto livre (◆) e imobilizada em MANAE-agarose (◆).

Observa-se que, como no caso anterior, as maiores retenções de atividade foram detectadas em faixas mais ácidas de pH. Entretanto, para enzima livre a maior atividade enzimática foi em pH 5, e para enzima imobilizada nos pH's 5.5 - 6.0. Nesse caso, a imobilização não teve um impacto tão significativo na alteração dos padrões de pH de maior atividade da amostra.

4.2. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática

A Figura 20 apresenta o efeito da temperatura nas atividades de PEC2 livre e imobilizada em MANAE.

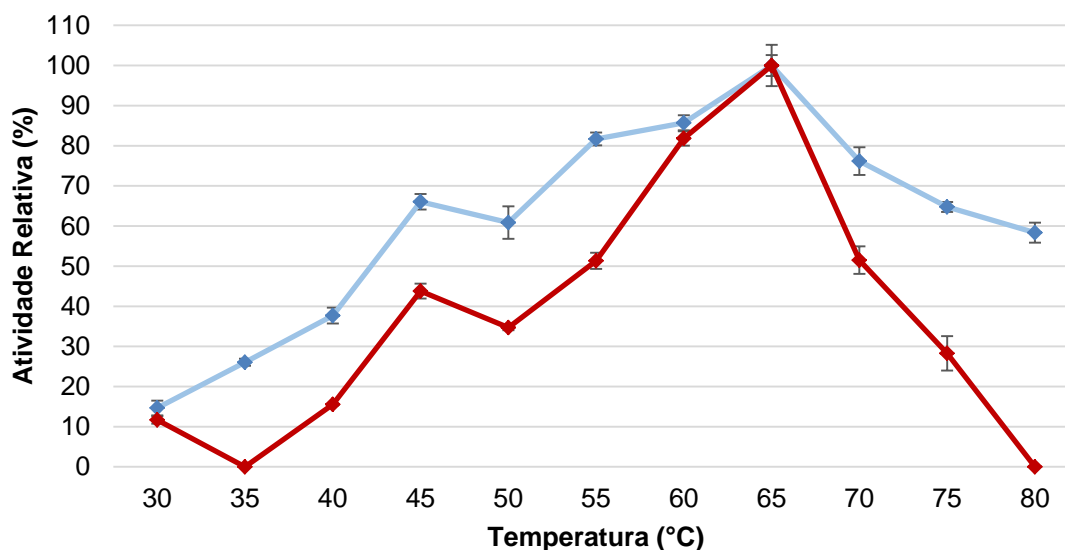


Figura 20 - Efeito da temperatura nas atividades de PEC2 livre (—◆—) e imobilizada em MANAE-agarose (—▲—).

Para a amostra de pectinase parcialmente purificada, tanto a enzima livre, quanto a imobilizada apresentaram sua maior retenção de atividade a 65°C, não havendo mudança na temperatura de maior atividade da enzima após a imobilização. Além disso, quando comparado à enzima imobilizada, o homólogo livre apresentou maiores retenções de atividade em todas as faixas de temperatura.

No entanto, para a amostra de pectinase do extrato bruto (Figura 21) observa-se uma alteração nos padrões de efeito da temperatura na atividade enzimática após a imobilização.

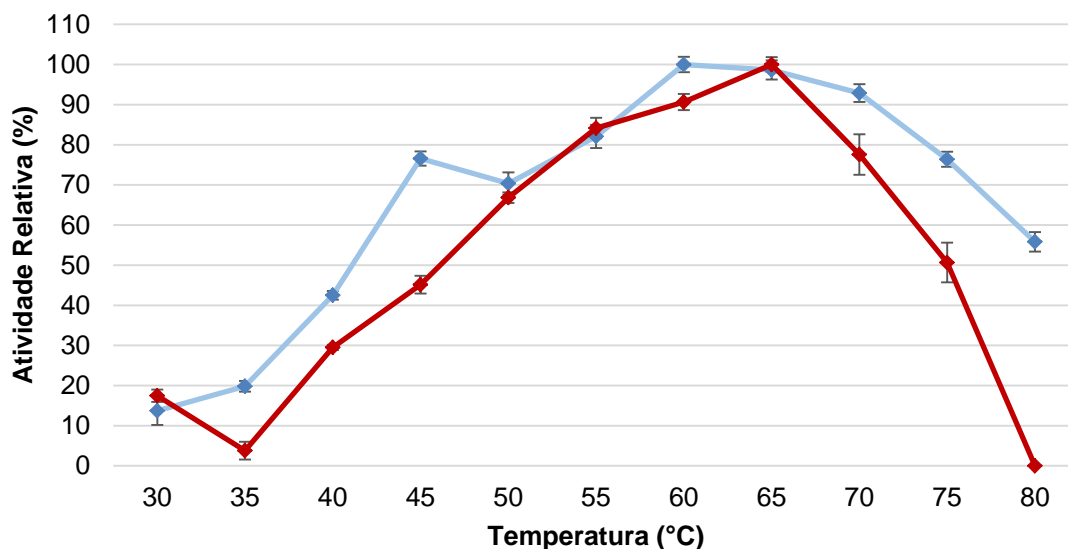


Figura 21 - Efeito da temperatura nas atividades da pectinase do extrato bruto livre (—◆—) e imobilizada em MANAE-agarose (—▲—).

Embora, novamente, a enzima livre tenha apresentado maiores retenções de atividade em quase todas as faixas de temperatura, houve uma alteração de 5°C na temperatura de maior atividade da enzima após o processo de imobilização. A temperatura de maior atividade da enzima livre foi em 60°C, enquanto que da enzima imobilizada foi em 65°C. Esse deslocamento de 5°C pode ser relevante para a aplicação em processos industriais que ocorram em altas temperaturas.

Chauhan e colaboradores (2015) relataram um aumento de 5°C na temperatura de maior atividade de uma pectinase quando imobilizada em suporte celite. No entanto, a pectinase imobilizada do estudo citado apresentou maior atividade a 45°C, temperatura inferior à demonstrada pela pectinase imobilizada em MANAE-agarose (65°C).

4.3. Termoestabilidade

Os resultados de termoestabilidade a 40°C da pectinase parcialmente purificada livre e imobilizada são apresentados na Figura 22.

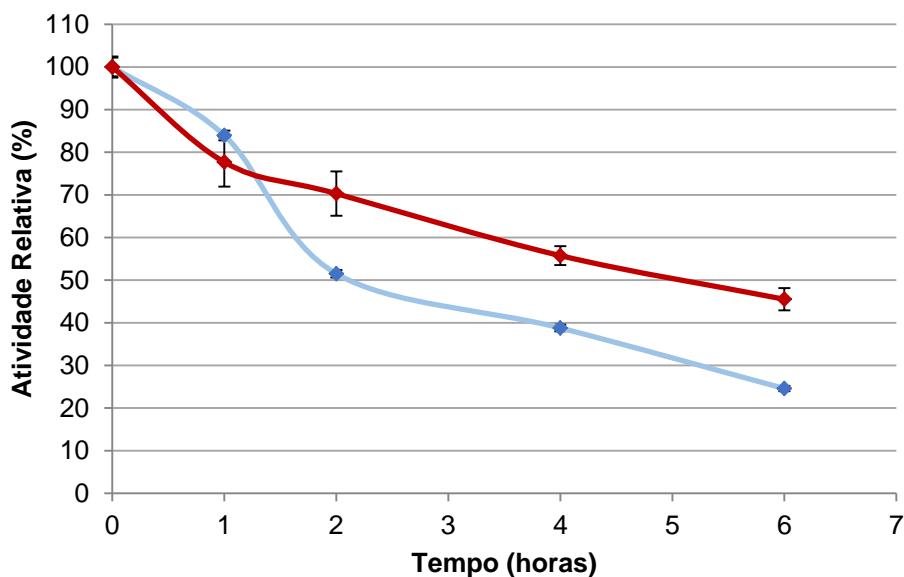


Figura 22 - Teste de termoestabilidade da PEC2 livre (◆) e immobilizada em MANAE-agarose (◆), em 40°C de pré-incubação.

Observa-se que a enzima livre atingiu seu tempo de meia-vida com 2 horas de incubação, enquanto a enzima immobilizada suportou 6 horas até atingir sua meia-vida. Dessa forma, a imobilização proporcionou uma melhora de 200% na termoestabilidade da enzima a 40°C. Além disso, observa-se que a enzima immobilizada, quando comparada à enzima livre, apresentou maiores retenções de atividade em função do tempo de incubação.

Chauhan e colaboradores (2015) realizaram um estudo de imobilização de uma pectinase comercial no suporte celite e avaliaram a termoestabilidade da enzima a 40°C. O tempo de meia-vida da enzima livre foi de aproximadamente 3 horas, e da enzima immobilizada aproximadamente 4 horas, havendo uma melhora de apenas 133% na termoestabilidade após imobilização. Os resultados apresentados no presente trabalho são superiores aos relatados por Chauhan (2015).

Vários estudos sugerem que a imobilização promove um aumento da estabilidade térmica da enzima, uma vez que o suporte favorece a formação de um arcabouço que protege a enzima contra os processos de desdobramento da sua estrutura ocasionados pelo aumento da temperatura e exposição prolongada a altas temperaturas (MATEO *et al.*, 2007; BALCÃO *et al.*, 1996).

A melhoria da termoestabilidade de enzimas é muito almejada pelas indústrias de bioprocessos, pois ela proporciona a manutenção da atividade catalítica da enzima mesmo após longos períodos de incubação. A otimização dessa característica gera a redução dos custos brutos com enzimas, barateando o processo industrial global.

Os dados de termoestabilidade para a pectinase do extrato bruto são apresentados na Figura 23.

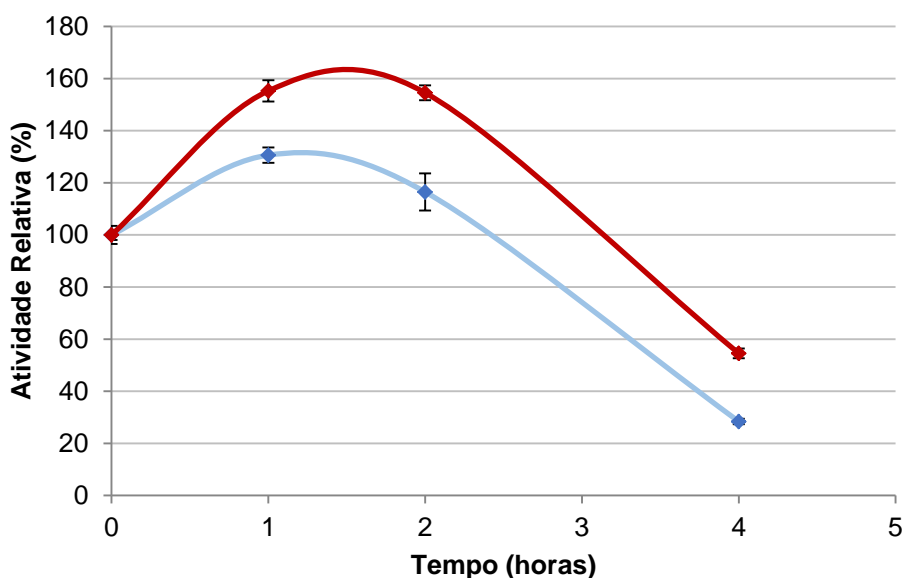


Figura 23 - Teste de termoestabilidade da pectinase do extrato bruto livre (◆) e imobilizada em MANAE-agarose (◆), em 40°C pré-incubação.

Primeiramente observa-se um aumento da atividade relativa da enzima após a primeira hora de incubação. Esse aumento pode ser justificado por uma possível ativação térmica após incubação, gerando aumento da atividade enzimática.

Novamente, nota-se que a imobilização proporcionou uma melhora na termoestabilidade da enzima. Após 4 horas de incubação a 40°C a enzima livre apresentou apenas 28% da sua atividade catalítica, enquanto a enzima imobilizada apresentou 55% de retenção. Além disso, observa-se que a enzima imobilizada apresentou maiores retenções de atividade em função do tempo de incubação.

Os resultados obtidos sugerem uma possível aplicação das enzimas imobilizadas ao MANAE-agarose em processos industriais que necessitam de prolongados períodos de incubação.

Os dados de termoestabilidade da pectinase do extrato bruto e de PEC2 a 50°C não foram apresentados, pois tanto as enzimas livres, quanto as enzimas imobilizadas não suportaram nem 5 minutos de incubação a essa temperatura, perdendo toda a sua atividade catalítica, impossibilitando a comparação de resultados.

Analisando os resultados de determinação do efeito do pH, da temperatura e termoestabilidade das amostras enzimáticas é possível notar diferenças nos padrões quando se compara a pectinase parcialmente purificada e a pectinase do extrato bruto. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que o extrato bruto é uma amostra heterogênea, com presença de outras enzimas e outras proteínas que podem ter ação sinérgica ou antagônica, modificando o ambiente, reações químicas, e, conseqüentemente o comportamento da pectinase. A amostra parcialmente purificada, pela quase ausência de outras proteínas e enzimas, está menos susceptível a alterações na sua cinética e comportamento.

4.4. Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos para a pectinase do extrato bruto (PECEB) e pectinase parcialmente purificada (PEC2) livre e imobilizada são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de PEC2 e PECEB livre e imobilizada em MANAE-agarose.

Enzima	K_m (µg/mL)	V_{máx} (µg/min)
PEC2 livre	24,54	1,39
PEC2 imobilizada MANAE	9,71e ⁸	4,53e ¹⁰
PECEB livre	20,77	1,17
PECEB imobilizada MANAE	1016,98	17,42

Observa-se que, após o procedimento de imobilização houve um aumento drástico nos valores dos parâmetros cinéticos tanto para a pectinase do extrato bruto, quanto para a pectinase parcialmente purificada.

Sabe-se que a transferência de massa entre o substrato e as enzimas altera após o processo de imobilização, uma vez que a enzima não se encontra totalmente disponível, e com sua mobilidade intacta para o desempenho das reações catalíticas (RODRIGUES *et al.*, 2013; GUIBAN, 2006). Dessa forma, quando se utiliza o procedimento de imobilização é importante levar em consideração as alterações nos parâmetros cinéticos geradas pela limitação de difusão do substrato.

Adicionalmente, outros fatores como tipo do material do suporte de imobilização e a natureza da ligação, também são determinantes para a cinética enzimática (COONEY *et al.*, 2011). O emprego de matrizes porosas, como no caso o MANAE-agarose, gera a introdução de uma resistência adicional à transferência de massa, afetando ainda mais os parâmetros cinéticos (NEIRA *et al.*, 2017; COONEY *et al.*, 2011). Em materiais não porosos essa resistência é significativamente menor, devido à facilidade de acesso da enzima ao substrato (NEIRA *et al.*, 2017; COONEY *et al.*, 2011).

A natureza da ligação durante a imobilização também pode impactar a cinética enzimática, pois dependendo do tipo de ligação pode haver alterações nas estruturas secundárias e terciárias da proteína (DICOSMIO *et al.*, 2013; BALCÃO *et al.*, 1996). Ligações covalentes, apesar de mais estáveis, tendem a gerar maiores impactos na estrutura da enzima, enquanto interações por adsorção provocam menores alterações (ES *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o conhecimento da química de superfície da enzima, do suporte e da interação entre enzima e suporte é extremamente importante, pois possibilitam a previsão e prevenção de possíveis impactos negativos na atividade catalítica e cinética da enzima.

Como já esperado, o K_m das enzimas aumentou após o processo de imobilização. O aumento do K_m pode ser explicado como resultado da limitação difusional e/ou por mudanças geradas na estrutura da proteína após a imobilização, gerando uma redução de afinidade da enzima pelo substrato. Resultados semelhantes são corriqueiramente relatados na

literatura (CERRETI *et al.*, 2017; SPINELLI *et al.*, 2013, SARIOGLU *et al.*, 2001). Além disso, os valores de $V_{m\acute{a}x}$ também aumentaram após a imobilização, demonstrando que a curva não atingiu seu estado de saturação para as enzimas imobilizadas.

Apesar dos resultados alcançados não serem satisfatórios, eles são frequentemente relatados e explicados na literatura, além de representarem mais um indício de que a imobilização das enzimas de fato ocorreu, visto o aumento do valor de K_m após imobilização.

4.5. Determinação do efeito de íons na atividade enzimática

A análise do efeito de ativação ou inibição de íons na atividade enzimática auxilia a presumir as possíveis interações que ocorrem no sítio catalítico e o mecanismo de ação das enzimas.

A ativação enzimática por íons e outros compostos ocorre devido a mudanças na conformação e na estabilização do sítio catalítico da enzima, proporcionando um aumento da atividade enzimática. Além disso, alguns cátions podem agir diretamente no substrato, alterando suas propriedades, aumentando a afinidade da enzima pelo mesmo. Os íons ativadores mais relatados na literatura são Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e K^+ (LOPINA, 2016).

Já a inibição ocorre principalmente pela formação de complexos agente inibitório/enzima que geram a modificação de aminoácidos fundamentais para a atividade catalítica. Os principais íons com atividade inibitória são Hg^+ , Fe^+ , Cu^+ (LOPINA, 2016).

A Tabela 7 apresenta os resultados de efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada.

Tabela 7 - Efeitos de íons e outros compostos (concentração de 1 e 10 mM) na atividade catalítica da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada.

Íon e concentração	Retenção atividade controle (%)	Retenção atividade PECEB livre (%)	Retenção atividade PECEB-MANAE (%)	
1 mM				
FeSO ₄	100	55,06 ± 1,75	69,84 ± 10,63	
MgSO ₄		97,72 ± 4,36	91,71 ± 13,58	
MnCl ₂		103,55 ± 6,58	107,04 ± 8,98	
CaCl ₂		65,39 ± 2,79	84,79 ± 9,42	
CuSO ₄		73,40 ± 3,43	52,80 ± 4,45	
SDS		77,46 ± 2,40	74,08 ± 6,33	
ZnSO ₄		103,54 ± 3,36	65,22 ± 1,94	
EDTA		91,42 ± 10,31	68,24 ± 9,78	
β-mercapto		82,70 ± 2,57	43,76 ± 12,07	
DDT		85,83 ± 4,79	44,27 ± 1,63	
HgCl ₂		53,59 ± 3,66	23,57 ± 8,35	
MgCl ₂		96,48 ± 3,67	47,64 ± 8,48	
FeCl ₃		58,43 ± 2,95	31,78 ± 3,39	
ZnCl		79,40 ± 2,86	25,69 ± 9,12	
NaCl		73,98 ± 2,52	43,51 ± 6,43	
CuCl ₂		66,37 ± 2,16	14,43 ± 8,89	
KCl		100,27 ± 9,94	58,87 ± 1,86	
CoCl ₂		85,42 ± 4,96	51,32 ± 12,89	
10 mM				
FeSO ₄		100	77,37 ± 6,03	29,42 ± 9,60
MgSO ₄	104,86 ± 4,20		79,76 ± 1,86	
MnCl ₂	102,27 ± 5,13		67,15 ± 2,39	
CaCl ₂	58,47 ± 4,57		38,36 ± 6,24	
CuSO ₄	30,66 ± 8,95		51,50 ± 2,98	
SDS	8,81 ± 5,12		0,00 ± 0,00	
ZnSO ₄	71,95 ± 5,55		90,71 ± 10,05	
EDTA	116,87 ± 7,73		73,20 ± 10,68	
β-mercapto	97,65 ± 10,29		51,84 ± 2,82	
DDT	89,05 ± 3,31		49,79 ± 3,97	
HgCl ₂	0,00 ± 0,00		0,00 ± 0,00	
MgCl ₂	95,68 ± 3,04		65,13 ± 4,89	
FeCl ₃	76,21 ± 9,20		96,64 ± 2,43	
ZnCl	69,10 ± 4,39		54,22 ± 5,49	
NaCl	112,24 ± 13,44		69,92 ± 5,94	
CuCl ₂	41,81 ± 9,33		247,47 ± 7,25	
KCl	101,66 ± 3,12		63,89 ± 8,07	
CoCl ₂	74,60 ± 3,80		54,70 ± 2,45	

Analisando a concentração de 1 mM, observa-se que tanto a enzima livre, como a imobilizada foram inibidas pelos compostos FeSO₄, CaCl₂, CuSO₄, SDS, β-mercaptoetanol, DDT, HgCl₂, FeCl₃, ZnCl, NaCl, CuCl₂ e CoCl₂. O efeito inibitório de Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Hg⁺ sobre pectinases é relatado em diversos trabalhos (JARAMILLO *et al.*, 2015; RASHAD *et al.*, 2011; CELESTINO *et al.*, 2006; KLUG-SANTNER *et al.*, 2006; KASHYAP *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2001). No entanto, um resultado inesperado foi a inibição da pectinase pelo íon Ca²⁺, uma vez que a literatura relata uma forte dependência de cálcio pelas pectato liases, e a ativação de pectina liases pelo mesmo (JAYANI *et al.*, 2005). Todavia, a enzima imobilizada apresentou uma menor inibição ao Ca²⁺ e o Fe²⁺.

A enzima imobilizada também apresentou inibição pelos íons Zn²⁺ e K⁺, enquanto a enzima livre manteve sua atividade estável frente aos mesmos. Saxena e colaboradores (2008) relataram um resultado similar ao imobilizar uma pectinase de *A. niger* em membranas de polietileno.

Na concentração de 10 mM observa-se a inibição de ambas as formas (livre e imobilizada) pelos compostos FeSO₄, FeCl₃, CaCl₂, CuSO₄, SDS, DDT, HgCl₂, MgCl₂, ZnCl, ZnSO₄ e CoCl₂. Contudo, a enzima imobilizada em MANAE-agarose apresentou uma menor inibição ao CuSO₄, ZnSO₄ e FeCl₃. A enzima imobilizada também sofreu inibição por Mg²⁺, Mn²⁺, EDTA, β-mercaptoetanol, Na⁺ e K⁺, enquanto sua forma livre permaneceu com sua atividade praticamente inalterada em relação ao controle. Chahuan e colaboradores (2015) encontraram resultados similares ao imobilizar uma pectinase no suporte celite, constatando uma inibição significativa da enzima imobilizada frente aos íons Mg²⁺ e Mn²⁺, EDTA, β-mercaptoetanol e SDS.

Nota-se que a enzima imobilizada apresentou uma alta ativação, de aproximadamente 147%, na presença do íon Cu²⁺, enquanto a enzima livre sofreu uma forte inibição, de aproximadamente 48%. De forma oposta, Chauhan e colaboradores (2015) notaram uma alta inibição da pectinase imobilizada em celite frente ao íon Cu²⁺.

Alguns trabalhos de revisão de literatura sugerem que a imobilização promove uma maior estabilidade da enzima frente às condições do meio, inclusive frente à ação de compostos inibitórios. Isso ocorreria, pois a

enzima, quando imobilizada, encontra-se menos susceptível a formação de complexos com agentes de inibição (RODRIGUES *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; MATEO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria dos trabalhos experimentais não constatam resultados coerentes com a teoria.

Os resultados aqui apresentados não revelaram um padrão homogêneo plausível para discussão. O comportamento das enzimas livre e imobilizada foi completamente heterogêneo, impossibilitando qualquer tipo de conclusão contundente. Dessa forma, são necessários estudos avançados sobre o mecanismo de ação da enzima, e sobre a química de reação envolvida no processo de imobilização para que se possam ter respostas mais conclusivas a cerca dessa análise.

Os efeitos de íons e outros compostos na atividade da pectinase parcialmente purificada livre e imobilizada são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeitos de íons e outro compostos (concentração de 1 e 10 mM) na atividade catalítica da pectinase parcialmente purificada livre e imobilizada.

Íon e concentração	Retenção atividade controle (%)	Retenção atividade PEC2 livre (%)	Retenção atividade PEC2-MANAE (%)	
1 mM				
FeSO ₄	100	57,00 ± 1,58	62,01 ± 4,99	
MgSO ₄		125,49 ± 1,42	225,33 ± 13,65	
MnCl ₂		127,16 ± 3,89	144,72 ± 8,14	
CaCl ₂		136,65 ± 4,20	185,10 ± 10,43	
CuSO ₄		108,30 ± 3,93	138,53 ± 9,61	
SDS		94,54 ± 4,10	114,09 ± 12,45	
ZnSO ₄		149,10 ± 3,00	154,34 ± 10,79	
EDTA		103,24 ± 5,14	146,05 ± 8,97	
β-mercapto		105,19 ± 5,70	81,48 ± 5,47	
DDT		119,77 ± 2,82	48,45 ± 7,40	
HgCl ₂		83,50 ± 3,71	28,51 ± 5,51	
MgCl ₂		119,43 ± 2,83	86,43 ± 5,29	
FeCl ₃		88,92 ± 4,05	83,58 ± 10,69	
ZnCl		101,71 ± 4,51	66,93 ± 8,24	
NaCl		119,77 ± 1,24	70,38 ± 3,65	
CuCl ₂		112,28 ± 0,97	66,34 ± 7,49	
KCl		135,70 ± 4,33	99,12 ± 5,92	
CoCl ₂		110,40 ± 1,93	67,10 ± 5,31	
10 mM				
FeSO ₄		100	88,16 ± 3,56	103,12 ± 6,94
MgSO ₄	121,68 ± 4,29		114,41 ± 6,18	
MnCl ₂	127,19 ± 4,63		104,94 ± 6,12	
CaCl ₂	84,67 ± 2,04		58,21 ± 4,19	
CuSO ₄	44,21 ± 1,71		64,86 ± 4,75	
SDS	12,65 ± 0,58		32,90 ± 5,90	
ZnSO ₄	115,97 ± 1,54		79,63 ± 4,34	
EDTA	162,79 ± 7,59		92,60 ± 4,88	
β-mercapto	155,37 ± 7,91		82,58 ± 7,80	
DDT	117,92 ± 1,63		72,92 ± 8,92	
HgCl ₂	29,48 ± 2,78		0,00 ± 0,00	
MgCl ₂	128,05 ± 1,47		89,87 ± 6,39	
FeCl ₃	104,63 ± 2,38		116,43 ± 12,39	
ZnCl	99,22 ± 4,36		95,83 ± 13,28	
NaCl	118,83 ± 1,45		81,05 ± 4,73	
CuCl ₂	68,55 ± 10,16		58,95 ± 4,81	
KCl	130,48 ± 1,55		98,27 ± 5,10	
CoCl ₂	113,76 ± 6,64		208,46 ± 13,38	

Na concentração de 1 mM verifica-se que as enzimas livre e imobilizada foram inibidas por FeSO_4 , HgCl_2 e FeCl_3 . A forma imobilizada também apresentou inibição ao β -mercaptoetanol, DDT, MgCl_2 , ZnCl , NaCl , CuCl_2 e CoCl_2 . Analisando os outros compostos, observa-se que houve uma ativação de ambas as formas, livre e imobilizada, por MgSO_4 , MnCl_2 , CaCl_2 , CuSO_4 , SDS, ZnSO_4 e EDTA. Contudo, a enzima imobilizada apresentou uma maior taxa de ativação por estes compostos.

Já na concentração de 10 mM, as enzimas livre e imobilizada foram inibidas por CaCl_2 , CuSO_4 , SDS, HgCl_2 e CuCl_2 . Entretanto, a enzima imobilizada apresentou menores taxas de inibição para os compostos CuSO_4 e SDS. A forma imobilizada ainda apresentou inibição por ZnSO_4 , EDTA, β -mercaptoetanol, DDT, MgCl_2 e NaCl , enquanto a enzima livre apresentou ativação frente a estes compostos. Para o íon Co^{2+} , a enzima imobilizada apresentou cerca de 108% de ativação, enquanto a enzima livre, apenas 13%.

Novamente, não foi possível estabelecer um padrão de comportamento das enzimas devido à heterogeneidade dos resultados.

4.6. Determinação do efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática

Sabe-se que o processo de pré-tratamento da biomassa gera compostos fenólicos solúveis que podem interagir com as proteínas através da formação de ligações covalentes e não covalentes, culminando na inativação ou inibição das enzimas (KROLL, 2003).

A Tabela 9 apresenta o efeito de compostos fenólicos na atividade da pectinase do extrato bruto livre e imobilizada.

Tabela 9 - Efeitos de compostos fenólicos na atividade enzimática da pectinase do extrato bruto (PECEB) livre e imobilizada.

Composto fenólico	Retenção atividade controle (%)	Retenção atividade PECEB livre (%)	Retenção atividade PECEB-MANAE (%)
Ácido tânico		136,64 ± 6,73	159,30 ± 5,18
Vanilina		47,43 ± 5,30	597,59 ± 15,05
Ácido cinâmico		147,54 ± 8,35	96,10 ± 3,39
Ácido ferúlico	100	190,55 ± 10,27	311,15 ± 8,42
Ácido p-cumárico		156,22 ± 9,26	96,74 ± 6,54
Ácido 4-hidroxibenzóico		104,29 ± 1,75	135,71 ± 7,27

Nota-se que a vanilina foi o único composto fenólico que inibiu a pectinase (não imobilizada); todos os outros compostos ativaram a enzima. Esses dados corroboram com os reportados por Jaramillo e colaboradores (2015), onde se verificou inibição da pectinase pela vanilina e ativação por ácido ferúlico, cinâmico e 4-hidroxibenzóico.

Entretanto, na literatura são raros os relatos envolvendo a ativação de pectinases por compostos fenólicos. Wu e colaboradores (2010) relatam uma forte inibição da atividade de pectinase pelo composto ácido ferúlico. Gamble e colaboradores (2010) também descreveram a inibição de pectinase por diferentes compostos fenólicos produzidos pelo pré-tratamento de fibras de linho.

Quando comparado à enzima livre, a forma imobilizada apresentou uma maior ativação enzimática para a maioria dos compostos. Esses dados revelam um potencial de utilização de enzimas imobilizadas em processos de sacarificação de biomassa lignocelulósica.

Os resultados do efeito de compostos fenólicos na atividade da pectinase parcialmente purificada (PEC2) livre e imobilizada são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Efeitos de compostos fenólicos na atividade enzimática da pectinase parcialmente purificada (PEC2) livre e imobilizada.

Composto fenólico	Retenção atividade controle (%)	Retenção atividade PEC2 livre (%)		Retenção atividade PEC2-MANAE (%)	
Ácido tânico	100	106,22	± 2,46	257,89	± 13,99
Vanilina		90,44	± 5,01	143,20	± 9,17
Ácido cinâmico		103,12	± 1,11	83,26	± 8,04
Ácido ferúlico		159,60	± 3,12	193,55	± 10,58
Ácido p-cumárico		130,60	± 8,55	130,22	± 8,81
Ácido 4-hidroxibenzóico		123,09	± 5,91	99,04	± 5,47

Nota-se, novamente, que a maioria dos compostos fenólicos ocasionou um aumento da atividade relativa das enzimas. No caso na vanilina, houve um efeito de inibição na enzima livre, como já constatado anteriormente. No entanto para a enzima imobilizada houve uma ativação frente a este composto. Para o ácido cinâmico, foi mantida a ativação da enzima livre, mas houve uma inibição da enzima imobilizada. Esses resultados foram satisfatórios quando comparado ao obtido de Chauhan e colaboradores (2015), que verificaram a inibição de uma pectinase imobilizada em celite na presença de ácido cumárico e ferúlico.

4.7. Caracterização física da enzima imobilizada: Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Em imobilização enzimática, as caracterizações física e biofísica da amostra auxiliam na constatação e entendimento do processo de imobilização. Através de análises de microscopia é possível verificar se a imobilização da enzima ao suporte de fato ocorreu. Já por meio das análises de espectroscopia é possível avaliar quais as bases físico-químicas do processo de imobilização.

Foram realizadas tentativas de análise por espectroscopia Raman, de infravermelho, espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, a microscopia foi a única análise cujo foi possível obter-se dados, embora poucas conclusões possam ser feitas a partir dela.

A Figura 24 apresenta as imagens de MEV das amostras do suporte MANAE-agarose e da enzima imobilizada ao MANAE.

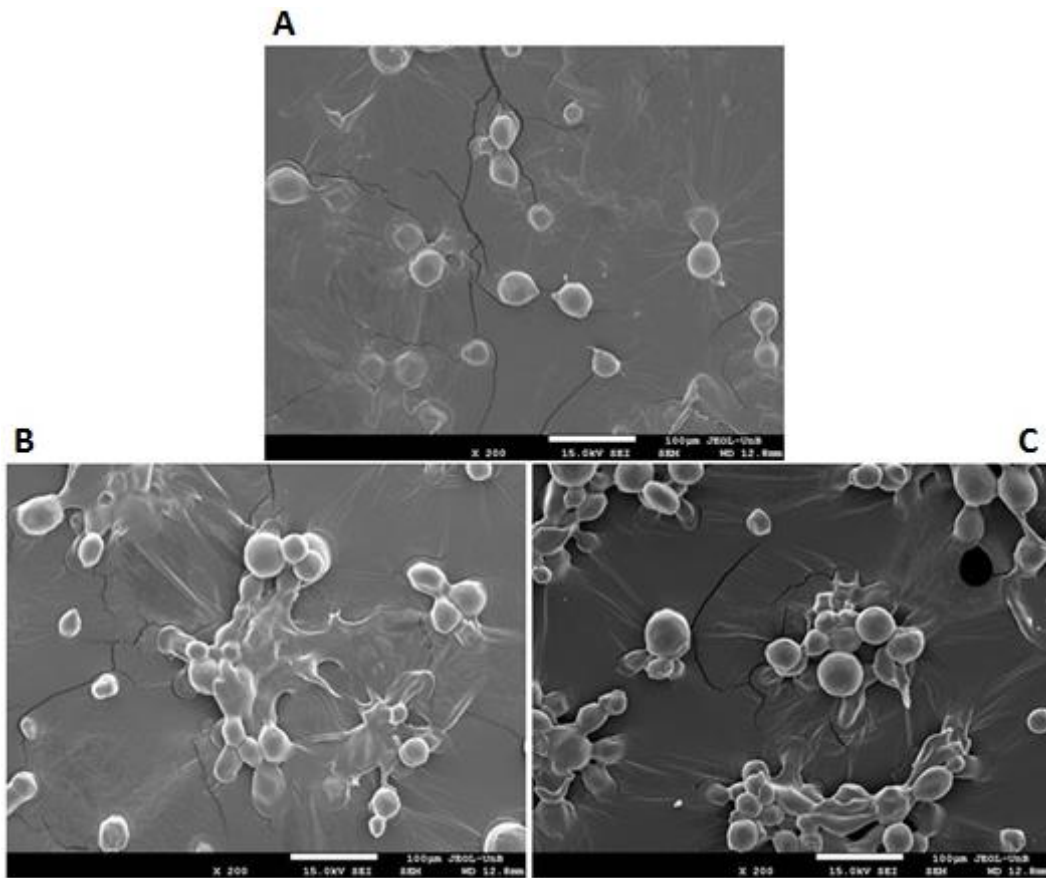


Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras. (A) Suporte MANAE-agarose, (B) Extrato bruto de *A. terreus* imobilizado em MANAE-agarose, (C) Pectinase parcialmente purificada imobilizada em MANAE-agarose.

Na Figura 24 A é possível notar a presença de estruturas esféricas, polidispersas e com distribuição heterogênea de tamanho. Essas estruturas correspondem ao suporte MANAE, cujo a base principal é uma matriz de Sepharose organizada em forma de microesferas. Já nas Figura 24 B e C observa-se que essas estruturas estão organizadas de forma diferente, formando espécies de agregados. Essas imagens correspondem às amostras de enzima imobilizada ao suporte MANAE. Sugere-se que a nova estrutura organizacional das partículas seja devido ao processo de imobilização, onde a interação de cargas entre enzimas e suporte proporciona a formação espécies de agregados. Entretanto não é possível confirmar essa hipótese somente pelas micrografias.

A literatura sugere que as enzimas, quando imobilizadas, tendem a modificar a distribuição de tamanho das partículas do suporte e sua morfologia (MOHAMAD *et al.*, 2015). Como a microscopia eletrônica de varredura não dispõe de resolução suficiente para detectar a presença de enzimas ligadas ao suporte, à caracterização da imobilização é feita indiretamente através das análises de distribuição de tamanho e morfologia do suporte de imobilização. Entretanto, essas análises não podem ser aplicadas para o presente estudo, pois o próprio suporte de imobilização possui uma distribuição de tamanho e morfologia extremamente heterogênea, tornando a metodologia inadequada para qualquer tipo de conclusão contundente.

4.8. Hidrólise enzimática

A Figura 25 apresenta o perfil de hidrólise enzimática da pectina de casca de frutas cítricas, utilizando a amostra de pectinase do extrato bruto de *A. terreus* livre e imobilizada em MANAE-agarose.

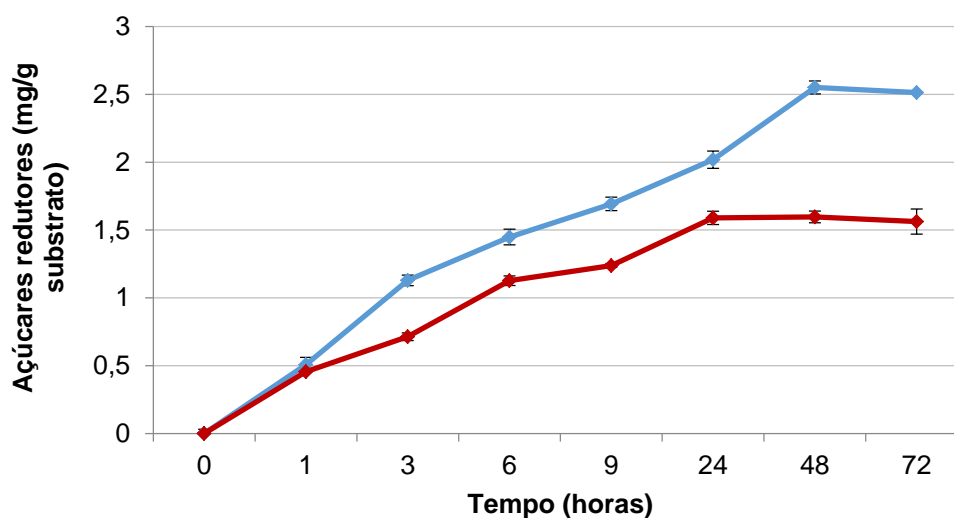


Figura 25 – Perfil de hidrólise enzimática da pectinase do extrato bruto de *A. terreus* livre (—●—) e imobilizada em MANAE-agarose (—●—).

Primeiramente, é possível notar que o perfil de liberação de açúcares pela enzima livre e imobilizada segue um padrão similar. Há uma liberação quase linear nas primeiras horas de hidrólise, com posterior estabilização a partir de 24-48 horas. Malgas e colaboradores (2017) sugerem que esse

perfil inicial de aumento linear seja devido ao alto nível de cooperação sinérgica entre enzimas que ocorre nos momentos iniciais da hidrólise. No estágio final, essa sinergia tende a diminuir devido à alta disponibilidade de locais para ligação das enzimas ao substrato, estabilizando a curva de liberação de açúcares.

Observa-se que a pectinase livre apresentou uma liberação de açúcares redutores estatisticamente maiores que a enzima imobilizada em todos os intervalos de tempo ($p < 0,05$). No entanto, considerando o pico máximo de liberação de açúcares, nota-se que a enzima imobilizada atingiu sua liberação máxima em 24 horas, com uma taxa de 0,065 mg de açúcar por hora, enquanto a enzima livre atingiu esse pico com o dobro do tempo (48 horas), e com uma taxa menor, de 0,053 mg de açúcar por hora. Dessa forma, por mais que a enzima imobilizada tenha produzido uma quantidade total de açúcares inferior, ela atingiu seu pico máximo de liberação mais rapidamente, sendo 22% mais eficiente em termos de velocidade de produção. Para a indústria é extremamente importante a utilização de enzimas que proporcionem uma hidrólise rápida, com alto rendimento, eficiência, e baixo custo (VAN DYK *and* PLETSCHKE, 2012; HU *et al.*, 2011)

4.9. Teste de reuso da enzima imobilizada

O reuso de enzimas durante o procedimento de biocatálise é um dos pontos cruciais para a ampla utilização da tecnologia enzimática na indústria. A reciclagem das enzimas promove uma redução efetiva nos custos globais do processo de catálise enzimática, tornando mais viável a aplicação de enzimas na indústria (KAWAGUTI *et al.*, 2006).

Nesse contexto, foram realizados testes de reutilização da pectinase do extrato bruto de *A. terreus* imobilizada ao suporte MANAE-agarose (Figura 26).

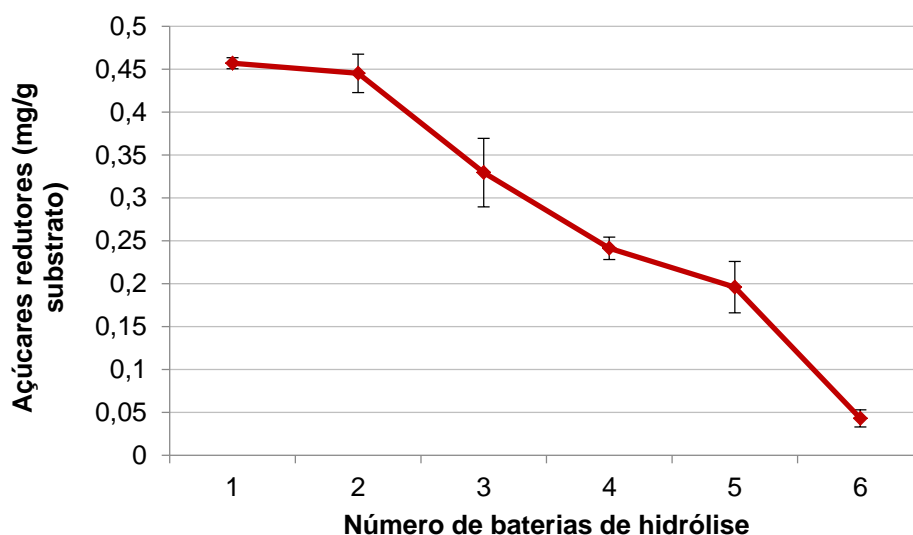


Figura 26 - Experimento de reuso da pectinase do extrato bruto de *A. terreus* imobilizada em MANAE-agarose (—●—).

Nota-se que foi possível realizar 6 ciclos de hidrólise com a enzima imobilizada, podendo-se reutilizar a enzima até 4 vezes com efetiva produção de açúcares redutores. A enzima não imobilizada só pôde ser utilizada em um ciclo de hidrólise, não podendo ser recuperada posteriormente. Como apresentado nos resultados do tópico 4.8, a produção de açúcares redutores pela enzima livre após 1 hora de hidrólise, foi de apenas 0,50 mg/g de substrato. Somados todos os ciclos de reuso, a enzima imobilizada foi capaz de produzir 1,71 mg de açúcares redutores por grama de substrato. Isso representa um aumento de aproximadamente 242% na produção final de açúcares redutores.

Oliveira e colaboradores (2018) realizaram um estudo de imobilização de uma pectinase de *A. aculeatus* em suportes de alginato. Eles relataram 6 ciclos de reuso da enzima imobilizada com retenção de atividade de até 50%. Sojitra e colaboradores (2017) imobilizaram uma pectinase em nanopartículas magnéticas de quitosana e reportaram uma atividade residual de até 85% após 7 ciclos de reuso da enzima. No entanto, nenhum dos estudos analisou e comparou a liberação de açúcares redutores entre enzima livre e imobilizada.

Os resultados aqui obtidos revelam um grande potencial de utilização da pectinase imobilizada em MANAE-agarose em processos industriais, uma

vez que foi possível reutilizar a enzima por até 6 ciclos de hidrólise com aumento significativo na produção de açúcares redutores.

4.10. Redução da viscosidade de polpa de suco de goiaba

As pectinases são enzimas amplamente empregadas nas indústrias de alimentos. Elas são extremamente úteis no processamento de frutas e vegetais, auxiliando nos processos de extração, maceração, liquefação e clarificação, promovendo a redução de viscosidade de polpas, sucos e néctar (NAIDU *and* PANDA, 1998). A redução da viscosidade também pode ser utilizada com técnica de presunção da atividade pectinolítica (MAIORANO *et al.*, 1976). A partir desse cenário, foram realizados testes de redução de viscosidade da polpa do suco de goiaba utilizando as enzimas livre e imobilizada, visando uma possível aplicação na indústria de sucos e bebidas (Tabela 11). O pH inicial da polpa de goiaba era 4,05.

Tabela 11 - Avaliação da redução da viscosidade da polpa de goiaba utilizando a pectinase do extrato bruto de *A. terreus* livre (PECEB) e imobilizada em MANAE-agarose (PECEB-MANAE) nas concentrações de 5 U de pectinase e 50 µg de proteínas.

Amostra	Antes tratamento (Cp)	Após tratamento (Cp)
Controle ^a	1016 ± 8	1005 ± 9
5 U		
PECEB ^b	996 ± 6	669 ± 10 *
PECEB-MANAE ^c	1008 ± 6	537 ± 6 *
50 µg		
PECEB ^a	1003 ± 8	978 ± 8
PECEB-MANAE ^d	1007 ± 8	740 ± 9 *

* Indica a diferença estatística na redução de viscosidade antes e após o tratamento enzimático (teste t de Student pareado, com intervalo de confiança de 95%).

^{a,b,c,d} Indicam diferença estatística na redução de viscosidade entre as amostras. Letras iguais significam que não houve diferença estatística, letras diferentes indicam que houve diferença (teste ANOVA *one-way* e post-hoc teste Tukey, com intervalo de confiança de 95%).

O teste t de Student pareado revelou que após o tratamento enzimático houve uma redução de viscosidade significativa ($p < 0,05$) na maioria das

amostras, exceto no controle e na amostra de pectinase do extrato bruto utilizando 50 µg de proteína. Na amostra de controle as enzimas foram substituídas por tampão fosfato de sódio pH7, e desta forma pode-se concluir que a incubação a 40°C é uma variável que não contribuiu para a diminuição da viscosidade do suco, de modo que a redução observada para as outras amostras foram, de fato, devido a ação das enzimas pectinolíticas. Resumindo, na maioria das amostras enzimáticas, livre ou imobilizada, houve uma redução de viscosidade representativa, confirmando o potencial de utilização dessas enzimas na indústria de sucos e bebidas.

As análises de ANOVA *one-way* e post-hoc teste de Tukey revelaram se houve diferença estatística na redução de viscosidade entre as amostras do controle, enzima livre e imobilizada. Não houve diferença significativa entre o controle e a amostra de pectinase do extrato bruto livre utilizando 50 µg de proteínas, no entanto, essas amostras se diferiram das demais.

As amostras de PECEB livre e imobilizada utilizando 5U de enzima, e PECEB imobilizada utilizando 50 µg de proteína também apresentaram divergência estatística entre elas. Comparando enzima livre e imobilizada, foi possível notar que houve uma maior redução de viscosidade quando utilizada as enzimas imobilizadas ($p < 0,05$). A partir desse dado é possível afirmar que a imobilização proporcionou uma maior produtividade ao processo, o que torna a tecnologia de imobilização uma ferramenta passível de aplicação em indústrias de sucos e bebidas.

Outra análise importante diz respeito à padronização da carga de enzima/proteína utilizada no tratamento. Nas amostras em que foi utilizada 5 unidades da pectinase houve maior redução de viscosidade que nas amostras onde foi utilizada 50 µg de proteínas ($p < 0,05$). Esse resultado é consequência do fato de que quando se padroniza o tratamento por carga de proteínas, existem outras enzimas não pectinolíticas na amostra, de modo que a proporção de pectinases diminui, culminando numa menor redução de viscosidade da polpa. Dessa forma, é possível concluir que a padronização de carga por unidades de enzima é mais efetiva no processo de redução de viscosidade.

A amostra que gerou uma maior redução de viscosidade da polpa foi a pectinase do extrato bruto imobilizada em MANAE-agarose utilizando 5 U da

enzima. Nesse caso houve uma redução de viscosidade de aproximadamente 47%. Alzate e Vargas (2002) imobilizaram uma preparação comercial a base de pectinase em suporte de quitina. Eles analisaram o perfil de redução de viscosidade da polpa de goiaba utilizando enzima livre e imobilizada. Ao contrário do presente estudo, eles relataram uma maior redução de viscosidade utilizando a enzima livre. Além disso, após 1 hora de incubação, a enzima imobilizada proporcionou uma redução de apenas 40% na viscosidade da polpa.

Os resultados aqui apresentados revelam um potencial de aplicação das enzimas imobilizadas em MANAE-agarose na indústria de sucos e bebidas diversas.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Diante dos resultados apresentados e discutidos é possível constatar que a imobilização da pectinase em MANAE-agarose de fato proporcionou a otimização de algumas características bioquímicas da enzima, modificando seu comportamento. Além disso, foi possível reutilizar a enzima imobilizada em até 6 ciclos de hidrólise. Como perspectivas futuras propõe-se otimizar o processo de reuso do enzima, visando a promoção de sistemas mais eficientes e com menor perda de enzimas. Para isso sugere-se a realização de estudos de dessorção da enzima em diferentes pH's, e a criação de sistemas mistos de imobilização, utilizando o glutaraldeído, de forma a se alcançar sistemas mais estáveis. Com relação aos experimentos de aplicação industrial, foi possível constatar que a plataforma de imobilização proposta obteve relativo sucesso na redução de viscosidade da polpa de goiaba. Como perspectivas, sugere-se a realização de testes de reuso da enzima imobilizada na redução de viscosidade da polpa de goiaba. Por fim, conclui-se que a plataforma de imobilização estudada apresenta um potencial para aplicação na indústria. Adicionalmente, para uma real aplicação industrial da plataforma de imobilização, serão necessários experimentos de toxicidade do suporte de imobilização.

6. Referências

ALZATE, L. R. R.; VARGAS, F. J. A. **Inmovilizacion de pectinasas y/o celulasas y determinacion de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba**, 2002. Universidad Nacional de Colombia.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, 1996.

CELESTINO, S. M. C.; MARIA DE FREITAS, S.; JAVIER MEDRANO, F.; VALLE DE SOUSA, M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33–42, 2006.

CERRETI M.; MARKOSOVA, K.; ESTI, M.; ROSENBERG, M. Immobilisation of pectinases into PVA gel for fruit juice application. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2, p. 531-539, 2017.

CHAUHAN, S.; VOHRA, A.; LAKHANPAL, A.; GUPTA, R. Immobilization of a commercial pectinase (polygalacturonase) on Celite and Its application in juice clarification. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2135-2141, 2015.

COONEY, M. Kinetic measurements for enzyme immobilization. **Methods of Molecular Biology**, v. 679, p. 207-225, 2011.

DAI, X.; KONG, L.; WANG, X.; ZHU, Q.; CHEN, K.; ZHOU, T. Preparation, characterization and catalytic behavior of pectinase covalently immobilized onto sodium alginate/graphene oxide composite beads. **Food Chemistry**, v. 253, p. 185-193, 2018.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6437-6474, 2013.

ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065-2082, 2015.

GAMBLE, G.; SNOOK, M.; HENRIKSSON, G.; AKIN, D. Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 9, p. 741-746, 2000.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. New Jersey: Humana Press, 2006. 449 p.

HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHOE, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. In solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 102-110, 2012.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanases: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

JARAMILLO, P. M. D.; ANDREAUS, J.; NETO, G. P. S.; CASTRO, C. F. S.; FILHO, E. X. F. The characterization of a pectin-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae* grown on passion fruit peel as the carbon source and the evaluation of its potential for industrial applications. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, p. 310-322, 2015.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KAWAGUTI, H. Y.; MANRICH, E.; SATO, H. H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 270-277, 2006.

KIM J. B.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.

KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFER, W.; VRSANSKÁ, M.; et al. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 3, p. 390–401, 2006.

KOBAYASHI, T.; HIGAKI, N.; SUZUMATSU, A.; et al. Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 1, p. 70–75, 2001.

KROLL, J.; RAWEL, H. M.; ROHN, S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 3, p. 205-218, 2003.

LEATHERBARROW R.J. Enzfitter Manual, a non-linear curve fitting program for Windows. Biosoft: London, 1999.

LOPINA, O. D. **Enzyme Inhibitors and Activators**. In: Enzyme Inhibitors and Activators, Murat Senturk, IntechOpen, 2016.

MAIORANO, A. E. E.; OGAKI, Y.; SCHMIDELL, W.; MAIORANO, E.; MATERIALS, D. Short Communication : Determination from different microorganisms of the enzymatic activity of pectinases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 355–356, 1976.

MALGAS, S.; THORESEN, M.; VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. Time dependence of enzymes synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, n. April, p. 1-11, 2017.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHAMAD, N. R.; MARKUZI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

NAIDU, G. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes- a review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 355–361, 1998.

NEIRA, H. D.; HERR, A. E. Kinetic Analysis of Enzymes Immobilized in Porous Film Arrays. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 19, p. 10311-10320, 2017.

OLIVEIRA, R. L.; DIAS, J. L.; SILVA, O. S.; PORTO, A. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9-18, 2018.

RAJDEO, K.; HARINI, T.; LAVANYA, K.; FADNAVIS, N. W. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. **Food and Bioproducts Processing**, 2016.

RASHAD, M. M.; ABDU, H. M.; SHOUSA, W. G. H.; ALI, M. M.; EL-SAYED, N. N. Purification and Characterization of the Pectin Lyase Produced by *Pleurotus ostreatus* Grown on Lemon Pulp Waste. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 8, p. 1377–1384, 2011.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.

SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ACAR, J.; MUTHU, M. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 4, p. 271-274, 2001.

SAXENA, S.; SHUKLA, S.; THAKUR, A.; GUPTA, R. Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. **Acta Microbiology and Immunology**, v. 55, p. 33–51, 2008.

SHANMUGAM, S.; SATHISHKUMAR, T. **Enzyme technology**. New Dehli: I. K. International Publishing House Pvt, 2009. 110p.

SPINELLI, D.; FATARELLA, E.; DI MICHELE, A.; POGNI, R. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v. 48 n. 2, p. 218-223, 2013.

SOJITRA, U. V.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 677-685, 2017.

SURAJBHAN, S.; ALKA, S.; CHETAN, J.; LAMBERT, R. Extraction and Optimization of Guava Juice by Using Response Surface Methodology. **American Journal of Food Technology**, v. 7, n. 6, p. 326–339, 2012.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

WANG, L.; WEI, L.; CHEN, Y.; JIANG, R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 57-63, 2010.

WU, H.-S.; LUO, J.; RAZA, W.; LIU, Y.-X.; GU, M.; CHEN, G.; HU, X.-F.; WANG, J.-H.; MAO, Z.-S.; SHEN, Q.-R. Effect of exogenously added ferulic acid on in vitro *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 4, p. 448-453, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho objetivou o estudo de imobilização de enzimas visando o potencial de aplicação dessa plataforma nas indústrias. Através dos experimentos de produção e purificação parcial da enzima, e dos testes de triagem do suporte de imobilização, foi possível eleger a pectinase e o suporte MANAE-agarose como objetos de estudo.

A base principal do trabalho focou na comparação das características e do comportamento apresentado pela enzima livre e imobilizada. Após as análises foi possível constatar que o processo de imobilização proporcionou uma mudança no comportamento da enzima frente ao pH, temperatura e termoestabilidade.

A enzima imobilizada apresentou uma modificação no seu pH de maior atividade, alterando as condições ótimas de neutras para ácidas. Esse comportamento é muito útil para a aplicação das enzimas em processos que necessitam de pH's mais ácidos, como por exemplo na redução de viscosidade e clarificação de bebidas ácidas, como sucos de frutas cítricas e vinhos. Após o processo de imobilização a enzima também alterou sua temperatura de maior atividade em 5°C (de 60°C para 65°C), e melhorou em até 200% sua termoestabilidade a 40°C, características que podem ser primordiais para procedimentos que necessitem de alta temperatura e prolongado tempo de reação.

Por fim, os estudos de aplicação industrial revelaram um potencial de utilização da enzima imobilizada na redução de viscosidade de polpas e sucos de frutas. A enzima imobilizada proporcionou uma redução da viscosidade da polpa de goiaba em aproximadamente 47%, além de ter sido estatisticamente mais eficiente que seu homólogo livre.

De fato, a tecnologia de imobilização parece ser muito promissora para aplicação na indústria, entretanto para um cenário mais realístico são necessários estudos adicionais que possam avaliar a eficiência da plataforma em escala industrial, além de testes de avaliação da toxicidade do suporte de imobilização.

ANEXO I

O Anexo I apresenta um artigo de revisão publicado em 2018, na revista *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, fator de impacto 3,69 (Qualis A2). A revisão aborda o conceito de biorrefinaria, focando principalmente nas que utilizam a biomassa e empregam a tecnologia enzimática em sua planta. O artigo apresenta um panorama global e o status das atuais biorrefinarias no mundo. São discutidos os principais desafios enfrentados para o amplo emprego da tecnologia enzimática nessas indústrias, e são apresentadas as mais promissoras abordagens para superação dos mesmos. Nesse contexto, a imobilização enzimática é proposta como uma potencial ferramenta para aumento da produtividade e diminuição dos custos globais dos processos em biorrefinaria. Por fim, é proposto um modelo ideal de biorrefinaria integrada, dentro do conceito de economia circular.

Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept

Caio O.G. Silva[†], Raissa P. Vaz[†] and Edivaldo X.F. Filho,[✉] Laboratory of Enzymology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brazil

Received April 20, 2017; revised August 22, 2017; accepted September 13, 2017

View online at Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com);

DOI: 10.1002/bbb.1832; *Biofuels, Bioprod. Bioref.* (2017)

Abstract: Recent decades have seen the growth of immense interest in lignocellulosic biomass conversion technologies. This interest is motivated by their huge potential for energy and bioproduct generation and reduced dependency on non-renewable feedstocks, leading to improved air quality and reduced emission of greenhouse gases. It is in this context that the lignocellulose biorefinery concept arises. Among the lignocellulose conversion technologies available, enzymatic conversion has emerged as a promising candidate, since it represents a biomass management approach that integrates recycling and remediation in an environmentally friendly manner. Although already in existence, biorefineries employing enzymatic conversion of lignocellulose are at an incipient stage. There remain many operational difficulties, resulting in a very costly overall process that is reflected in product price, reducing market competitiveness. Therefore, much research is still needed to improve the operational and financial feasibility of this process. This paper covers general biorefinery concepts, as well as new and associated concepts, such as the circular economy, bioeconomy, and waste biorefinery. Subsequently, the global outlook, including examples of currently existing enzyme-based lignocellulose biorefineries and their status, is described. The main technical and economic challenges are also discussed, and various potential tools for the optimization of biomass degradation in enzyme-based biorefineries are presented. Finally, the future perspectives for the sector are considered, and models of the ideal biorefinery and globally integrated biorefinery hubs are proposed. These models may contribute to the future establishment of such biorefineries as competitive industries, consistent with the sustainable bioelectro economy paradigm. © 2017 Society of Chemical Industry and John Wiley & Sons, Ltd

Keywords: circular economy; bioeconomy; biorefinery hubs; lignocellulolytic enzymes; omics approaches; enzyme cocktails

Correspondence to: Edivaldo X.F. Filho, Laboratory of Enzymology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Zip Code 70910-900, Brazil. E-mail: eximenes.1@gmail.com

[†]These authors contributed equally to this work

Introduction

The lignocellulosic biorefinery concept is a viable alternative approach for the effective conversion of biomass feedstock.¹ Enzyme action is essential in this process, and the enzymatic conversion of renewable lignocellulosic biomass to biofuel and value-added products entails a number of challenges, including the improvement of enzymatic hydrolysis via enzyme efficiency, the reduction of enzyme production cost, and the use of novel substrate handling technology.¹⁻³ A consortium of enzymes with different specificities (lytic polysaccharide monooxygenases [LPMOs], ligninases, cellobiose dehydrogenases [CDHs], hemicellulases, and cellulases) and other proteins (swollenins and expansins) is required to completely break down the lignocellulosic structure of the plant cell wall.⁴

This enzymatic method is also consistent with the new paradigm of a sustainable bioelectro economy.⁵ Analogous to the waste biorefinery concept, enzymes can be employed in a holistic approach to lignocellulosic biomass management, integrating remediation and resource recovery (bioproducts and biofuels) through a closed-loop bioprocess cascade, enabling the shift towards a circular, low-carbon bioeconomy. In this circular economy model, lignocellulosic materials are recovered and recycled for repeated use.⁶ This holistic perspective necessitates the management of several parameters, such as feedstock storage and handling; pre-treatment; saccharification and fermentation; recovery of ethanol, water, and solids; and waste-water treatment. According to Cheng *et al.*,⁷ the optimal design of the lignocellulose conversion process is achieved by choosing an effective technology for each step based on a specific objective. Within this context, several factors affect the enzymatic step of lignocellulose conversion, including enzyme ratios, synergistic cooperation between enzymes, substrate loading, enzyme loading, inhibitors, adsorption, and surfactants.⁴ In addition, pre-treatment of lignocellulose is key to the enhancement of substrate accessibility and enzyme hydrolytic action during saccharification.⁸

Interests in the conversion of lignocellulosic biomass have been triggered by the demand for sustainable and environmentally sound sources of fuel and energy. In this review, we describe the technical and systematic approaches by which enzyme-based lignocellulose biorefining can overcome the challenges it faces, including making it economically viable for optimization at small and large scales. Our coverage of this subject incorporates several potential tools for optimizing biomass degradation in enzyme-based biorefineries and the overall prospects

for this industry. Finally, a model of biorefinery is proposed, along with an outline of the global biorefinery hub.

The biorefinery

Although the term 'biorefinery' has only begun to be used in recent decades, it is not an entirely new concept. Many traditional biomass conversion technologies can be considered biorefineries, at least in part.⁹ However, environmental and economic factors (e.g. global warming, scarcity of fossil resources, and energy crises) have led to the more specific use of this term, in a manner emphasizing the sustainability aspect.

Although the biorefinery concept seems broad, it is in fact relatively simple. According to IEA Bioenergy,¹⁰ biorefining is the sustainable processing of biomass into a wide spectrum of marketable products and energy. Thus, a biorefinery can be an installation, a process, a plant, or a set of facilities; however, all must take a holistic approach to environmental, economic, and social sustainability.¹¹

Lignocellulosic feedstock biorefinery

The lignocellulosic feedstock biorefinery refines lignocellulosic biomass into intermediates (cellulose, hemicellulose, and lignin) and subsequently processes these into value-added products and energy.¹²⁻¹⁴ The lignocellulosic biomass conversion process involves five important steps: choice of appropriate biomass, choice of pre-treatment approach, biomass conversion into pentoses and hexoses, sugar fermentation, and downstream processing.³ All steps should be planned and optimized according to the specific process goal.

Essentially, biomass is pre-treated with agents that result in the release of cellulose, hemicellulose, and lignin. Cellulose and hemicellulose are then converted primarily into glucose (C6), mannose (C6), xylose (C5), arabinose (C5), and galactose (C6). These sugars may be the end product or can be used as raw material in fermentation for the synthesis of biofuels (e.g. ethanol, butanol, and hydrogen) and chemicals (e.g. alcohol, fatty and organic acids, and amino acids). Lignin and its by-products can be utilized for the production of heat, electricity, and chemicals, including phenolic compounds and polymers, among others.¹⁴⁻¹⁶ Thus, lignocellulosic feedstock biorefining has the potential to integrate several bioprocesses for simultaneous production of energy and various products. This optimized process is therefore socially, economically, and environmentally sustainable.

Enzyme-based lignocellulose biorefineries

Enzymatic hydrolysis of lignocellulose into sugar monomers has emerged as the most efficient biomass conversion technology. Synergistic degradation of lignocellulosic biomass components is achieved using an enzyme consortium incorporating different specificities (i.e., cellulases, hemicellulases, LPMOs, ligninases, and CDHs), in combination with other proteins (swollenins and expansins).⁴

The results of enzymatic hydrolysis can serve as value-added products or may be subjected to subsequent microbial fermentation.^{12,14} This stage of the process fits within the concept of white biotechnology, which employs microorganisms and enzymes to convert bioresources into industrial products with minimal energy expenditure and waste.¹⁷ Several processes can be used for lignocellulose bioconversion and fermentation, including consolidated bioprocessing (CBP), separate hydrolysis and fermentation, simultaneous saccharification and fermentation. CBP is considered the most efficient technique and economically viable, since it avoids the substantial costs due to the addition of enzymes. However, for CBP to be a cost-competitive process, it is necessary to develop optimized micro-organisms, which represents a challenge for metabolic engineering.^{18–20}

Global overview of lignocellulose enzymatic conversion biorefineries

Biorefineries demonstrate great potential to increase the competitiveness and wealth of industrialized and developing countries, while meeting the need for sustainable energy and product supply. New job opportunities, skills, markets, policies, and initiatives may result from the development of this industry.¹⁰

Table 1 displays several global examples of biorefineries based on enzymatic conversion of lignocellulose, showing feedstock type, products, and scale. The majority of these data have been published in IEA Bioenergy country reports.²¹ From the information in Table 1 and these sources, it is possible to make some pertinent observations concerning the current worldwide array of biorefineries. Although many biorefineries are in operation, most are situated within Europe. A large number of developing countries are potentially highly suited to the installation and operation of biorefineries due to the large availability of lignocellulose feedstocks, but they do not have technology and investments sufficient for development of such projects. It is also noteworthy that the majority of biorefineries in operation focus on the generation of a single

product, bioethanol, with few creating other bioproducts or exploiting the full energy potential of lignocellulose. In addition, most biorefineries still operate far from their maximum production capacity. Concerning conversion technology, all of the biorefineries under discussion employ enzymatic conversion, and the majority are supplied with enzymes by Novozymes.

Biorefineries employing enzymatic conversion of lignocellulose are thus already a reality and demonstrate great potential. One successful example is the Beta Renewables commercial-scale cellulosic ethanol plant in Crescentino, Italy, which is currently the largest cellulosic ethanol refinery in the world, producing 75 million liters of cellulosic ethanol per year. This plant is based on the patented PROESATM process and uses enzymes provided by Novozymes for conversion of wheat straw, rice straw, and *Arundo donax* L. to ethanol. The process also involves the use of lignin in a connected electric power plant, that generates energy for biorefinery installations, with any excess being sold to the local grid (the circular economy concept).

The current status of biorefineries in operation in Brazil is exemplified by two large facilities, the GranBio and Raizen/Iogen cellulosic ethanol plants in Alagoas and São Paulo, respectively. The GranBio plant was the first Brazilian cellulosic ethanol plant to start operations, in September 2014. It uses bagasse and sugarcane straw as feedstock and employs Beta Renewables/Biochemtex PROESATM technology and Novozymes enzymes, for a current production capacity of 83.3 million liters of ethanol per year. A few months after the launch of GranBio's operation, the Raizen/Iogen plant began production, in December 2014. This plant uses Iogen Energy technology to convert sugarcane bagasse into ethanol and the enzymes also being supplied by Novozymes. Raizen plans to produce up to 1 billion liters of cellulosic biofuel from bagasse and straw by 2024.²²

Challenges in lignocellulose enzymatic conversion biorefining

Although lignocellulosic biomass has immense potential, the reality of lignocellulosic biorefinery operation involves many challenges. Recently, several technologies have been developed to improve conversion processes; however, the current goal is to make this system cost-competitive.²⁵

The first major challenge is overcoming biomass recalcitrance, a consequence of the properties of plant tissue that represents the major cost of conversion process. Obstacles related to biomass recalcitrance primarily concern the separation and removal of lignin, breakdown of lignin's structure and its strong bond with other biomass compo-

Table 1. Examples of lignocellulose biorefineries based on enzymatic conversion.

Company/Organization	Feedstock	Products	Location	Scale	Reference
BioGasol and Estibio	Straw and agricultural residues	Bioethanol, biomethane	Ballerup, Denmark	Pilot plant	IEA ²¹
Dong Energy (Inbicon)	Straw, corn stover, bagasse	Bioethanol, animal feed, electricity, heat	Kalundborg, Denmark	Demonstration plant	IEA ²¹
REnescience	Municipal waste	Biogas, heat, power, fertilizer	Copenhagen, Denmark	Pilot plant	IEA ²¹
Cometha Project	Lignocellulose	Bioethanol	Porto Marghera, Italy	Industrial-scale pre-commercial plant	Biofuels ²²
DuPont	Corn stover	Bioethanol	Iowa, USA	Commercial scale and pilot plant	Biofuels ²²
Clariant	Wheat straw	Bioethanol, energy	Switzerland	Demonstration plant	Biofuels ²²
Futuro (Pomacle Bazancourt Biorefinery)	Agricultural and forest residues, straws	Bioethanol	France	Pre-industrial pilot plant	Biofuels ²²
Raizen	Sugarcane bagasse and straw	Bioethanol	Piracicaba, Brazil	Commercial scale	Biofuels ²²
Beta Renewables (Crescentino Project)	<i>Arundo donax</i> , agricultural residues, wood biomass, bagasse	Bioethanol, energy	Crescentino, Italy	Industrial demonstration plant	IEA ²¹
NEDO	Sugarcane bagasse	Bioethanol	Thailand	Demonstration and pilot plant	IEA ²¹
GranBio (Bioflex 1)	Sugarcane straw	Bioethanol, biochemicals	Alagoas, Brazil	Commercial scale	Biofuels ²²
POET-DSM Advanced Biofuels (Project Liberty)	Corn stover	Bioethanol	Iowa, USA	Commercial scale	IEA ²¹
Suomen Bioetanoli Oy	Lignocellulose	Bioethanol	Myllykoski, Finland	-	Biofuels ²²
Chempolis Biorefinery	Straw and bagasse	Bioethanol	Finland	Commercial scale	Biofuels ²²
NREL Biochemical Pilot Plant	Wide range of lignocellulosic biomass	Biofuels, chemicals, materials	Colorado, USA	Pilot plant	National Renewable Energy Laboratory ²³
Stan Mayfield Biorefinery Pilot Plant	Wide range of lignocellulosic biomass	Biofuels, organic acids	Florida, USA	Pilot plant	Florida Center for Renewable Chemicals and Fuels ²⁴

nents, removal and breakdown of hemicellulose, reduction of cellulose crystallinity and polymerization, and reduction of particle size.^{4,12} All such barriers can be minimized with the use of pre-treatment processes. However, in order to select the most appropriate approach, it is necessary to consider feedstock type, economic viability, and environmental impact. Pre-treatment itself is highly costly, and attendant pre- and post-pre-treatment operations (such as treatment of solid waste and wastewater, and handling and disposal of by-products) exponentially increase cost.³

The second key challenge in lignocellulose biorefining is the need for more efficient, robust, and low-cost enzymatic conversion processes.¹² It is estimated that in the case of second-generation ethanol biorefineries, enzyme represents approximately 28% of the overall cost of generating cellulosic ethanol.²⁶ This expense is extremely high and compromises market competitiveness; therefore, natural enzyme properties need to be modulated in order to increase productivity and reduce costs.²⁷ The development of mechanisms that allow low loading and reuse

of enzymes should also be considered, always with cost reduction in mind.²⁸

Omics approaches for the screening of lignocellulolytic micro-organisms and enzymes

The economic feasibility of enzyme-based lignocellulose biorefineries requires, among other things, the development of more efficient and optimized enzyme cocktails, diminishing reliance on expensive biomass pre-treatment and the high protein loadings currently used for biomass hydrolysis. A key strategy in the development of effective enzyme cocktails involves deeper exploration of natural biomass utilization systems, comprising individual micro-organisms and microbial consortia that have evolved the ability to overcome lignocellulose recalcitrance through cooperative enzyme action.²⁹

Lignocellulolytic microbial communities, both from aerobic and anaerobic environments, such as those found in soil, compost, rumen, manure, insect guts, mammal guts, and biogas reactors, represent an inter-taxonomic effort to degrade lignocellulose, and harbor a vast set of genes responsible for biomass utilization. Micro-organisms are regarded as reservoirs of plant cell wall-degrading enzymes with great potential in biorefining applications and possible sources of novel strategies and mechanisms for efficient biomass conversion.³⁰ Multi-omics approaches, including genomics, transcriptomics, and proteomics, enable the high-throughput characterization of lignocellulolytic systems, whether isolated species or complex environmental microbial communities, and increase our understanding of the diverse molecular mechanisms underlying lignocellulose breakdown, which is fundamental for the development of enzyme platforms for biorefineries.^{29,32}

Genomics and metagenomics

High-throughput technologies have enabled sequencing of the whole genomes of individual species and, more interestingly, environmental microbial DNA in a method known as metagenomics.³³ Genomes and metagenomes reveal the potential of individual species, taxonomic groups, and microbial communities to perform particular physiological functions of interest to biorefining, such as holocellulose and lignin breakdown, detoxification of pre-treatment-derived by-products, uptake and metabolism of carbohydrates other than glucose (such as pentoses

and uronic acids), and biosynthesis of value-added products.^{33,34} Once correctly annotated using bioinformatic tools, genomic and metagenomic sequence data include a vast catalog of genes involved in lignocellulose breakdown, along with their taxonomic origins, available for the development of enzyme cocktails.²⁹ In addition, adapting a microbial consortium isolated from the environment to a biorefinery setting, for example, by using culture media containing raw or pre-treated lignocellulosic feedstocks, may be used to identify taxons and enzymes better suited for the breakdown of such materials.

For instance, a metagenomic approach was used to assess the taxonomic structure of a corn-stover-adapted microbial consortium isolated from a compost ecosystem. Members of the bacterial phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes* were found to be prevalent, and each was associated with a metabolic niche within the consortium. Due to greater assignment of (hemi)cellulolytic GHs to members of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, it was concluded that such bacteria act mainly on corn stover holocellulose, while *Proteobacteria* genes were primarily associated with lignin degradation.³⁵ Similarly, an anaerobic biogas fermenter fed with agricultural wastes was also shown to be populated by *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, with the former predominating.³⁶ As demonstrated in several previous reports, microbial consortia associated with biogas digesters often exhibit a lower lignocellulolytic capacity than natural biomass utilization communities, such as those found in rumen or manure. It was proposed that this reduced hydrolytic potential is due to the relatively low abundance of *Bacteroidetes* bacteria, which are outcompeted by *Firmicutes* species in biogas fermenters, in contrast to the more balanced ratio present in environmental samples.³⁶

A new strategy for polysaccharide breakdown and utilization employed by anaerobic gram-negative bacteria of the phylum *Bacteroidetes* has recently come to light from (meta)genome sequencing. Polysaccharide utilization loci (PULs) are clusters of tandem, co-regulated, functionally related genes encoding enzymatic systems that act synergistically in the recognition, binding, hydrolysis, and utilization of specific polysaccharides. In this proposed mechanism, glycoside hydrolases (GHs) lipo-anchored to the outer bacterial membrane bind and hydrolyze polysaccharides into oligomers, which are imported into the periplasmic space by TonB-dependent transporters, where final enzymatic saccharification takes place. Monosaccharides are then recognized by regulatory PUL components that modulate PUL expression.³⁷ An interesting example are the three PUL systems

found in the gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*, which enables this organism to degrade nature's most complex polysaccharide, rhamnogalacturonan-II, by encoding co-regulated enzymes that non-redundantly cleave 20 of its 21 main-chain and side-chain distinct types of glycosidic linkages. Novel glycoside hydrolase and esterase families with catalytic functions never reported before were unraveled during the dissection of this elaborate pectin catabolic system.³⁸ These new findings open new possibilities for biorefineries employing feedstocks with high rhamnogalacturonan-II content. Even though PULs targeting pectins, starch, xyloglucan, and algae-derived polysaccharides have been described, PUL-catalyzed cellulose conversion is yet to be confirmed.^{39,40}

Comparative genomics approach has also recently shed light into the exciting topic of cellulosomes from anaerobic fungi. For decades, fungal cellulosomes could not be studied as thoroughly as their bacterial counterparts because sequencing of anaerobic fungi genomes was precluded by their low GC content. Advances in DNA sequencing enabled the complete genome sequencing of three anaerobic fungi derived from the intestines of herbivores belonging to the early branching Neocallimastigomycota group. Large fungal scaffoldin proteins were identified, displaying various repeated motifs that likely function as cohesins, showing conserved amino acid sequence between the anaerobic fungi species. Moreover, hundreds of CAZymes bearing non-catalytic dockerin domains (NCDDs) have also been identified. Biologically significant interaction between dockerin modules and cohesion motifs within scaffoldin protein was experimentally confirmed, endorsing their role in tethering enzymatic complexes for the biomass degradation. Although several of the enzymes catalytic domains apparently originated from prokaryotes by horizontal gene transfer, fungal dockerins and scaffoldins show no sequence similarity with their bacterial homologues, indicating that cellulosome-based strategy evolved independently in these two groups of microorganisms.⁴¹ New insights into this novel lignocellulose utilization system open the way for the exploration of the modular structure of fungal cellulosomes in the degradation of biomass, like is being made for bacterial cellulosomes, as discussed in the section, Enzyme synergy and cocktail design.

Multimodular enzymes from the thermophilic anaerobic gram-positive bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* bear multiple tandemly linked catalytic and carbohydrate-binding domains and are regarded as a new paradigm

among the plant cell wall-degrading enzymes. They represent an intermediate strategy between free enzymes showing single catalytic domain and large multi-enzymatic assemblies (cellulosomes). Cellulase CelA, the main enzyme from *C. bescii* secretome, comprises two catalytic domains (GH9 endoglucanase and GH48 exoglucanase) in a single peptide chain, interspaced by three CBM3b modules. The synergism conferred by the proximity of endoglucanase and exoglucanase modules in CelA makes the hydrolysis of crystalline cellulose more efficient than standard mixtures of free endoglucanases and exoglucanases. Moreover, CelA shows a distinctive, previously unknown mode of action. While fungal exoglucanases and cellulosomes seem to act only on the surface of cellulose microfibrils by an ablation mechanism and by spreading apart cellulose microfibrils at fiber edges, respectively, CelA hydrolyses internal layers of cellulose microfibrils by an excavation mechanism, forming cavities that can be observed by electron microscopy and whose dimensions are compatible with the enzyme size. These three distinct cellulose hydrolysis mechanisms can possibly synergize if applied in conjunction with the saccharification of biomass.^{42,43}

Transcriptomics and metatranscriptomics

As a complement to genomic studies, investigating the transcriptomes of biomass-degrading organisms and communities reveals the smaller set of genes that are actively expressed during lignocellulose decomposition. The nature of the pool of genes utilized for degradation, along with their transcription levels and expression in response to substrate replacement or modifications over time, may be obtained from transcriptomic and metatranscriptomic studies, as opposed to the static data gleaned from genomic surveys. This valuable information can guide the design of enzyme cocktails, enabling estimation of the enzymes required and their concentrations for the hydrolysis of specific lignocellulosic substrates.³³

A DNA microarray platform called the CAZyChip was developed by Abot *et al.*³¹ to profile the expression of CAZymes in microbial systems. This technology enables the investigation of biomass degradation at transcriptomic level without directly depending on RNA sequencing technologies. This biochip allows the simultaneous identification and quantification of transcripts of up to 55 220 bacterial GH genes deposited in the CAZy database. Currently, the CAZyChip does not allow detection of fungal genes; however, the authors forecast their inclusion in

the platform, given the role of fungal enzymes in biomass degradation and their synergistic action with prokaryotic enzymes.^{30,43} The development of the CAZyChip exemplifies the current trend of valorizing bacteria as key actors in lignocellulose degradation with biorefining potential. Filamentous fungi have traditionally received more attention as biomass decomposers, but recent studies have exposed the capacity of bacteria to produce plant cell wall-degrading enzymes and metabolize biomass degradation products, including lignin.^{34,44} Within this context, the ligninolytic bacterium *Sphingobium sp.* SYK-6 has been considered as a potential lignin-valorization platform or source of lignin catabolism genes for its ability to use lignin-derived monomers and oligomers as sole carbon source, being simultaneously unable to metabolize carbohydrates from lignocellulose.⁴⁵

Proteomics

Due to differences in protein turnover and mRNA translation rates, transcript expression does not necessarily correlate with enzyme level. Therefore, proteomic methods, via mass spectrometry-based analysis, are of great importance in quantifying the ultimate products of gene expression (*i.e.*, enzymes) involved in lignocellulose breakdown. Thus, proteomic analyses are frequently used to validate genomic and transcriptomic data. With proteomics, it is possible to identify and quantify (in relative or absolute terms) in a high-throughput manner a large number of the proteins comprising microbial secretomes during lignocellulose breakdown, and detect changes in the levels of particular proteins during biomass utilization. Quantitative proteomics offers important insights applicable in the design of ideal enzyme mixtures for biomass hydrolysis.^{33,34}

Proteomics can also be employed for the identification of the major 'active' enzymes in a secretome, as proposed by Ma *et al.*⁴⁶ The activity-correlated quantitative proteomics platform (ACPP) may be used to correlate the activity levels of a complex microbial secretome on a particular plant cell wall polysaccharide with the abundance of specific enzymes in the secretome. This method begins with fractionation of complex secretomes by high-performance chromatography under native conditions to preserve enzyme activity. The chromatographic fractions are then subjected to multiple enzyme activity assays and analyzed in parallel with a label-free quantitative proteomics approach. Based on the notion that enzyme concentrations are proportional to their activities, pattern-matching algorithms are used to cross-correlate the detected activity

patterns with the identified and quantified proteins from the eluted chromatographic fractions. For validation of the method, the ACPP was employed to detect biomass-degrading enzymes in the *Aspergillus niger* secretome. Among the 25 GHs identified in fractions exhibiting starch hydrolysis activity, 1,4- α -glucosidase elution profile correlated most closely with the pattern of amylolytic activity. The ACPP enables high-throughput measurement of the activity of each secretome protein identified. Its application to the vast set of biomass polysaccharide substrates will facilitate the discovery and evaluation of candidate lignocellulolytic enzymes from complex microbial secretomes.

Enzyme engineering

In addition to investigating natural biomass utilization systems in search of new and more efficient lignocellulose degradation mechanisms, enzyme engineering can also contribute to the development of enhanced enzymes and complexes for use in biorefining. Enzyme engineering aims to improve the performance of natural enzymes, such as increasing their activity level, thermal stability, or tolerance to inhibitors, with the aid of recombinant DNA techniques, such as point mutations in substrate-docking or active sites.⁴⁷

For example, directed evolution (insertion of random mutations in genes coupled with functional screening for desired traits) was successfully used to increase the hydrolytic activity of β -glucosidase BGL1 from *A. niger* by reducing the rate of the transglycosidation side-reaction and increasing the enzyme's tolerance of glucose.⁴⁸ Directed evolution has also been applied to create ionic liquid (IL)-tolerant enzymes, with the aim of making IL pre-treatment feasible. Wolski *et al.*⁴⁹ isolated several randomly-mutated *Talaromyces emersonii* Stolk Cel7A cellulase variants exhibiting increased activity and thermal stability in the presence of high concentrations of imidazolium-based ILs, which are generally regarded as being incompatible with lignocellulolytic enzymes.

The construction of designer bacterial cellulosomes also highlights the relevance of protein engineering to biomass degradation efficiency. Bacterial cellulosomes are highly organized enzyme complexes that self-assemble onto structural proteins (termed scaffoldins) via specific, non-covalent cohesin-dockerin pairing. All cohesin motifs within a scaffoldin protein are able to bind any catalytic subunit bearing the dockerin domain of the same specificity. Protein engineering has been applied to precisely

control enzyme subunit assembly onto scaffoldin, enabling creation of designer cellulosomes and minicellulosomes (smaller and simpler assemblies) with increased performance tailored to specific lignocellulosic materials. The construction of chimeric scaffoldins containing cohesin motifs from various cellulosome-producing bacterial species enables the controlled attachment of different types of CAZymes, provided that they are fused with a corresponding dockerin module. Enhanced cellulosome activity has been achieved by incorporating accessory enzymes and proteins such as β -glucosidases, LPMOs, and expansins.^{50,51} Moreover, the inclusion of a laccase in a designer cellulosome bearing endoglucanase, exoglucanase, and xylanase subunits has been shown to have a synergistic effect on wheat straw decomposition, combining holocellulose and lignin breakdown.⁵²

Enzyme synergy and cocktail design

Ideally, enzyme cocktails comprise a minimal number of enzyme types at the lowest possible concentrations and in optimal proportions. The rational design of minimal enzyme cocktails requires precise knowledge of the synergy between each member of the enzyme interactome.^{4,53,54} Bioprocess conditions should also be configured to optimize enzyme synergism, especially after the inclusion of LPMOs in enzymatic preparations.⁵⁵

The discovery and use of LPMOs have substantially increased biomass saccharification yields due to synergism with canonical cellulases (endoglucanases and cellobiohydrolases), allowing reductions in the total enzyme loadings required for cellulose breakdown.⁵⁵ Despite the current debate on the identity of the co-substrate – molecular oxygen or hydrogen peroxide – for LPMO activity, previous discussions on the application of these enzymes in biorefineries assumed that LPMOs are only active in the presence of molecular oxygen (O_2). The requirement of aerobic hydrolysis steps makes unfeasible the use of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) strategy due to oxygen consumption by yeast, making Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) or pre-saccharification SSF schemes more efficient if cocktails containing LPMOs are used.⁵⁶ Excessive oxygen during saccharification, however, led to unwanted enzyme inactivation by oxidation, and the addition of catalases in enzyme preparations increase sugar yields by protecting cellulolytic enzymes from oxidation. In addition to the co-substrate, LPMOs also require electron donors, which may be enzymes (cellobiose dehydrogenases, glucose dehydrogenases, and aryl-alcohol

quinone oxireductases), plant-derived molecules (such as lignin, phenolic compounds, and light-harvesting pigments), among others. In contrast to the inhibitory effect on holocellulases, lignin and its pre-treatment-derived soluble fragments can actually act as activators of LPMOs, avoiding the need for the addition of external electron donors.⁵⁷⁻⁵⁹

Other non-hydrolytic, disruptive proteins such as swollenins, loosening, and expansins also act in synergy with cellulases by promoting cellulose amorphogenesis through swelling, loosening, or dispersing cellulose microfibrils, and have important role in cocktail design.^{60,61} Due to the complexity of hemicellulose, a broader range of enzymes is required for its complete breakdown; however, efficient cocktail development is limited by the lack of a detailed understanding of the synergy between main-chain-cleaving and debranching enzymes and their interaction with cellulases.⁵⁴ The role of hemicellulose-active LPMOs in enzyme consortia should also be investigated in this respect.⁶²⁻⁶⁴ Furthermore, enzyme cocktails should be designed with the chemical composition of the substrate and the chosen pre-treatment method in mind, enabling customized consortia for each biorefinery application. This would avoid dependence on current commercial enzyme preparations, which are able to hydrolyze a broad spectrum of substrates of varying compositions, but achieve suboptimal yields.^{4,26}

Enzyme immobilization

Currently, the main goals in biocatalysis-based industries are to increase enzyme productivity, stability, and half-life.⁶⁵ Such improvements are essential to the realization of large-scale production and cost-effective enzyme formulation. In addition, enzymes reuse is extremely relevant to the widespread use of enzymatic conversion, and represents a great technical and economic challenge.⁶⁶⁻⁶⁹

Enzymatic immobilization is one method by which the above goals may be achieved. Immobilization is the confinement of an enzyme to a phase (a matrix or carrier) other than its substrate.⁷⁰ Immobilized enzymes demonstrate greater stability, sensitivity, and catalytic activity than free enzymes, and can be recycled and reused.⁶⁵ Many previous studies have described the use of different CAZymes and supports for immobilization. Some have reported an optimum temperature increase of 5°C,⁷¹ an 80% increase in catalytic activity,⁷² a 22% increase in product yield,⁷³ a 4-fold increase in enzyme half-life, and a retention of 92% of activity after 17 cycles of use.⁷⁴ Therefore, enzyme immobilization may prove to be of

some significance in biorefining, given its implications for reduced enzyme loading, making for a more efficient, robust, inexpensive, and market-competitive process.

Future perspectives

From the Kyoto Protocol (1997) to the Paris Agreement (2015), nations have substantially increased their commitments to reduce greenhouse gas emissions and restrict global warming to below the proposed limit of 2°C above pre-industrial levels. Pledges involving 185 countries are expected to be translated into bioeconomy strategies in the form of national policies and legislation, to support a shift from fossil- to bio-based economies, in which biorefineries will play an important role.⁷⁵ Such strategies are expected to drive biorefining as an industry by creating markets for bioproducts and enabling competitive pricing in relation to products of fossil fuel origin. Mandates and subsidies for biofuels are a reality in Brazil, the USA, and EU member states, among other countries, but bio-based chemicals and materials are not typically included in government incentives, slowing the pace of their introduction to the market.^{12,76}

Considering these conditions, the World Economic Forum foresees strong growth in the demand for biomass, biofuels, and bio-based chemicals in future decades. This represents a great opportunity for those regions of the world producing substantial quantities of biomass, including developing countries with large agricultural industries, such as Brazil, to become centers for the supply of biomass and valuable associated bioproducts. The free availability of raw lignocellulosic wastes in such countries would make them important players in this emerging market. Surplus biorefinery products could be supplied to meet increasing global demand, particularly that from countries of minimal biomass production, such as the Netherlands.¹² Rotterdam Bioport exemplifies this new demand. It has become a large European hub of bio-based activities, encompassing biomass importation and storage and its processing into bioelectricity, heat, biofuels, and bio-based chemicals. This facility provided the foundation on which a bio-based industrial cluster was established, which currently includes five biofuel plants and two biochemical companies.⁷⁷

Despite their potential to act as suppliers of affordable raw lignocellulosic biomass for the international market, it would be of much greater interest to countries such as Brazil to refine biomass domestically, develop their own biorefinery system, attract bio-based companies, and consolidate themselves as biorefinery hubs (Fig. 1), as has

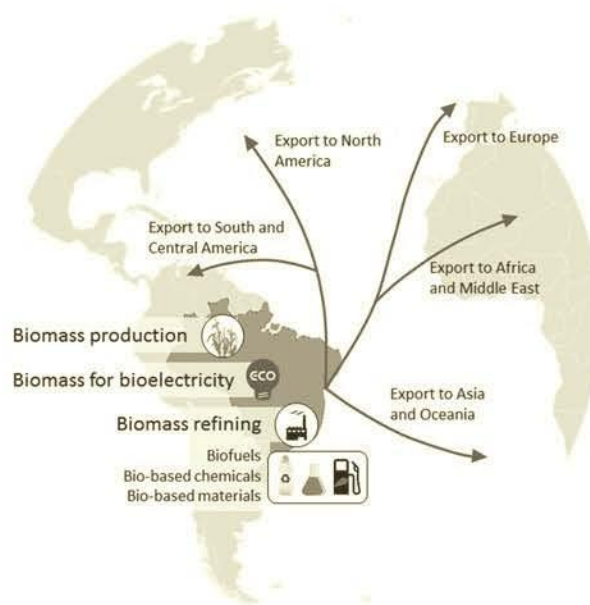


Figure 1. Proposition of Brazil as a biorefinery hub.

the Netherlands. Brazil is already regarded as a center of biofuel and bioplastic production and exportation, a status attained after decades of research dedicated to sugarcane breeding and yeast fermentation. Brazil produced 28.2 billion liters of fuel ethanol from the 2015/2016 sugarcane harvest,⁷⁸ of which approximately 7.5% was exported to countries having to comply with biofuel mandates.⁷⁹ Green polyethylene produced from sugarcane ethanol, the first commodity chemical made from a renewable resource, has also been exported from Brazil to South and North America, Europe, Asia, and Oceania.⁸⁰ In addition, Brazil is a potential exporter of bioelectricity to neighboring countries, given its established system of electricity generation from several biomass residues, principally sugarcane bagasse in ethanol/sugar plants. Brazil stands out for traditionally having had an energy matrix largely based on renewable resources. Advances in enzyme-based lignocellulose biorefinery technologies and their implementation could firmly establish this country as a center and driver of the global bioeconomy, reducing the dependence of other countries on fossil-based energy, fuels, chemicals, and materials.

However, Brazil's emergence as a major bioeconomy depends on progress in biorefinery design and paradigm change. Despite recent advances, enzymatic conversion-based lignocellulose biorefining is far from being an economically viable and sustainable model. Given the many remaining difficulties discussed above, further research into the development of integrated biorefinery systems is needed.

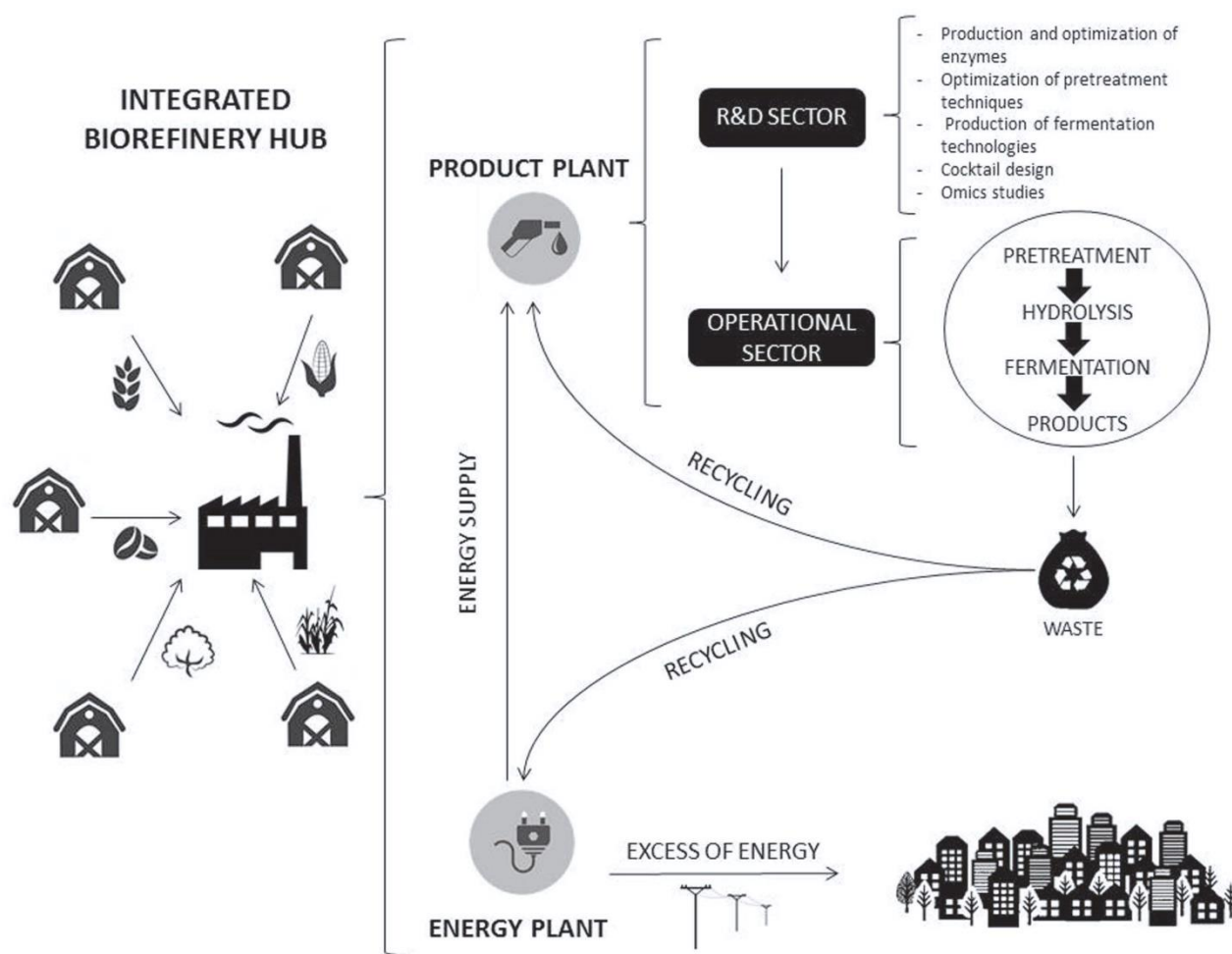


Figure 2. Biorefinery model.

In this context, it is possible to propose a model of the ideal biorefinery (Fig. 2). In this model, biorefineries would be hubs strategically located in regions of intense agricultural activity and integrated with the largest agricultural producers, minimizing the cost of acquiring, transporting, and storing lignocellulosic waste.⁸¹ Supplying a broad spectrum of marketable products and energy is also key. Use and recovery of all lignocellulose components permits a self-sufficient and economical system. For example, sugars from cellulose and hemicellulose components can be used to generate biofuels and bioproducts (such as chemicals, fatty acids, and amino acids), while lignin components can be employed in the synthesis of other bioproducts (such as phenolic components and polymers) and heat and energy generation. The green energy produced can be used in the biorefinery itself (energetic sustainability) and any surplus can be provided to the local community at affordable prices. In addition, any waste generated in the process may serve as a source

of new products and energy. Waste may be recovered and residual energy content extracted using technologies based on acidogenesis, bioelectrogenesis, photosynthesis, and photofermentation.⁵ The full exploitation of this system's bioprocessing capacity will make it productive and environmentally sound, encompassing bioelectro and circular economy concepts.

Considering the obstacles faced in the biochemical conversion process, it is interesting to imagine a biorefinery model that includes specific sectors responsible for enzymatic conversion/fermentation technologies, including micro-organism screening, production of enzymes and enzyme cocktails, and optimization of enzyme and micro-organism properties, aimed at fostering a more robust and productive system. There are three principal routes by which enzymes are obtained for a production plant. The first, and most common, is by purchasing them from a supplier (off-site production). Currently, the largest such supplier in the world is Novozymes, which enjoys a market

monopoly and whose enzymes are highly costly, leading to the non-competitiveness of biorefinery products. The second comprises the construction of an enzyme factory in the biorefinery plant, using conventional carbohydrates (glucose) for on-site enzyme production. The third and most promising option is to integrate enzyme manufacture into the production process, using lignocellulosic biomass as a carbon source.²⁶ The main advantage of this approach is that glucose, an expensive raw material, may be replaced with a cheaper substrate (i.e., biomass).

Recent investigations²⁶ have shown that enzymes account for a significant percentage of the overall cost of cellulosic ethanol production. This figure is 28% using off-site strategies, falls to 22% with on-site approaches, and, surprisingly, is only 10% when enzyme production is integrated into the process. This represents a 64% reduction in costs related to enzyme use.

In conclusion, it is believed that the proposed model, comprising the development of highly integrated hubs, a wide range of end products, aspects of the circular economy, waste recovery and recycling, and integrated enzyme production, represents a promising future for lignocellulosic biorefineries, enhancing their competitiveness and allowing their establishment in the market.

Acknowledgments

The authors acknowledge the receipt of financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF), and the National Institute for Science and Technology of Bioethanol.

References

1. FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham MF and Whitney RA, A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour Technol* **101**:8915–8922 (2010).
2. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G and Zacchi G, Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* **24**:549–556 (2006).
3. Menon V and Rao M, Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog Energy Combust Sci* **38**:522–550 (2012).
4. Van Dyk JS and Pletschke BI, A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv* **30**:1458–1480 (2012).
5. Mohan SV, Butti SK, Amulya K, Dahiya S and Modestra JA, Waste biorefinery: a new paradigm for a sustainable bioelectro economy. *Trends Biotechnol* **34**:852–855 (2016).
6. Velis CA and Vrancken KC, Which material ownership and responsibility in a circular economy? *Waste Manage Res* **33**:773–774 (2015).
7. Cheng L, Martínez MG and Anderson CL, Long term planning and hedging for a lignocellulosic biorefinery in a carbon constrained world. *Energy Convers Manage* **126**:463–472 (2016).
8. Capolupo L and Faraco V, Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**:9451–9467 (2016).
9. de Jong E and Jungmeier G, Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries, in *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, ed by Pandey A, Höfer R, Taherzadeh M, Nampoothiri KM and Larroche C. Elsevier, Amsterdam, pp. 3–33 (2015).
10. Jungmeier G, Hingsamer M and van Ree R, Biofuel-driven biorefineries. A selection of the most promising biorefinery concepts to produce large volumes of road transportation fuels by 2025. [Online]. (2013). Available at https://www.nachhaltigwirtschaften.at/resources/iea_pdf/iea_task_42_biofuel_driven_biorefineries_lr.pdf [March 20, 2017].
11. Jungmeier G, Stichnothe H, de Bari I, Jørgensen H, Van Ree R, de Jong E *et al.*, A biorefinery fact sheet for the sustainability assessment of energy driven biorefineries – efforts of IEA Bioenergy Task 42nd 'biorefining', IEA Research Corporation, Wageningen (2014).
12. King D, Hagan A, Löfner K, Gillman N, Weihe U and Oertel S, *The Future of Industrial Biorefineries*. World Economic Forum, Geneva (2010).
13. Cherubini F, Jungmeier G, Wellisch M, Willke T, Skiadas I, van Ree R *et al.*, Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels Bioprod Biorefin* **3**:534–546 (2009).
14. de Jong E and Gosselink RJA, Lignocellulose-based chemical products, in *Bioenergy Research: Advances and Applications*, ed by Gupta VK, Kubicek CP, Saddler J, Xu F and Tuohy MG. Elsevier, Amsterdam, pp. 277–313 (2014).
15. de Jong E, Higson A, Walsh P and Wellisch M. Product developments in the bio-based chemicals arena. *Biofuels Bioprod Biorefin* **6**:606–624 (2012).
16. Windeisen E and Wegener G, Lignin as building unit for polymers, in *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, ed by Matyjaszewski K and Miller M, editors. Elsevier, Amsterdam, pp. 255–265 (2012).
17. Frazzetto G, White biotechnology. *EMBO Rep* **4**:835–837 (2003).
18. Elkins JG, Raman B and Keller M, Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol* **21**:657–662 (2010).
19. Hasunuma T, Okazaki F, Okai N, Hara KY, Ishii J and Kondo A, A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour Technol* **135**:513–522 (2013).
20. Lynd LR, Guss AM, Himmel ME, Beri D, Herring C, Holwerda EK *et al.*, Advances in consolidated bioprocessing using *Clostridium thermo cellulum* and *Thermoanaerobacter saccharolyticum*, in *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, ed by Wittmann C and Liao JC. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 365–394 (2017).
21. IEA, IEA Bioenergy Task 42 Biorefining, Country Reports. [Online]. Available at: <http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery/Country-Reports.htm> [March 20, 2017].
22. Biofuels, Cellulosic Ethanol (CE). [Online]. Available at <http://www.biofuelstp.eu/cellulosic-ethanol.html> [March 20, 2017].

23. National Renewable Energy Laboratory, Integrated Biorefinery Research Facility. [Online]. Available at: <https://www.nrel.gov/bioenergy/ibrf.html/> [March 20, 2017].
24. Florida Center for Renewable Chemicals and Fuels, Stan Mayfield Biorefinery. [Online]. Available at: <http://fcrc.ifas.ufl.edu/stan-mayfield-biorefinery/> [March 20, 2017].
25. Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW *et al.*, Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* **315**:804–807 (2007).
26. Johnson E, Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bioref* **10**:164–174 (2016).
27. Leresche JE and Meyer HP, Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Org Process Res Dev* **10**:572–580 (2006).
28. Iyer PV and Ananthanarayan L, Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem* **43**:1019–1032 (2008).
29. Xie S, Syrenne R, Sun S and Yuan JS, Exploration of Natural Biomass Utilization Systems (NBUS) for advanced biofuel – from systems biology to synthetic design. *Curr Opin Biotechnol* **27**:195–203 (2014).
30. Batista-García RA, Sánchez-Carbente MR, Talia P, Jackson SA, O'Leary ND, Dobson ADW *et al.*, From lignocellulosic metagenomes to lignocellulolytic genes: trends, challenges and future prospects. *Biofuels Bioprod Bioref* **10**:864–882 (2016).
31. Abot A, Amal G, Auer L, Lazuka A, Labourdette D, Lamarre S *et al.*, CAZyChip: dynamic assessment of exploration of glycoside hydrolases in microbial ecosystems. *BMC Genomics* **17**(671):1–12 (2016).
32. Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TD, Distel DL, Dupree P *et al.*, Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol* **29**:108–119 (2015).
33. Rosnow JJ, Anderson LN, Nair RN, Baker ES and Wright AT, Profiling microbial lignocellulose degradation and utilization by emergent omics technologies. *Crit Rev Biotechnol* **37**:626–640 (2017).
34. Baldrian P and López-Mondéjar R, Microbial genomics, transcriptomics and proteomics: new discoveries in decomposition research using complementary methods. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:1531–1537 (2014).
35. Zhu N, Yang J, Ji L, Liu J, Yang Y and Yuan H, Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose. *Biotechnol Biofuel* **9**(243):1–23 (2016).
36. Güllert S, Fischer MA, Turaev D, Noebauer B, Ilmberger N, Wemheuer B *et al.*, Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnol Biofuel* **9**(121):1–20 (2016).
37. Terrapon N, Lombard V, Gilbert HJ and Henrissat B, Automatic prediction of polysaccharide utilization loci in Bacteroidetes species. *Bioinformatics* **31**:647–655 (2015).
38. Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, Luis AS, Baslé A, Gray J *et al.*, Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature* **6**:544(7648):65–70 (2017).
39. Naas AE, Mackenzie AK, Mravec J, Schückel J, Willetts WG, Eijsink VG *et al.*, Do rumen *Bacteroidetes* utilize an alternative mechanism for cellulose degradation? *MBio* **5**:e01401–1414 (2014).
40. Mackenzie AK, Pope PB, Pedersen HL, Gupta R, Morrison M, Willats WG *et al.*, Two SusD-like proteins encoded within a polysaccharide utilization locus of an uncultured ruminant *Bacteroidetes* phylotype bind strongly to cellulose. *Appl Environ Microbiol* **78**:5935–5937 (2012).
41. Haijtema CH, Gilmore SP, Henske JK, Solomon KV, Groot R, Kuo A *et al.*, A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. *Nature Microbiology* **2**(17087):1–8 (2017).
42. Brunecky R, Alahuhta M, Xu Q, Donohoe BS, Crowley MF, Kataeva IA *et al.*, Revealing Nature's Cellulase Diversity: The Digestion Mechanism of Caldicellulosiruptor bescii Cella. *Science* **342**:1513–1516 (2013).
43. Resch MG, Donohoe BS, Baker JO, Decker SR, Bayer EA, Beckham GT *et al.*, Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energy Environ Sci* **6**:1858–1867 (2013).
44. Palazzolo M and Kurina-Sanz M, Microbial utilization of lignin: available biotechnologies for its degradation and valorization. *World J Microbiol Biotechnol* **32**(173):1–9 (2016).
45. Varman AM, He L, Follenfant R, Wu W, Wemmer S, Wrobel SA *et al.*, Decoding how a soil bacterium extracts building blocks and metabolic energy from ligninolysis provides road map for lignin valorization. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**:E5802–E5811 (2016).
46. Ma H, Delafield DG, Wang Z, You J and Wu S, Finding biomass degrading enzymes through an activity-correlated quantitative proteomics platform (ACPP). *J Am Soc Mass Spectrom* **28**:655–663 (2017).
47. Mohanram S, Amat D, Choudhary J, Arora A and Nain L, Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustainable Chem Processes* **1**(15):1–12 (2013).
48. Larue K, Melgar M and Martin VJ, Directed evolution of a fungal β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuel* **9**(52):1–15 (2016).
49. Wolski PW, Dana CM, Clark DS and Blanch HW, Engineering ionic liquid-tolerant cellulases for biofuels production. *Protein Eng Des Sel* **29**:117–122 (2016).
50. Artzi L, Bayer EA and Morais S, Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat Rev Microbiol* **15**:83–95 (2017).
51. Bayer EA, Cellulosomes and designer cellulosomes: why toy with Nature? *Environ Microbiol Rep* **9**:14–15 (2017).
52. Davidi L, Morais S, Artzi L, Knop D, Hadar Y, Arfi Y *et al.*, Toward combined delignification and saccharification of wheat straw by a laccase-containing designer cellulosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**:10854–10859 (2016).
53. Meyer AS, Rosgaard L and Sorensen HR, The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *J Cereal Sci* **50**:337–344 (2009).
54. Gupta VK, Kubicek CP, Berrin JG, Wilson DW, Couturier M, Berlin A *et al.*, Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends Biochem Sci* **41**:633–645 (2016).
55. Müller G, Várnai A, Johansen KS, Eijsink VGH and Horn SJ, Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. *Biotechnol Biofuel* **8**(187):1–9 (2015).
56. Cannella D and Jørgensen H, Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? *Biotechnol Bioeng* **111**:59–68 (2014).
57. Johansen KS, Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Biochem Soc Trans* **44**:143–149 (2016).

58. Monclaro AV and Filho EXF, Fungal lytic polysaccharide monoxygenases from family AA9: Recent developments and application in lignocellulose breakdown. *Int J Biol Macromol* **102**:771–778 (2017).
59. Johansen KS, Lytic polysaccharide monoxygenases: the microbial power tool for lignocellulose degradation. *Trends Plant Sci* **21**:926–936 (2016).
60. Arantes V and Saddler JN, Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuel* **3**(4):1–11 (2010).
61. Gourlay K, Arantes V and Saddler JN, Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Biofuel* **5**(51):1–14 (2012).
62. Agger JW, Isaksen T, Várnai A, Vidal-Melgosa S, Willats WG, Ludwig R *et al.*, Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:6287–6292 (2014).
63. Frommhagen M, Sforza S, Westphal AH, Visser J, Hinz SW, Koetsier MJ *et al.*, Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monoxygenase. *Biotechnol Biofuel* **8**(101):1–12 (2015).
64. Kojima Y, Várnai A, Ishida T, Sunagawa N, Petrovic DM, Igarashi K *et al.*, A lytic polysaccharide monoxygenase with broad xyloglucan specificity from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* and its action on cellulose-xyloglucan complexes. *Appl Environ Microbiol* **82**:6557–6572 (2016).
65. Datta S, Christena LR and Rajaram YR, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **3**:1–9 (2013).
66. Liese A and Hilterhaus L, Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem Soc Rev* **42**:6236–6249 (2013).
67. DiCosimo R, McAulliffe J, Poulou AJ and Bohlmann G, Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev* **42**:6437–6474 (2013).
68. Es I, Vieira JD and Amaral AC, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:2065–2082 (2015).
69. Vaz RP, Moreira LRS and Filho EXF, An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. *J Mol Catal B: Enzym* **133**:127–135 (2016).
70. Kim JB, Grate JW and Wang P, Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci* **61**:1017–1026 (2006).
71. Pal A and Khanum F, Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. *Process Biochem* **46**:1315–1322 (2011).
72. Yan X, Wang X, Zhao P, Zhang Y, Xu P and Ding Y, Xylanase immobilized nanoporous gold as a highly active and stable biocatalyst. *Microporous Mesoporous Mater* **161**:1–6 (2012).
73. Cherian E, Dharmendirakumar M and Baskar G, Immobilization of cellulase onto MnO₂ nanoparticles for bioethanol production by enhanced hydrolysis of agricultural waste. *Cuihua Xuebao* **36**:1223–1229 (2015).
74. Dhiman SS, Kalyani D, Jagtap SS, Haw JR, Kang YC and Lee JK, Characterization of a novel xylanase from *Armillaria gemina* and its immobilization onto SiO₂ nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:1081–1091 (2013).
75. The truth about climate change. [Online]. Available: <https://feus.us.org/the-report/> [October 16, 2017].
76. Kircher M, Sustainability of biofuels and renewable chemicals production from biomass. *Curr Opin Chem Biol* **29**:26–31 (2015).
77. Bio industry. [Online]. Rotterdam, the world's largest bio industry cluster. Available at: <https://www.portofrotterdam.com/en/cargo-industry/bio-industry> [October 16, 2017].
78. UnicaData. [Online]. Relatório Final Safra 2015/2016 - Região Centro-Sul Do Brasil. Available at: <http://www.unicaData.com.br/listagem.php?idMn=92> [October 16, 2017].
79. UnicaData. [Online]. Exportação Anual De Etanol Pelo Brasil Por Estado De Origem. Available at: <http://www.unicaData.com.br/listagem.php?idMn=23> [October 16, 2017].
80. I'M GREENTM PE Growing a sustainable supply chain. [Online]. Innov'days L'innovation In Plasturgie. Available at: http://www.innovdays-plasturgie.com/innovdays/illustrations/Documents/InnovDays/2015/20150611_biosources/5-BRASKEM-11juin2015.pdf [October 16, 2017].
81. Kim S and Dale BE, All biomass is local: The cost, volume produced, and global warming impact of cellulosic biofuels depend strongly on logistics and local conditions. *Biofuels Bioprod Bioref* **9**:422–434 (2015).



Caio O.G. Silva

Caio O.G. Silva is a PhD student at the Department of Cell Biology of the University of Brasília (Brazil). His research focuses on the valorization of Brazilian agroindustrial residues, mainly sugarcane bagasse, as substrate for enzyme synthesis and conversion into bioproducts. He is currently involved in the investigation of pretreatment technologies to enhance holocellulase production when employing lignocellulosic materials as substrate for filamentous fungi.



Raissa P. Vaz

Raissa P. Vaz is a PhD student at the Department of Cell Biology of the University of Brasília (Brazil). Her work is focused mainly on immobilization, characterization, and applications of lignocellulose-degrading enzymes.



Edivaldo X.F. Filho

Edivaldo X.F. Filho is Professor of Biochemistry at the Department of Cell Biology of the University of Brasília (Brazil). He conducts research in the fields of biochemistry and biotechnology, investigating the production, purification, characterization, and biotechnology applications of lignocellulose-degrading enzymes from filamentous fungi.