

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Diandra de Andrades

**IMOBILIZAÇÃO DE BETA-GLICOSIDASES EM SUPORTES DE AGAROSE
ATIVADA COM DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS**

Porto Alegre
2021

Diandra de Andrades

**IMOBILIZAÇÃO DE BETA-GLICOSIDASES EM SUPORTES DE AGAROSE
ATIVADA COM DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. PhD Marco Antônio Z. Ayub
Coorientador: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

de Andrades, Diandra
Imobilização de beta-glicosidases em suportes de
agarose ativada com diferentes grupos funcionais /
Diandra de Andrades. -- 2021.
169 f.
Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Coorientador: Rafael Costa Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Imobilização enzimática. 2. Glutaraldeído. 3.
Tolerância à glicose. 4. Tecnologia enzimática. 5.
Aplicação biotecnológica. I. Ayub, Marco Antônio
Záchia, orient. II. Rodrigues, Rafael Costa,
coorient. III. Título.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras para enriquecerem com a sua ciência, e isso é negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras para edificarem os outros, e isso é amor.”

São Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub e ao meu coorientador Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues por toda dedicação e paciência na minha orientação, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo destes anos de trabalho juntos.

Ao Prof. Roberto Fernandez-Lafuente e demais membros do Laboratório de Ingeniería de Biocatalizadores y Biotransformaciones da Universidad Autónoma de Madrid, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos na área de immobilizações.

Ao Prof. Plinho Francisco Hertz e demais membros do Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise. Aos colegas do BiotecLab, do Laboratório de Enzimologia e do Laboratório de Tecnologia Enzimática, por toda parceria e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro tanto no Brasil quanto no exterior.

À Universidade, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e o Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização desse trabalho, todo conhecimento e infraestrutura proporcionados.

À minha família pelo apoio e incentivo em toda a minha vida.

Ao Gabriel, por todo amor e carinho.

IMOBILIZAÇÃO DE BETA-GLICOSIDASES EM SUPORTES DE AGAROSE ATIVADA COM DIFERENTES GRUPOS FUNCIONAIS

Autor: Diandra de Andrades

Orientador: Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

RESUMO

As β -glicosidases hidrolisam ligações β -glicosídicas a partir da extremidade não redutora de oligossacarídeos e glicosídeos conjugados, e possuem largo espectro de aplicações biotecnológicas como, na estabilização e enriquecimento de bebidas a exemplo dos sucos e vinhos. Porém, estes processos são realizados em um meio com alta concentração de glicose, uma molécula com grande efeito inibitório das β -glicosidases. Deste modo, o presente trabalho visou desenvolver biocatalisadores imobilizados com atividade de β -glicosidase, capazes de serem aplicados em bebidas à base de uva. A imobilização desta enzima é uma ferramenta extremamente relevante para ultrapassar os desafios da sua aplicação industrial através da melhoria das suas características, como, um melhor controle operacional, e menor oneração. Inicialmente, as atividades de β -glicosidase de nove preparações enzimáticas comerciais foram comparadas avaliando-se os efeitos do pH, estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e tolerância à glicose. O valor do pH do meio de reação influenciou fortemente as atividades, estabilidades, e inibição à glicose das β -glicosidases testadas. As preparações de Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Clear e Celluclast® 1,5 L, e o extrato enzimático de *Aspergillus niger* URM 6642 foram selecionadas com base em sua atividade de β -glicosidase e tolerância à glicose. Em seguida, a imobilização das enzimas selecionadas foram testadas em 5 diferentes suportes: MANAE, MANAE-glutaraldeído, glioxil-agarose, divinilsulfona-agarose e epóxi-agarose. A imobilização das β -glicosidases de Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Clear e de *A. niger* URM 6642 no suporte MANAE-agarose foram realizadas em pH 5, 7 e 9 para permitir diferentes orientações das moléculas da enzima na superfície do suporte, e, posteriormente, também modificadas com glutaraldeído. Os resultados demonstraram que o protocolo ideal para imobilizações de β -glicosidases, usando a o glutaraldeído, deve ser testado individualmente e adaptado para cada tipo de enzima. A imobilização das β -glicosidases de Pectinex Ultra SP-L e Celluclast® 1.5L em DVS-agarose também foram testadas nos pHs 5, 7, 9 e 10. Os resultados demonstraram que o pH de imobilização ocasionou forte influência nos rendimentos de imobilização, e afetou a estabilidade das enzimas e a tolerância à glicose. As enzimas também foram estudadas quanto a descoloração do suco de uva e do vinho tinto. Os resultados deste trabalho demonstraram que os biocatalisadores estudados possuem características promissoras, e, portanto, de grande importância para indústria.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (169 p.) setembro, 2021.

IMMOBILIZATION OF BETA-GLUCOSIDASES ON AGAROSE SUPPORTS ACTIVATED WITH DIFFERENT FUNCTIONAL GROUPS

Author: Diandra de Andrades
Advisor: Prof. PhD. Marco A. Z. Ayub
Co-Advisor: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues

ABSTRACT

β -glucosidases hydrolyze β -glycosidic bonds from nonreducing terminal of oligosaccharides and conjugated glycosides, and have wide range of biotechnological applications such as, in the stabilization and enrichment drinks like juices and wines. However, these processes are carried out in a reaction medium with a high concentration of glucose, a molecule with high inhibitory effect on β -glucosidases. Thus, the present work aimed to develop immobilized biocatalysts with β -glucosidase activity subject to application in grape-based beverages. The immobilization of this enzyme is an extremely relevant tool to overcome the challenges of its industrial application through the improvement of its characteristics, such as higher operational control and lower cost. Initially, the β -glucosidase activities of nine commercial enzyme preparations were compared by evaluating the effects of pH, thermal stability, kinetic parameters, and glucose tolerance. The pH value of the reaction medium strongly influenced the activities, stabilities, and glucose inhibition of the β -glucosidases tested. The Preparations of Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Utra Clear, Celluclast® 1.5 L, and a strain of *Aspergillus niger* URM 6642 were selected based on their β -glucosidase activity and glucose tolerance. Then, the immobilization of selected enzymes were tested on 5 different supports: MANAE, MANAE-glutaraldehyde, glyoxyl-agarose, divinylsulfone-agarose and epoxy-agarose. The immobilization of β -glucosidases from Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Utra Clear and *A. niger* URM 6642 on the MANAE-agarose support were carried out at pH 5, 7 and 9 to allow different orientations of the enzyme molecules on the support surface, and later also modified with glutaraldehyde. Results showed that optimal protocol for β -glucosidases immobilizations using the glutaraldehyde chemistry must be individually tested and tailored to each type of enzyme. The immobilization of β -glucosidases from Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L in DVS-agarose were also tested at pHs 5, 7, 9 and 10. The results showed that the immobilization pH had a high influence on the immobilization yields. The change in immobilization pH also affected enzyme stability and glucose tolerance. Enzymes were also studied for discoloration of grape juice and red wine. The results of this work showed that the studied biocatalysts have promising characteristics, and therefore, of great importance for industry.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (169 p.) September, 2021.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. B-GLICOSIDASES (EC 3.2.1.21).....	3
3.2. CLASSIFICAÇÃO DAS B-GLICOSIDASES	5
3.3. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS B-GLICOSIDASES	6
3.3.1. Produção de Biocombustível	7
3.3.2. Melhoramento de aromas em bebidas	9
3.3.3. Hidrólise de Antocianinas	12
3.3.4. Outras Aplicações	14
3.4. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	15
3.4.1. Imobilização reversível em suportes sólidos	17
3.4.2. Imobilização Irreversível em suportes sólidos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. MATERIAL.....	26
4.2. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	27
4.2.1. Determinação da atividade da β -glicosidase	27
4.2.2. Quantificação de proteínas.....	27
4.2.3. Efeito do pH na atividade das enzimas e tolerância à glicose	27
4.2.4. Determinação de parâmetros cinéticos	28
4.2.5. Análise da tolerância à glicose na hidrólise da celobiose	28
4.2.6. Efeito do pH na estabilidade térmica das β -glicosidases.....	28
4.2.7. Gel de eletroforese SDS-PAGE.....	29
4.3. PREPARAÇÃO DOS SUPORTES DE AGAROSE.....	29
4.3.1. Suporte glioxil-agarose	29
4.3.2. Suporte MANAE e MANAE-glutaraldeído.....	29
4.3.3. Suporte divinilsulfona-agarose	30
4.3.4. Suporte epóxi-agarose	30
4.4. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS B-GLICOSIDASES	31

4.5. IMOBILIZAÇÃO DAS B-GLUCOSIDASES	31
4.5.1. Considerações gerais	31
4.5.2. Imobilização em glioxil-agarose	31
4.5.3. Imobilização em MANAE e MANAE-glutaraldeído	32
4.5.4. Imobilização em divinilsulfona-agarose.....	32
4.5.5. Imobilização em epóxi-agarose	33
4.6. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCATALISADORES	33
4.6.1. Efeito da glicose nos biocatalisadores	33
4.6.2. Avaliação da estabilidade térmica.....	33
4.6.3. Avaliação da estabilidade operacional	34
4.6.4. Preparação do suco de uva	34
4.6.5. Aplicação dos biocatalisadores no suco de uva e no vinho tinto	35
5. ARTIGOS	36
5.1. PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES, KINETIC PARAMETERS, AND GLUCOSE INHIBITION OF SEVERAL BETA-GLUCOSIDASES FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS	36
5.2. IMMOBILIZATION AND STABILIZATION OF DIFFERENT B-GLUCOSIDASES USING THE GLUTARALDEHYDE CHEMISTRY: OPTIMAL PROTOCOL DEPENDS ON THE ENZYME.....	69
5.3. PREPARATION OF IMMOBILIZED/STABILIZED BIOCATALYSTS OF B-GLUCOSIDASES FROM DIFFERENT SOURCES: IMPORTANCE OF THE SUPPORT ACTIVE GROUPS AND THE IMMOBILIZATION PROTOCOL	100
5.4. RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NA FORMA DE ARTIGO	129
5.4.1. Aplicação no suco de uva e vinho tinto	129
6. DISCUSSÃO GERAL.....	131
7. CONCLUSÃO	135
8. REFERÊNCIAS	136
9. APÊNDICES.....	152

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

	Página
Table 1. Analysis of β -glucosidase activity against pNPG and protein concentration for the commercial enzyme preparations.....	45
Table 2. Glucose concentration and cellobiose hydrolysis yields.....	48
Table 3. Kinetic parameters of the enzyme preparations against pNPG at pH 4.8 and 40 °C.....	52

Artigo 2

	Página
Table 1: Purification of β -glucosidases on DEAE-Sepharose.....	79
Table 2: Immobilization of β -glucosidase contained on Pectinex Ultra SP-L on different supports.....	80
Table 3: Thermal stability of different immobilized enzymes at 60 °C.....	83
Table 4: Immobilization of β -glucosidase contained on Pectinex Ultra Clear on different supports.....	84
Table 5: Immobilization of β -glucosidase from <i>A. niger</i> on different supports.....	86

Artigo 3

	Página
Table 1. Effect of glucose concentration on the activities of β -glucosidases free and immobilized from Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L.....	116
Table 2. Parameters of deactivation models purified and immobilized β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L at 65 °C.....	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de reação de duplo deslocamento de retenção de glicosidases.....	4
Figura 2. Hidrólise enzimática sequencial dos precursores de aromas dissacarídicos liberando terpenos em sucos e vinhos.....	11
Figura 3. Esquema do mecanismo de hidrólise da β -glicosidase sobre as antocianinas.....	13
Figura 4. Representação esquemática dos tipos de imobilização.....	17
Figura 5. Representação esquemática da imobilização covalente unipontual e multipontual.....	23
Figura 6. Redução de cor do suco de uva (A), e suco de uva diluído (1:1) (B), nos tempos de 1 h (coluna branca), 2 h (coluna riscada) e 4 h (coluna preta) mantidas sob agitação a 60 °C.....	130
Figura 7. Redução de cor do vinho tinto (A), e vinho tinto diluído (1:1) (B), nos tempos de 2 h (coluna cinza), 4 h (coluna riscada) e 6 h (coluna preta) mantidas sob agitação a 60 °C.....	130

Artigo 1

	Página
Fig. 1. Analysis of glucose tolerance over time using cellobiose as substrate. (■) Pectinex Ultra SP-L, (●) Pectinex Ultra Color, (×) Pectinex Smash XXL, (▽) Novozym 33095, (○) Pectinex Ultra Clear, (▲) Pectinex BE XXL, (◆) Rohapect 10L, (□) Celluclast® 1.5 L, (△) Lallzyme Beta.....	46
Fig. 2. Effect of pH on the glucose tolerance of enzymes. (A) Pectinex Ultra SP-L, (B) Pectinex Ultra Color, (C) Pectinex Smash XXL, (D) Novozym 33095, (E) Pectinex Ultra Clear, (F) Pectinex BE XXL, (G) Rohapect 10L, (H) Celluclast® 1.5 L, (I) Lallzyme Beta. (■) pH 3.0; (○) pH 4.8; (▲) pH 7.0.....	51
Fig. 3. Effects of pH on the thermal inactivation of different glucosidase preparations. (A) Pectinex Ultra SP-L, (B) Pectinex Ultra Color, (C) Pectinex Smash XXL, (D) Novozym 33095, (E) Pectinex Ultra Clear, (F) Pectinex BE XXL, (G) Rohapect 10L, (H) Celluclast® 1.5 L, (I) Lallzyme Beta. (■) pH 3.0; (○) pH 4.8; (▲) pH 7.0.....	56
Figure S1. Comparative Michaelis-Menten plots of β -glucosidases from commercial preparations. (*) Pectinex Ultra SP-L; (★) Pectinex Ultra Color; (▲) Pectinex Smash XXL; (○) Novozym 33095; (■) Pectinex Ultra Clear; (△) Pectinex BE XXL; (●) Rohapect 10L; (□) Celluclast® 1.5; and (►) Lallzyme Beta.....	68

Artigo 2

	Página
Fig. 1: Repeated hydrolysis of cellobiose. (a) β -glucosidase contained on Pectinex Ultra SP-L immobilized on (●) MANAE-agarose-glutaraldehyde at pH 7.0 and (■) MANAE-agarose at pH 9.0 and treated with glutaraldehyde. (b) β -glucosidase contained on Pectinex Ultra Clear (●) immobilized on MANAE-agarose at pH 5.0 and (■) pH 9.0 both treated with glutaraldehyde. (c) β -glucosidase from <i>A. niger</i> immobilized on (●) MANAE-agarose at pH 7.0 and (■) pH 9.0 both treated with glutaraldehyde.....	90
Fig. S1. SDS-PAGE of β -glucosidase purification using DEAE-Sepharose. (A) from Pectinex Ultra SP-L; (B) from Pectinex Ultra Clear; (C) from <i>A. niger</i>	99

Artigo 3

	Página
Figure 1. Schematic representation of immobilization protocols used in this study.....	106
Figure 2. Immobilization course of β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L on DVS-agarose pH 5.0 (a); pH 7.0 (b); pH 9.0 (c); and pH 10 (d); Glyoxyl-agarose (e); and Epoxy-agarose (f).....	111
Figure 3. Immobilization course of β -glucosidase from Celluclast® 1.5L on DVS-agarose pH 5.0 (a); pH 7.0 (b); pH 9.0 (c); and pH 10 (d); Glyoxyl-agarose (e); and Epoxy-agarose (f).....	113
Figure 4. Repeated hydrolysis of cellobiose of β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L immobilized on DVS-agarose immobilization pH 10 blocked with EDA (▲) and from Celluclast® 1.5L on DVS-agarose immobilization pH 9 blocked with glycine (■).....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BrCN	Brometo de cianogênio
CBM	Módulo de ligação a carboidrato
CM	Carboximetil
DEAE	Dietilaminoetil
EDA	Etilenodiamina
GH	Glicosil hidrolase
MANAE	Monoamino-N-aminoetil
ρ NPG	ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
His-tag	Tag de poli-histidina
TEPI	3-(triétoxissilil)propil isocianato
Lys	Lisina
K_M	Constante de Michaelis
V_{max}	Velocidade máxima de reação
K_i	Constante de inibição
GLU	Glutaraldeído
PAGE	Eletroforese em gel de acrilamida
$NaBH_4$	Borohidreto de sódio
SF	Fator de estabilização
DVS	Divinilsulfona
M	molar
mM	milimolar
mL	mililitro
mg	miligrama
G	grama
kDa	KiloDaltons
min	minuto
L	litro
β	beta
ρ	para
μ L	microlitro
$^{\circ}$ C	grau Celsius
%	por cento

1. INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas que atuam na hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos de cadeia curta, ou nos chamados glicosídeos conjugados, liberando monômeros de glicose (Chang et al., 2018). Estas enzimas são extensivamente estudadas devido a sua importância e ampla aplicação nas indústrias farmacêutica, de nutrição animal, têxtil e de papel. Na indústria de bioenergia possuem função crucial na produção de etanol através da bioconversão de resíduos lignocelulósicos, uma vez que hidrolisam a celobiose, um forte inibidor de outras enzimas que atuam no processo (Ahmed et al., 2017; Fusco et al., 2018; Srivastava et al., 2019). Na indústria alimentícia são empregadas na liberação de compostos ricos em aroma em sucos e vinhos, além de liberar compostos antioxidantes melhorando a qualidade nutricional dos alimentos (Serra Colomer et al., 2019; Srivastava et al., 2019). Estes compostos estão presentes nos sucos, mostos de frutas e vinhos através de precursores glicoconjugados que quando hidrolisados pela β -glicosidase liberam os compostos aromáticos ativos e os fenóis (Fernández-Pacheco et al., 2021). Outro tipo de composto glicoconjugado encontrado em sucos de frutas vermelhas/roxas e vinhos tintos, são as antocianinas, importantes agentes de cor. A hidrólise destes compostos por β -glicosidases, com atividade antocianase, podem acarretar a perda da coloração destas bebidas, e, portanto, o conhecimento da presença desta atividade, se faz extremamente necessária para sua aplicação (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998; Monteiro et al., 2019). Entretanto, as altas concentrações de glicose em meios reacionais como, sucos de frutas, podem causar inibição da β -glicosidase, limitando sua eficiência e atividade (Souza et al., 2014).

A inibição da β -glicosidase pela molécula de glicose tem sido relatada como uma inibição competitiva. Nesse tipo de inibição a molécula do inibidor possui semelhança estrutural com o substrato competindo pelo sítio ativo da enzima. Além disso, a inibição competitiva envolve a formação de um complexo inibidor de enzima inativo e isso parece ser independente da natureza do substrato (Chauve et al., 2010). Esse evento também é responsável pelo impacto negativo da utilização biotecnológica da β -glicosidase, pois altas cargas enzimáticas são necessárias para um bom rendimento da sua aplicação (Souza et al., 2014). Portanto, a busca por β -glicosidases com propriedades desejadas como maior tolerância à glicose é extremamente

relevante para aplicações biotecnológicas (Singhania et al., 2013; Chamoli et al., 2016).

A imobilização da β -glicosidase é uma ferramenta extremamente relevante para ultrapassar os desafios da sua aplicação industrial, visto que a técnica pode proporcionar melhorias nas características da enzima. De modo geral, a imobilização proporciona a estabilização do biocatalisador frente a diferentes agentes como a temperatura ou a presença de solventes orgânicos, o que permite obter um biocatalisador com um perfil de estabilidade melhor que os da enzima solúvel. Além disso, a imobilização de enzimas também proporciona outras vantagens como um melhor controle operacional, flexibilidade no desenho de reatores e facilidade na separação da enzima dos produtos da reação, a possibilidade de reuso da enzima, e consequentemente, menor oneração de sua aplicação biotecnológica (Guisán, 2006; Mateo et al., 2007b; Puhl, 2008).

Existem diversos parâmetros a serem analisados para a escolha do método de imobilização, alguns exemplos são as características de regeneração, inativação, estabilidade operacional e propriedades do complexo enzima-suporte, a toxicidade dos reagentes utilizados, e o custo do procedimento de imobilização. Além disso, deve-se considerar as características finais desejadas para a enzima imobilizada (Mendes et al., 2011b; Illanes et al., 2012; dos Santos et al., 2015a). As diversas características de suportes, grupos reativos e protocolos de imobilização existentes, permitem preparar uma bateria de enzimas imobilizadas com possíveis propriedades diferentes. Mesmo utilizando a mesma enzima, os aminoácidos envolvidos na interação, o número de ligações entre a enzima e o suporte e o ambiente gerado ao redor da molécula imobilizada podem ser completamente diferentes dependendo do suporte escolhido (Bolivar et al., 2009; Rodrigues et al., 2013; Rueda et al., 2016). Deste modo, estudos de novas matrizes e estratégias de imobilização são passos importantes para superar os obstáculos atuais para aplicações industriais eficazes de enzimas como a β -glicosidase (Sheldon & van Pelt, 2013; dos Santos et al., 2015a).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Diante disso, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver biocatalisadores imobilizados com atividade de β -glicosidase para aplicação em bebidas à base de uva.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Estudar as propriedades e atividade de β -glicosidase de nove preparados enzimáticos;
- Imobilizar os melhores biocatalisadores em suporte agarose ativada com diferentes grupos funcionais;
- Comparar os diferentes tipos de imobilização;
- Caracterizar os biocatalisadores imobilizados quanto a estabilidade térmica, a tolerância à glicose e a estabilidade operacional;
- Aplicar os biocatalisadores em bebidas à base de uva, e testar sua capacidade de descoloração através da hidrólise de antocianinas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. β -glicosidases (EC 3.2.1.21)

As β -glicosidases, também conhecidas como β -D-glicosídeo glicosil hidrolases (β -D-glucoside glucohydrolase), são responsáveis pela hidrólise das ligações β -D-glicosídicas de vários compostos como alquil-, ou aril- β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, dissacarídeos e oligossacarídeos de cadeia curta, liberando glicose de suas extremidades não redutoras (Bhatia et al., 2002; Ahmed et al., 2017). De modo geral, toda hidrólise de uma ligação glicosídica realizada por uma β -glicosidase é uma reação em que o produto retém ($\beta \rightarrow \beta$) ou inverte ($\beta \rightarrow \alpha$) a configuração anomérica do substrato (Chiba, 1997; Divakar, 2013). Tanto as enzimas de inversão quanto as de retenção seguem o mecanismo de catálise ácido-base, e possuem dois resíduos em seu sítio ativo, um catalisador ácido/básico e um nucleófilo, envolvidos na catálise (Figura 1). Entretanto, a maioria das β -glicosidases usam o

mecanismo de retenção e catalisam a hidrólise em duas etapas: glicosilação e deglicosilação, também chamado de mecanismos de duplo deslocamento. O primeiro envolve o ataque do nucleófilo no carbono anomérico (C-1) do substrato, resultando em um intermediário glicosil-enzima covalente com liberação concomitante da aglicona após a protonação do oxigênio glicosídico pelo catalisador ácido, etapa chamada glicosilação. A segunda etapa corresponde à hidrólise do intermediário covalente glicosil-enzima, com o catalisador ácido atuando como base e uma molécula de água funcionando como nucleófilo, liberando a glicose e regenerando o resíduo de nucleófilo (Kempton & Withers, 1992; Cairns & Esen, 2010; Divakar, 2013; Ahmed et al., 2017).

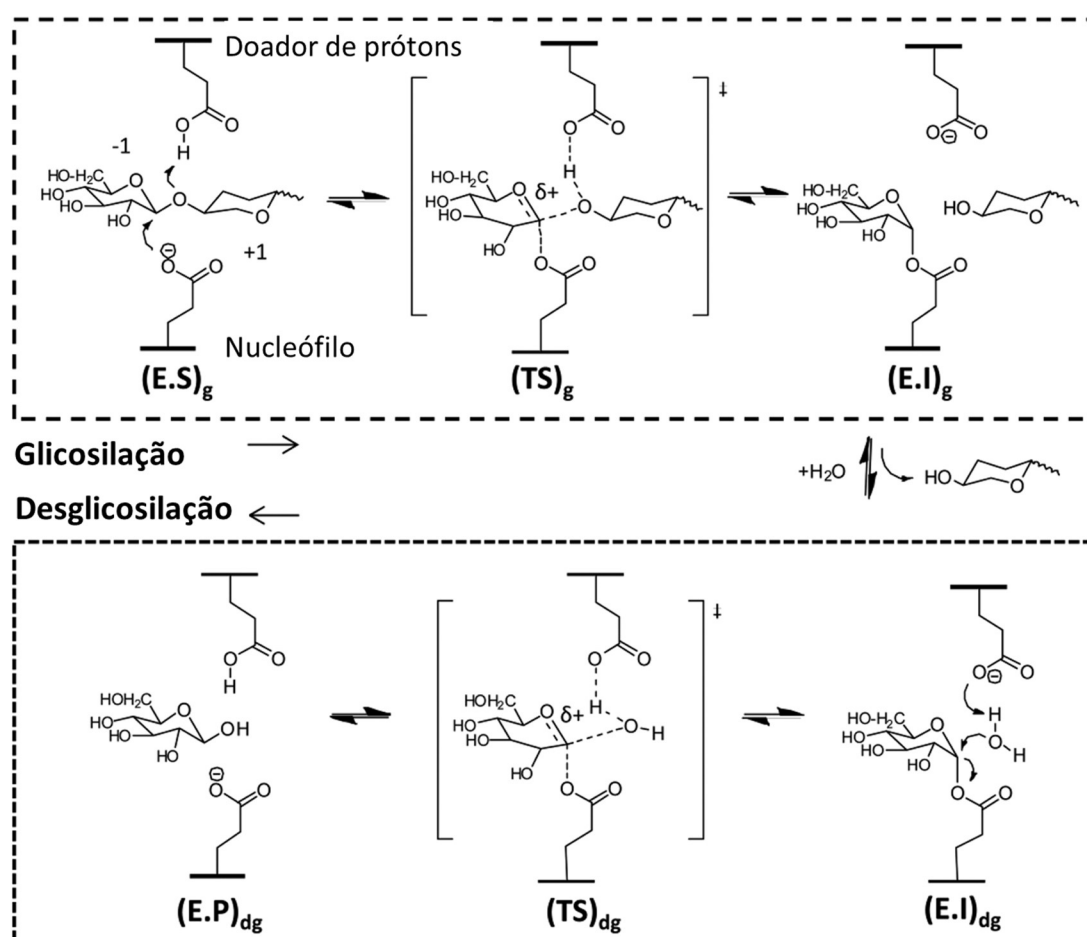


Figura 1. Mecanismo de reação de duplo deslocamento de retenção de glicosidases; adaptado de (Badiyan et al., 2012). (E.S): complexo enzima-substrato; (TS): estado de transição; (E.I): complexo enzima-intermediário; ()_g: glicosilação; ()_{dg}: deglicosilação.

Estas enzimas são universalmente encontradas em todos os domínios dos organismos vivos, desde as bactérias mais simples até os mamíferos altamente complexos, nos quais desempenham uma variedade de funções (Tallapragada & Dikshit, 2017). Em microrganismos, desempenha papéis na conversão de biomassa através da hidrólise de celulose, e reciclagem de carbono, além da indução do gene da celulase (Doi & Kosugi, 2004; Ahmed et al., 2017). Em animais, atua no metabolismo de glicolipídios e glicosídeos da dieta, está envolvida na hidrólise de glicosil ceramidas e em funções de sinalização (Cairns & Esen, 2010; Graebin et al., 2016). Nas plantas desempenham a mais ampla gama de funções biológicas, que incluem papéis no mecanismo de defesa (Morant et al., 2008; Cairns & Esen, 2010), metabolismo da parede celular e lignificação, ativação de fito hormônios, sinalização e metabolismo secundário, liberação de compostos aromáticos como os perfumes em flores, dentre outros (Cairns & Esen, 2010; Ahmed et al., 2017).

3.2. Classificação das β -glicosidases

As β -glicosidases abrangem um grupo de enzimas hidrolíticas bastante heterogêneo, e deste modo, podem ser classificadas segundo diferentes critérios. Ainda não há consenso quanto a um único método classificatório para estas versáteis enzimas, porém dois métodos são comumente encontrados na literatura (Singhania et al., 2013; Singh et al., 2016). O primeiro sistema de classificação é baseado na especificidade do substrato, e neste, as β -glicosidases são divididas em três grupos; (1) aril- β -glicosidases, que exibem extrema preferência em relação à hidrólise de aril- β -glicosídeos como o *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG), (2) celobiasas verdadeiras, que hidrolisam somente os celo-oligossacarídeos (incluindo a celobiose) em glicose, ou (3) β -glicosidases de ampla especificidade, que atuam em uma ampla variedade de substratos e representam o grupo mais comumente observado entre os microrganismos celulolíticos caracterizados (Bhatia et al., 2002; Yeoman et al., 2010; Salgado et al., 2018).

O segundo sistema de classificação das β -glicosidases, também o mais aceito, é o baseado na identidade das sequências dos nucleotídeos e similaridade estrutural da enzima (Henrissat, 1991; Henrissat & Davies, 1997). De acordo com esta classificação, as β -glicosidases são membros importantes da grande classe das glicosil hidrolases (GH), e foram encontradas em oito das 168 famílias conhecidas que

atualmente estão categorizadas e podem ser acessadas através do site Carbohydrate Active Enzyme (CAZY) (<http://www.cazy.org>). A maioria das β -glicosidases estão inseridas nas famílias glicosil hidrolase 1 (GH1) ou glicosil hidrolase 3 (GH3), com menor representação nas famílias glicosil hidrolase 2 (GH2), 5 (GH5), 9 (GH9), 16 (GH16), 30 (GH30), 39 (GH39) e 116 (GH116) (Cantarel et al., 2009; Teugjas & Våljamäe, 2013). As β -glicosidases apresentam uma ampla variedade de estruturas diferentes, mas o dobramento geral do domínio catalítico é semelhante em cada família de GH. As famílias GH1, GH2, GH5, GH30 e GH39 pertencem ao grupo GH-A, e todas as enzimas têm em comum um domínio com o enovelamento em 8 motivos β - α - β justapostos denominado barril $(\beta/\alpha)_8$, onde está localizado seu sítio ativo. Em contraste, as β -glicosidases GH3 têm dois domínios barril $(\beta/\alpha)_8$ contribuindo para o seu sítio ativo, e as GH9 e GH116 possuem o barril $(\alpha/\alpha)_6$ (Cairns & Esen, 2010).

Além disso, uma tentativa de classificar as β -glicosidases com base no efeito da glicose em sua atividade catalítica foi proposta por Cao e seus colaboradores (Cao et al., 2015) e posteriormente ampliada por Salgado e colegas (Salgado et al., 2018). Nesta classificação funcional, as β -glicosidases foram divididas em quatro classes; (1) β -glicosidases fortemente inibidas por baixas concentrações de glicose, aquelas que apresentam valores de K_i para a glicose menores que 0,1 M. (2) β -glicosidases tolerantes à glicose, as que apresentam valores de K_i para glicose superiores a 0,1 M, (3) β -glicosidases estimuladas por baixas concentrações de glicose e inibidas por altas concentrações de glicose, e (4) β -glicosidases não inibidas por glicose em altas concentrações.

3.3. Aplicações biotecnológicas das β -glicosidases

As enzimas são biocatalisadores amplamente utilizados em diferentes processos industriais devido à sua alta atividade, seletividade e especificidade em comparação com os catalisadores químicos. São capazes de produzir compostos complexos sob condições de reação muito suaves, permitindo o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e eficientes (Woodley, 2008; Sheldon & Woodley, 2018). Sendo assim, a demanda por enzimas cada vez mais robustas, ativas e específicas vem crescendo exponencialmente para atender este mercado. Além disso, aproximadamente 75 % das enzimas industriais são hidrolases, sendo as hidrolases glicosídicas o segundo maior grupo (Bhat, 2000).

A expansão da aplicação das β -glicosidases requer uma produção em larga escala e um conhecimento detalhado dos seus mecanismos de reação (Bhatia et al., 2002). Para melhorar estes aspectos, diversas estratégias vêm sendo empregadas com o intuito de alavancar a aplicação destas enzimas. Algumas delas são, a clonagem de genes codificantes desses biocatalisadores em sistemas de expressão mesofílica de alto rendimento (Li et al., 2014; Singhanía et al., 2017; Sun et al., 2020a), mutagênese (Yang et al., 2017; Sun et al., 2020b) e a imobilização em diferentes suportes, grupos reativos, ou protocolos (Fernandes et al., 2011; Graebin et al., 2016; Vazquez-Ortega et al., 2018).

3.3.1. Produção de Biocombustível

O aumento da demanda global por energia a cada dia, com conseqüente aumento do uso de combustíveis fósseis, têm exigido a produção de biocombustíveis em grande escala para substituir estes combustíveis fósseis. A biomassa lignocelulósica é um recurso abundante que vem atraindo cada vez mais interesse como uma alternativa renovável para este problema (Chandel et al., 2018; Srivastava et al., 2019). O processo de produção do biocombustível celulósico, por exemplo, bioetanol, envolve o uso de muitas enzimas que agem sinergicamente para degradar o material lignocelulósico em pentoses e hexoses que, por sua vez, são fermentados em etanol (Singhanía et al., 2013; Ahmed et al., 2017; Srivastava et al., 2019). Dentre estas enzimas, há as pertencentes ao complexo celulolítico que consistem em endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases. As endoglucanases e as celobiohidrolases degradam a cadeia de celulose em celobiose e oligossacarídeos de cadeia curta, e ambas são inibidas pela celobiose liberada. As β -glicosidases hidrolisam a celobiose e os oligossacarídeos em unidades de glicose eliminando a inibição da celobiose e, portanto, aumentando a taxa de celulólise. Entretanto, a β -glicosidase é inibida por seu produto, a glicose. Este fato limita a taxa de hidrólise da celulose, torna a ação desta enzima a etapa limitante da via celulolítica e um dos gargalos da tecnologia de produção de biocombustíveis (Sørensen et al., 2013; Rani et al., 2014; Goswami et al., 2016; Ahmed et al., 2017).

Assim, para um processo rentável de conversão da biomassa, a hidrólise da celulose deve produzir concentrações de glicose elevadas e as β -glicosidases não devem ser inibidas, mantendo altas taxas de conversão a altas concentrações de glicose (Sørensen et al., 2013; Tang et al., 2014). Para isso, muitos estudos têm sido

realizados para melhorar a estabilidade, aumentar a produtividade e sensibilidade à inibidores desta importante enzima (Tsukada et al., 2006; Dashtban & Qin, 2012; Sørensen et al., 2013; Srivastava et al., 2019).

Alguns destes estudos foram realizados com foco na expressão heteróloga e coquetéis enzimáticos como ferramenta para melhora da celulólise. Neste sentido, Lee et al. sugeriram que a produção eficiente de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas poderia ser alcançada por leveduras modificadas capazes de fermentar celobiose sem adição de β -glicosidase extracelular, levando à produção econômica de etanol celulósico. Para isso os autores usaram uma cepa engenheirada de *Saccharomyces cerevisiae* expressando um transportador de celodextrina e uma β -glicosidase intracelular de *Neurospora crassa*. Os resultados da concomitante sacarificação e fermentação demonstraram a possibilidade de redução dos custos para a produção de etanol celulósico (Lee et al., 2013b). Outro estudo recente, realizou a avaliação e simulação econômica da produção industrial de uma β -glicosidase recombinante em *E. coli* na hidrólise da lignocelulose quando usada como uma enzima suplementar. O modelo demonstrou que o custo da produção de enzimas recombinantes em *E. coli* (US\$ 316/kg) ainda é alto em relação ao custo médio de coquetéis de celulasas fúngicas sugeridos pela literatura. Entretanto, os resultados também indicaram que o custo final da enzima pode ser reduzido substituindo a fonte de carbono por alternativas mais baratas, mudando a estratégia de indução ou melhorando o processo de inoculação e a produtividade. Além disso, combinações de mais de uma técnica de simplificação do processo podem resultar em um custo final de 37 US\$/kg da enzima (Ferreira et al., 2018).

Outra característica que favorece o processo de hidrólise da celulose é o uso de β -glicosidases termofílicas e termoestáveis. Vários estudos têm descrito enzimas com esta característica, como a β -glicosidase de *Bacillus subtilis* RA10 que reteve 78 % da sua atividade a 80 °C quando comparada a atividade na sua temperatura ótima de 50 °C. A enzima também reteve 68 % de sua atividade após 48 h de incubação, na sua temperatura ótima (Tiwari et al., 2017). Assim como o gene Dtur_0462 produzido sinteticamente, que codifica a β -glicosidase de *Dictyoglomus turgidum* e expresso em *E. coli*, capaz de manter 70 % de sua atividade após 2h a 70 °C (Fusco et al., 2018). Além disso, a termoestabilidade pode ser a característica almejada em um biocatalisador com outras características positivas. Cao et al. realizaram mutagênese aleatória em uma β -glicosidase isolada de uma biblioteca metagenômica com alta

tolerância à glicose para melhorar sua termoestabilidade. O mutante obtido com três substituições de aminoácidos apresentou meia-vida de 48 h a 50 °C contra 1h da enzima sem mutações. Os autores também testaram os efeitos sinérgicos da enzima mutante com a celulase comercial (Celluclast 1,5® L) na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado, melhorando a conversão a glicose em 14-35 % usando o mutante, mesmo em reações contendo concentrações de glicose iniciais de 20–500 mM (Cao et al., 2015).

Deste modo, a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustível é um processo de múltiplas etapas que ainda está encontrando seu caminho para alcançar a comercialização. Os estudos abordados acima são exemplos de estratégias que vem sendo desenvolvidas a fim de superar os obstáculos para o melhoramento da aplicação das β -glicosidases no processo de produção de biocombustíveis (Srivastava et al., 2019).

3.3.2. Melhoramento de aromas em bebidas

Há uma variedade de precursores de aroma β -glicosídicos nas plantas. A hidrólise destes compostos frequentemente melhora a qualidade dos alimentos e bebidas que foram elaborados a partir destas plantas. Apesar de possuírem β -glicosidases nativas em seus tecidos, geralmente enzimas exógenas podem ser adicionadas aos alimentos e bebidas antes, durante ou após o processamento aumentando a ação catalítica, e conseqüentemente, melhorando a qualidade de aroma e sabor do alimento (Cairns & Esen, 2010). A maioria destes compostos aromáticos em plantas e tecidos de frutas estão presentes na forma de glicoconjugados, tornando-os compostos sem sabor e não voláteis (Maicas & Mateo, 2005). Compostos aromáticos glicosídicos já foram relatados em várias frutas como uva, ameixa amarela, manga, kiwi, maracujá, morango e diversas outras. Estes compostos, são formados pela ligação de uma fração denominada de glicona (parte glicídica) e uma fração denominada aglicona (parte não glicídica). São compostos complexos e diversos em suas estruturas, particularmente a porção aglicona. Para tornar esses compostos disponíveis e liberar sabor, é necessário que ocorra a liberação da porção aglicona, e portanto, esta deve ser hidrolisada da porção glicona (Ahmed et al., 2017).

Deste modo, a liberação de compostos ricos em aroma pelas β -glicosidases vêm sendo amplamente estudada para o melhoramento das características de sucos

e vinhos (Ahmed et al., 2017). Nestas bebidas, as β -glicosidases realizam mecanismo de hidrólise dos precursores glicosídicos de aroma, especialmente, os terpênicos, entre eles; nerol, α -terpineol, geraniol, linalol, citronelol, e outros compostos como, os derivados do benzeno, e álcoois alifáticos (Cabaroglu et al., 2003; Sarry & Günata, 2004; Maicas & Mateo, 2005; Vernocchi et al., 2015). Quando estes compostos são glicosilados, apresentam baixa volatilidade e baixa contribuição para o aroma dos vinhos. Entretanto, quando esses compostos não voláteis e sem sabor, são hidrolisados pelas β -glicosidases, com a conseqüente liberação dos monoterpenos, o vinho adquire um dos parâmetros essenciais para determinar sua qualidade: sabor e aroma acentuados (Maicas & Mateo, 2005; Pogorzelski & Wilkowska, 2007; de Cassia Pereira et al., 2015).

Embora a reação de liberação dos terpenos a partir dos seus precursores não-voláteis possa ser realizada tanto por ação de enzimas quanto por reações com ácidos, a hidrólise enzimática é considerada o método mais adequado pois não altera o padrão de distribuição natural do aroma (Mateo & Jiménez, 2000; Belancic et al., 2003; Cabaroglu et al., 2003; Maicas & Mateo, 2005; Palmeri & Spagna, 2007).

A hidrólise enzimática dos precursores aromáticos é realizada em duas etapas sequenciais, primeiramente, enzimas específicas como a α -L-ramnosidase, clivam o dissacarídeo. Em segundo estágio, a ligação β -glicosídica entre o terpeno e a molécula de glicose é hidrolisada por β -glicosidases, liberando a glicose e a porção aglicona, como monoterpenol (Figura 2) (Günata et al., 1988; Maicas & Mateo, 2005). A glicose liberada nesta reação não exerce efeito no aroma ou sabor, pois a quantidade liberada na hidrólise está no limiar de miligramas por quilo (mg/kg), enquanto o limiar de gustação é tipicamente gramas por quilo (g/kg) (Spagna et al., 2000; Palmeri & Spagna, 2007; Vernocchi et al., 2015).

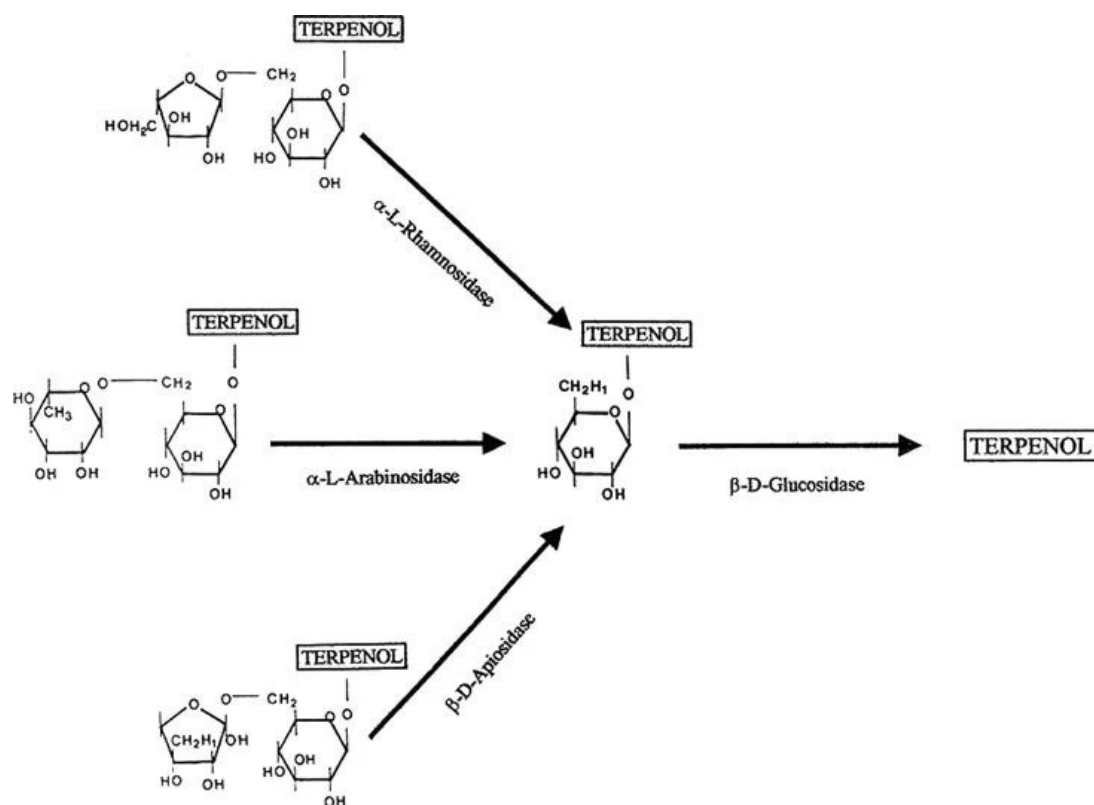


Figura 2. Hidrólise enzimática sequencial dos precursores de aromas dissacarídicos liberando terpenos em sucos e vinhos; adaptado de (Maicas & Mateo, 2005).

Nas uvas, a fração de terpenos não-voláteis, está presente em maior proporção, do que a fração volátil. Estes compostos permanecem estáveis durante o processo de vinificação e estão presentes em altas quantidades nos vinhos jovens (Mateo & Jiménez, 2000; Maicas & Mateo, 2005). Este fato está relacionado à baixa estabilidade das β-glicosidases endógenas do mosto no processo de vinificação, inexistência ou mesmo baixa atividade β-glicosídica das leveduras envolvidas na vinificação como, por exemplo, *Saccharomyces* sp. (Cabaroğlu et al., 2003; Barbagallo et al., 2004). Além disso, os precursores aromáticos passam por uma lenta hidrólise química durante o processo de maturação do vinho. Os precursores aromáticos como, linalol, nerol, e geraniol são então convertidos em precursores menos aromáticos, como, α-terpineol, dióis, óxidos, e outros (Baron et al., 2017). Assim, o acréscimo de β-glicosidases exógenas com alta atividade e estabilidade minimizam esta desvantagem e tornam-se muito atrativas para a otimização de sucos e vinhos (Zhu et al., 2014)

Para um bom aprimoramento do vinho, é importante que a β -glicosidase escolhida seja ativa sob certas condições típicas destas bebidas, como pH baixo, baixas temperaturas e altas concentrações de etanol (Baffi et al., 2013). Neste sentido, as preparações de β -glicosidases originárias de fungos filamentosos levam certa vantagem, pois são notavelmente mais estáveis no pH do vinho do que as de plantas e leveduras (Cabaroglu et al., 2003). Portanto, um interesse crescente tem sido dedicado nos últimos anos ao estudo do uso de β -glicosidases exógenas para realçar o aroma do vinho, e para isso tratamentos enzimáticos por preparações comerciais na forma livre ou imobilizada, leveduras selecionadas, melhoramento de starters microbianos e imobilização enzimática tem sido empregadas (Palmeri & Spagna, 2007; Zhu et al., 2014).

As β -glicosidases também têm sido aplicadas no melhoramento do aroma e aumento do conteúdo de óleos aromáticos de chás, como o chá verde, oolong e pretos (Zhang et al., 2020). Além da aromatização de alimentos e bebidas, estes compostos podem ser melhorados nutricionalmente pela liberação de vitaminas, antioxidantes e outros compostos benéficos advindos de seus glicosídeos (Cairns & Esen, 2010).

3.3.3. Hidrólise de Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais, solúveis em água, que se encontram nos vacúolos das células vegetais na maioria das plantas vasculares. São um subgrupo de grandes metabólitos vegetais secundários chamados flavonoides, derivadas da estrutura básica do cátion flavílico (Khoo et al., 2017). Estruturalmente, as antocianinas são geralmente encontradas na natureza na forma de glicosídeos, portanto, compostos formados pela ligação de uma molécula de açúcar e uma estrutura básica não glicosilada (aglicona) chamada antocianidina. A aglicona forma o núcleo principal da molécula e consiste em três anéis com ligações duplas conjugadas (Khoo et al., 2017; Ribeiro & Veloso, 2021).

As β -glicosidases são capazes de hidrolisar esses importantes agentes de cor encontrados nas plantas, e nestes casos são denominadas de antocianina- β -glicosidases ou antocianases (Santos-Buelga & González-Paramás, 2019). As antocianinas são também os principais pigmentos nas uvas e, portanto, nos mostos, vinhos e demais produtos advindos delas, além dos sucos de frutas de coloração vermelha/roxa. Deste modo, a atividade da β -glicosidase pode afetar as características destes produtos, pois podem provocar a perda da sua coloração

(Vernocchi et al., 2011; Yang et al., 2018). Como relatado anteriormente, as antocianinas responsáveis pela coloração destes frutos e derivados, são formadas pela adição de um mono ou dissacarídeo às antocianidinas. O principal resíduo de açúcar das antocianinas é a molécula de glicose, e, portanto, a descoloração se deve devido à quebra da ligação pela β -glicosidase, entre o resíduo de açúcar e a antocianidina, que então se torna instável e se converte espontaneamente em compostos incolores (Figura 3). Uma vez que as principais antocianinas em sucos de uvas e vinhos são monoglicosídeos, a β -glicosidase pode induzir uma perda de cor nestas bebidas através da hidrólise destes compostos. (Barbagallo et al., 2007; Vernocchi et al., 2011; Wang et al., 2013; Monteiro et al., 2019).

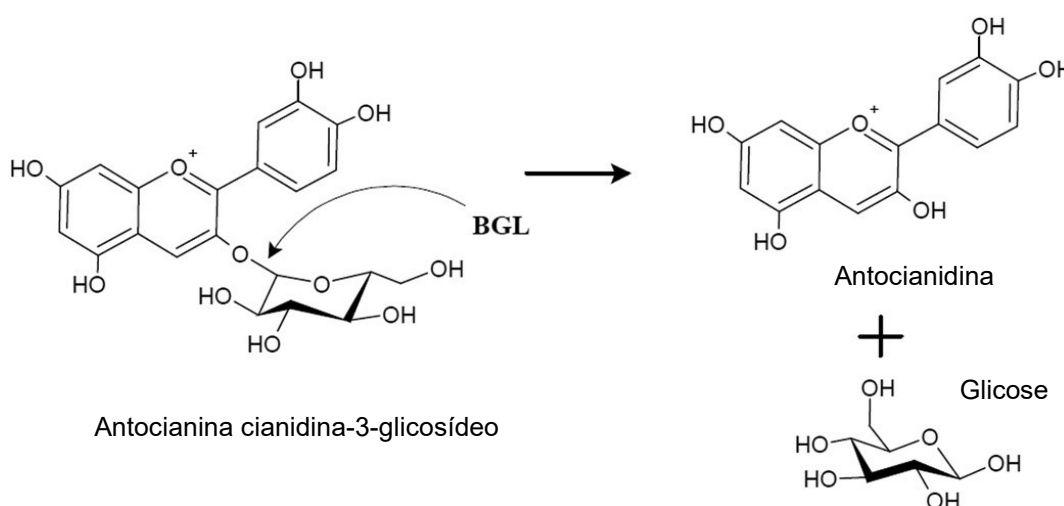


Figura 3. Esquema do mecanismo de hidrólise da β -glicosidase sobre as antocianinas. A enzima é capaz de hidrolisar a ligação indicada pela seta nas antocianinas, liberando uma antocianidina e uma molécula de glicose. No esquema, a antocianina cianidina 3-glicosídeo é representada; adaptado de (Monteiro et al., 2019). BGL: β -glicosidase.

As β -glicosidases estão presentes em preparações enzimáticas comerciais, usadas nas indústrias de processamento de frutas e vegetais, para melhorar as propriedades tecnológicas dos sucos como: nível Brix, rendimento do suco, sabor, extração de cor, clarificação e viscosidade. Estas enzimas estão presentes como enzimas secundárias da maceração, exercendo uma pequena contribuição na ruptura dos envelopes celulares e, por consequência, melhorando a extração em vinificação de tintos. Em seguida, continuando ativas, podem degradar a cor. Este fato dificulta a aplicação das β -glicosidases no processamento de frutas vermelhas, particularmente para a produção de vinho tinto, pois induzem a perda da cor. Assim, há a necessidade

de obtenção de preparações enzimáticas contendo β -glicosidases ativas em diferentes alvos tecnológicos, como celobiose (celulólise), e terpenil- β -D-glicosídeos (intensificador de sabor), mas com baixo efeito de descoloração (antocianidina- β -D-glicosídeos) para uma efetiva aplicação nestas bebidas (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998; Monteiro et al., 2019).

Em contrapartida, as β -glicosidases com alta atividade de hidrólise de antocianinas são uma eficiente ferramenta na produção de vinhos brancos com coloração vermelha reduzida ou na produção de vinhos roses a partir de uvas tintas, onde o processo de maceração pode ser prolongado e o excesso de cor removido por tratamento enzimático (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998; Palmeri & Spagna, 2007; Medina et al., 2019; Monteiro et al., 2019).

3.3.4. Outras Aplicações

Além das aplicações abordadas anteriormente, as β -glicosidases também possuem inúmeras outras aplicações biotecnológicas na indústria de alimentos como, na hidrólise de compostos tóxicos (cianogênicos) presentes em vegetais utilizados na alimentação humana e animal como a mandioca (Cairns & Esen, 2010), hidrólise de isoflavonas como genisteína, daidzeína e gliciteína (Hati et al., 2015), melhorar as propriedades organolépticas dos sucos de frutas cítricas, reduzindo o amargor devido ao composto glicosídico naringina (Singh et al., 2016), dentre outras. Na indústria de ração animal têm sido amplamente utilizadas em combinação com hemicelulases no processamento da ração hidrolisando parcialmente a celulose e hemicelulose, descasque dos grãos de cereais e melhor emulsificação das rações, facilitando a digestibilidade (Juturu & Wu, 2014).

Além disso também são integrantes de preparações enzimáticas aplicadas na reciclagem e destintamento de papel (Lee et al., 2013a; Elliston et al., 2014). Na indústria têxtil são utilizadas rotineiramente no processamento e acabamento de tecidos à base de celulose. São usadas principalmente para eliminar as micro fibrilas superficiais das fibras de algodão e, portanto, para melhorar o brilho da cor, suavidade e maciez do tecido (Shah, S, 2014). Também são usadas como aditivo de detergentes nas indústrias têxteis e de lavanderia, em combinação com endo e exoglicanases alcalinas para remover manchas e sujeira das roupas (Biver et al., 2014).

3.4. Imobilização Enzimática

Para atender à crescente demanda, avanços no campo da biotecnologia e engenharia de proteínas tem proporcionado a produção de muitas enzimas por preços comercialmente viáveis e com propriedades desejadas como especificidade, atividade, seletividade e estabilidade (Sheldon & van Pelt, 2013). Entretanto, sua origem biológica ocasionam características operacionais limitadas que diferem das exigidas para uma implementação industrial (Barbosa et al., 2015; Virgen-Ortiz et al., 2017). As enzimas são moléculas complexas, altamente sensíveis, com específicas estruturas tridimensionais que são essenciais para suas atividades. A exposição a certas condições reacionais, como temperatura e pH elevados, ou solventes orgânicos, podem ocasionar a desnaturação e perda da sua atividade. Além disso, as reações enzimáticas geralmente ocorrem em soluções aquosas, o que dificulta a sua recuperação do meio, sua reutilização, e pode resultar na contaminação do produto (Sheldon, 2011). Deste modo, muitos esforços têm sido conduzidos no desenvolvimento de estratégias eficazes que possam superar estas desvantagens e potencializar a aplicação industrial das enzimas, uma delas é o emprego da imobilização enzimática (Sheldon & Woodley, 2018).

A imobilização enzimática pode ser definida como o processo de confinamento da enzima em uma matriz/suporte física e/ou quimicamente proporcionando um biocatalisador com desempenho operacional superior em comparação com a enzima livre. Este processo pode ser realizado de diferentes maneiras dependendo das distintas características dos grupos funcionais dos aminoácidos das enzimas que interagem com o suporte (Garcia-Galan et al., 2011; Graebin et al., 2016).

O processo de imobilização oferece uma série de vantagens, tais como: facilidade de separação do produto do meio reacional, facilidade de interrupção da reação pela remoção do biocatalisador, e, portanto, maior controle do processo; possibilidade de uso da enzima por um maior período, capacidade de reuso e consequente economia; possibilidade de operação em modo contínuo e ajuste do tempo de residência em reatores contínuos. Além disso, a estratégia de imobilização pode acarretar pequenas distorções na estrutura das enzimas conferindo algumas vantagens como aumento da sua atividade catalítica, maior estabilidade frente a condições anteriormente adversas de pH, temperatura, e inibidores, e mudanças na

sua seletividade (Guisán, 2006; Mateo et al., 2007b; Asgher et al., 2014; Basso & Serban, 2019).

A imobilização de uma enzima significa combinar a sua seletividade, estabilidade e cinética, com as propriedades físicas e químicas do carreador eleito em uma formulação especializada que tem como papel principal a maximização da atividade deste biocatalisador (Sheldon & van Pelt, 2013; Basso & Serban, 2019). Geralmente, a estratégia de imobilização é realizada com base na atividade da enzima, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes, estabilidade operacional, e características finais desejadas para a enzima imobilizada (Sheldon, 2007; Mohamad et al., 2015). As diversas características de suportes, grupos reativos e protocolos de imobilização permitem preparar uma bateria de enzimas imobilizadas com possíveis propriedades diferentes. Estudos de novas matrizes e estratégias de imobilização são passos importantes para superar os obstáculos atuais para aplicações industriais eficazes de enzimas (dos Santos et al., 2015a).

Diversas estratégias podem ser empregadas na imobilização de enzimas, e geralmente elas estão divididas em três categorias: ligação da enzima a um suporte sólido, aprisionamento em uma matriz, e reticulação (Figura 4) (Guisán, 2006; Graebin et al., 2016).

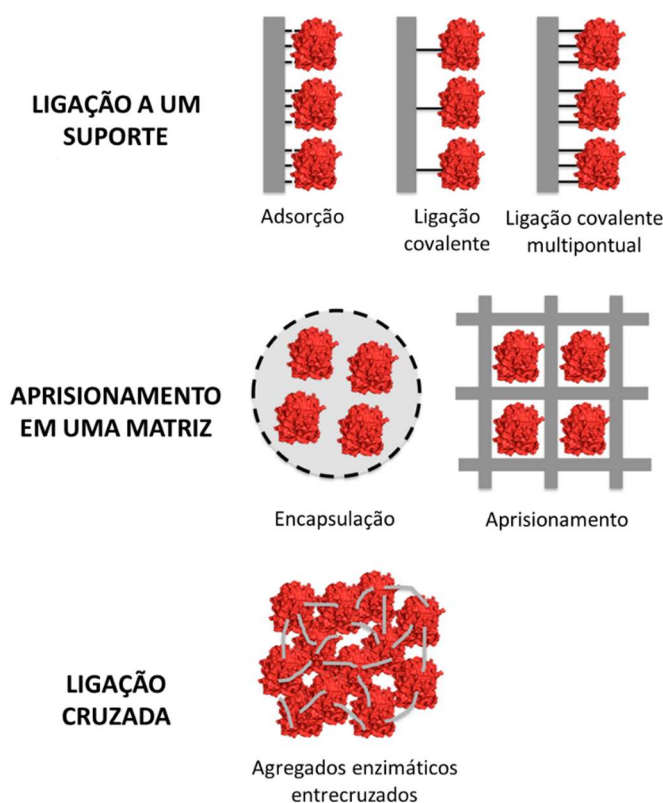


Figura 4. Representação esquemática dos tipos de imobilização, adaptado de Graebin et al., (2016).

A imobilização enzimática através da ligação em suportes sólidos é possivelmente a técnica mais utilizada, e pode ser realizada através de ligação reversível ou irreversível (Graebin et al., 2016).

3.4.1. Imobilização reversível em suportes sólidos

Na imobilização reversível as enzimas interagem com o suporte através de adsorção da enzima na superfície do suporte. A adsorção usa interações físicas entre o suporte e a enzima, incluindo forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e iônicas e ligações de hidrogênio. Este tipo de ligação é geralmente fraca e não altera a estrutura nativa da enzima, permitindo que seu sítio ativo não seja perturbado e conseqüentemente, retendo sua atividade (Mateo et al., 2006b; Hernandez & Fernandez-Lafuente, 2011; Jesionowski et al., 2014).

Reversibilidade significa a possibilidade de promover a dessorção completa da enzima para fora do suporte quando o derivado imobilizado se torna inativado e não pode mais ser utilizado. Os suportes podem então ser recuperados totalmente intactos, e ficam prontos para serem usados novamente para uma nova imobilização de uma nova solução de enzima solúvel (Mateo et al., 2006b). Adicionalmente, a imobilização reversível de enzimas industriais apresentam as seguintes vantagens: os suportes ativados são quimicamente inertes e, portanto, são muito estáveis durante transporte e armazenamento; os protocolos de imobilização são geralmente muito simples e realizados sob condições amenas; e reutilização do suporte diversas vezes acarretando a redução subsequente de custos e desperdícios (Mateo et al., 2006b). Em contrapartida, as principais desvantagens deste método de imobilização compreendem a baixa especificidade da ligação enzima-suporte, e a possibilidade de dessorção da enzima, com possível contaminação do produto (Graebin et al., 2016; Nguyen & Kim, 2017).

3.4.1.1. Imobilização de β -glicosidases por adsorção

Dos diversos protocolos de imobilização reversível o mais antigo, mais simples, também o mais utilizado é a adsorção de enzimas em resinas de troca iônica (Mateo et al., 2006b). Vários estudos têm sido realizados usando esta estratégia para

imobilizar β -glicosidases. A exemplo, β -glicosidase de *Candida molischiana* 35M5N imobilizada por adsorção usando a resina de troca iônica Duolite A-568, que foi aplicada em reatores de leito fluidizado e empacotado para melhorar a qualidade aromática do vinho Muscat (Gueguen et al., 1997). E, usando estes mesmos reatores, uma β -glicosidase comercial foi imobilizada por adsorção na resina Amberlite DP-I para analisar sua capacidade de hidrólise da celulose (Venardos et al., 1980).

Outras resinas de troca iônica que têm sido estudadas para imobilização de β -glicosidases são a dietilaminoetil (DEAE), a carboximetil (CM) e monoamino-N-aminoetil (MANAE). A β -glicosidase produzida pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* obteve os melhores rendimentos de imobilização usando a resina DEAE-sepharose em comparação com Duolite, Amberlite, Celite, e aprisionamento em gel de poliácridamida ou reticulação usando glutaraldeído (Gargouri et al., 2004). Enquanto a β -glicosidase produzida pelo fungo *Malbranchea pulchella* foi mais eficiente na remoção de cor do suco e vinho quando imobilizada em MANAE-agarose do que quando imobilizada na resina de afinidade Concanavalina A (Monteiro et al., 2019). Usando suportes semelhantes, a adsorção de β -glicosidase de *A. japonicus* em MANAE-agarose e DEAE-celulose apresentou aproximadamente 75 e 120 vezes mais estabilidade do que a enzima livre, além de uma rápida imobilização e com alta atividade residual (da Silva et al., 2014).

Outro conhecido método de imobilização, baseado na interação reversível, ocorre entre resíduos de His, geneticamente introduzidos na estrutura da enzima, a *tag* de poli-histidina (*His-tag*), e suportes com superfícies ativadas com íons de metais de transição como Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou Fe^{3+} (Hernandez & Fernandez-Lafuente, 2011). Assim, por exemplo, a β -glicosidase de *Humicola insolens* e a endoglucanase de *Scytalidium thermophilum* foram imobilizadas em nanopartículas de Fe_3O_4 complexadas com quitosana/glutaraldeído/N-(5-amino-1-carboxi-pentil) ácido iminodiacético e funcionalizadas com NiCl_2 . Estas nanopartículas ferromagnéticas funcionalizadas com NiCl_2 apresentaram rendimentos de imobilização de cerca de 20 % para β -glicosidase e endoglicanase e eficiências de 132 % e 115 %, respectivamente. Quando co-imobilizadas o rendimento foi cerca de 49 % (Carli et al., 2019). Noutro estudo, uma nanopartícula de Fe_3O_4 /PMG (poli (N, N'-metilenobisacrilamida-co-glicidil metacrilato)/IDA- Ni^{2+}) foi construída para purificar e imobilizar β -glicosidase recombinante, marcada com His, de *Coptotermes formosanus Shiraki*. Esta nanoestrutura núcleo-casca magnética, na qual Fe_3O_4 é o núcleo e PMG

recoberta com Ni^{2+} abundante é a camada de casca, manteve 75 % de sua atividade após 30 min a 60 °C e reteve mais de 65 % da atividade original após 11 reusos (Zhou et al., 2017).

Assim como na inserção da *tag* de poli-histidina, outras *tags* de afinidade podem ser facilmente fundidas a enzimas por meio da biologia molecular, como é o caso da CBM (módulo de ligação a carboidrato), uma sequência de aminoácidos com intensa afinidade pela celulose. Assim, a β -glicosidase de *Microbacterium testaceum* ATCC 15829 com alta atividade de hidrólise de ginsenosídeos foi fundida com o CBM de *Clostridium thermocellum* e expressa como uma enzima recombinante em *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 para imobilização em celulose amorfa regenerada. A purificação e imobilização da enzima foi alcançada através de uma única etapa, com alta densidade enzimática e através do uso de um suporte ecológico e sustentável como a celulose (Cui et al., 2019).

Qualquer suporte pode ser aplicado para adsorção de enzimas, mas nem todas as enzimas podem ser imobilizadas em todos os suportes. Para que ocorra a adsorção bem-sucedida da enzima, algumas condições devem ser atendidas, entre as quais a afinidade enzima-suporte é a mais importante. Isso é garantido pela presença de grupos ativos específicos no suporte, que permitem a geração das interações enzima-suporte. Entretanto, se ausentes, as interações podem ser ajustadas pela aplicação de agentes intermediários que consigam permitir que a interação enzima-suporte aconteça (Jesionowski et al., 2014). Usando este mecanismo, foi possível modificar uma β -glicosidase comercial por acilação dos grupos amino usando dianidrido piromelítico (PMDA), composto que aumenta as cargas negativas na superfície da enzima. Após a modificação, a imobilização em resina DEAE-celulose foi alcançada, e proporcionou a melhora da estabilidade térmica da enzima (Tyagi & Gupta, 1994).

As β -glicosidases têm sido imobilizadas por adsorção física em uma variedade de materiais carreadores, como por exemplo, β -glicosidase imobilizada em micropartículas ultrafinas de seda Eri, que apresentou estabilidade térmica aumentada pós imobilização (Verma et al., 2013b). Em outro estudo, a β -glicosidase foi depositada em partículas de látex de poliestireno usando a técnica de adsorção camada por camada, que resultou em aumento do rendimento do dodecil- β -D-glicopiranosídeo para as partículas revestidas com uma camada de polieletrólito mais externa (Caruso et al., 2000).

Nanopartículas magnéticas são outro tipo de carreador que foram estudados para a imobilização não covalente de β -glicosidases. A β -glicosidase purificada de *Streptomyces griseus* foi imobilizada com sucesso, por simples absorção, em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sem modificações covalentes. A enzima permaneceu firmemente ligada ao suporte mesmo após lavagens com 2 M de KCl e 50 % de acetonitrila. Na forma imobilizada, a enzima catalisou prontamente a síntese de alquil glicosídeos (Kumar et al., 2017). Nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 acopladas com agarose usando co-precipitação via condições alcalinas e surfactantes em solvente orgânico foram sintetizadas para imobilizar uma β -glicosidase comercial. A enzima ligou-se com eficiência por afinidade ao íon metálico nos grupos amino alcalinos de sua superfície e nas nanopartículas queladas com Co^{2+} , apresentando maior atividade hidrolítica e maior estabilidade térmica e operacional comparada a forma livre. Essas nanopartículas podem ser facilmente separadas do meio de reação por campo magnético e é possível reutilizá-las (Chen et al., 2014). As nanopartículas de sílica também tem sido usadas para imobilizar β -glicosidases (Gómez et al., 2010; Califano et al., 2018; Sannino et al., 2020; Venezia et al., 2020). Recentemente, β -glicosidase comercial foi imobilizada por adsorção em nanopartículas de sílica mesoporosa modeladas com ácido tânico. Os melhores resultados foram obtidos com o suporte com maior área de superfície, rugosidade, e tamanho de poro menor que o diâmetro da enzima. Nesta condição, a enzima foi adsorvida na superfície formando espontaneamente uma coroa multicamadas, preservando sua conformação nativa e com boa ancoragem, mesmo sem ligações covalentes (Venezia et al., 2020).

3.4.2. Imobilização Irreversível em suportes sólidos

A imobilização irreversível é obtida por ligação covalente da enzima ao suporte. A reação ocorre entre os grupos reativos inseridos na superfície do suporte que reagem com os grupos nucleofílicos da cadeia lateral de aminoácidos na superfície da enzima, como lisina, arginina, ácido aspártico, e histidina. Para isso é necessário certo conhecimento da estrutura das enzimas e dos grupos reativos do suporte, tais como -OH, -NH₂, -COOH, -SH (Cowan & Fernandez-Lafuente, 2011). As principais vantagens deste método de imobilização é o aumento da estabilização da enzima imobilizada frente aos efeitos do ambiente reacional, como variação de pH, temperatura, solventes, ação de inibidores. Além disso, é a forma mais efetiva de prevenir a dessorção da enzima do suporte (Mendes et al., 2011a).

Entretanto, a maior interação entre a enzima e o suporte podem acarretar efeitos sobre a estrutura e, conseqüentemente, sobre a atividade catalítica da enzima (Macario et al., 2009). Em alguns casos, pode ocorrer parcial desativação ou redução da atividade da enzima devido à restrição de mobilidade (rigidez) e alterações conformacionais essenciais durante a catálise, causadas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (Mendes et al., 2011a; Miletic et al., 2012). Outro inconveniente geralmente relatado na imobilização covalente é a possibilidade de tornar a região do sítio ativo da enzima menos acessível ao substrato durante o processo de interação da enzima com o suporte (Mateo et al., 2007b).

De um modo geral, os protocolos de imobilização covalente enzimática se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, onde os grupos funcionais são modificados para produzir intermediários reativos (Fernández-Fernández et al., 2013). Os grupos funcionais são geralmente ativados utilizando reagentes como, brometo de cianogênio, carbodiimida, e glutaraldeído (Cao, 2005). O glutaraldeído é o reagente bifuncional mais empregado na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade do seu uso e ao alto rendimento e estabilidade das preparações enzimáticas resultantes (Mateo et al., 2007b; Chaubey et al., 2009; Barbosa et al., 2012). Quando empregado, a molécula de glutaraldeído se liga ao suporte em uma de suas extremidades enquanto a outra extremidade se liga à enzima, formando uma ligação covalente. Mais precisamente entre os grupos amino (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de amina química) da enzima, e os grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff (Mateo et al., 2007b; Brady & Jordaan, 2009; Barbosa et al., 2012; Sheldon & van Pelt, 2013).

Deste modo, a etapa subsequente da imobilização covalente ocorre pela adsorção das enzimas na superfície do suporte, devido a formação das ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos e os grupos reativos na superfície do suporte. Muitas vezes essa ligação pode ser influenciada por características do meio reacional, uma vez que afetam a reatividade dos aminoácidos. Como exemplo do que ocorre com o aminoácido lisina (um dos principais aminoácidos envolvido nas imobilizações), que tem uma reatividade muito baixa a pH neutro, e estão protonados, por possuírem um pKa em torno de 10,5. Desta forma, para que a ligação covalente ocorra nestas condições pode ser necessário um maior tempo e/ou o uso de temperaturas moderadamente elevadas, promovendo uma menor rigidez na molécula

da enzima que favorece a reatividade para formação de ligações. Portanto, a depender da enzima, pode ser necessário a manipulação de variáveis como tempo, pH, força iônica, e temperatura para aumentar a formação de ligações entre enzima e suporte. Em pH alcalino os resíduos de aminoácidos de lisina encontram-se na forma de nucleófilo e certamente nesta condição haverá uma maior taxa de imobilização em menor tempo (Mateo et al., 2000).

3.4.2.1. Imobilização por ligação covalente de β -glicosidases

A imobilização covalente pode ser do tipo unipontual, ou multipontual. Na imobilização unipontual (Figura 5), a reação é realizada em condições mais brandas, através da ligação covalente entre poucos grupos, geralmente, ocorrendo apenas entre o suporte e o grupamento amino terminal da enzima, pois este é o único grupo amino desprotonado em condições amenas e de pH neutro, como ocorre em suportes ativado com brometo de cianogênio (BrCN). Os biocatalisadores resultantes são excelentes como modelo para o estudo da enzima de interesse, pois não são esperadas alterações significativas na estrutura tridimensional da enzima neste tipo de imobilização (Filice et al., 2011; Monteiro et al., 2019; Karami et al., 2020). No caso das β -glicosidases, recentemente, os biocatalisadores de *A. niger* (Karami et al., 2020) e *Malbranchea pulchella* (Monteiro et al., 2019) foram eficientemente imobilizadas neste suporte.

Na imobilização multipontual (Figura 5) vários grupos reativos do suporte reagem com diferentes grupos da mesma molécula de enzima, normalmente, grupos aldeído do suporte com o grupo amino terminal e grupos amino de resíduos de lisina na superfície da enzima. Como relatado anteriormente, estas ligações podem alterar significativamente as propriedades catalíticas da enzima, tanto positiva quanto negativamente (Mateo et al., 2007b; Reis et al., 2019). A ligação covalente multipontual em suportes altamente ativado por meio de braços espaçadores curtos e envolvendo muitos resíduos da superfície da enzima promove uma rigidificação da estrutura da enzima imobilizada. Em contrapartida, essa intensa interação também é a responsável pelo aumento de estabilidade da enzima. Além disso, este tipo de ligação normalmente requer longos tempos de reação, temperaturas moderadamente altas e valores de pH alcalinos (Pedroche et al., 2007; Cowan & Fernandez-Lafuente, 2011). Assim, a necessidade de escolher sistemas de imobilização adequados para aproveitar as melhores perspectivas dessas técnicas e prover as melhores

características para o biocatalisador torna-se evidente (Mateo et al., 2007b; Cowan & Fernandez-Lafuente, 2011; Reis et al., 2019).

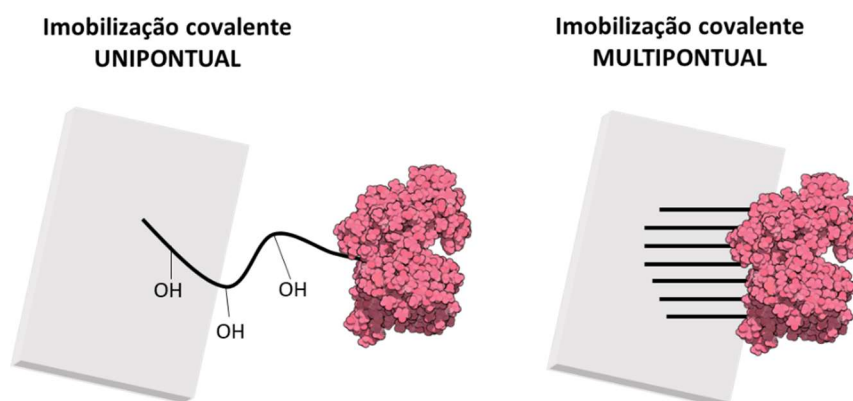


Figura 5. Representação esquemática da imobilização covalente unipontual e multipontual.

Um dos suportes mais empregados para imobilização covalente de β -glicosidases é o suporte de quitosana (Graebin et al., 2016). A quitosana também tem sido explorada como material de revestimento ou em combinação com outros suportes. Como por exemplo, a β -glicosidase comercial que foi imobilizada em grânulos compostos de quitosana e nanotubos de carbono reticulados com glutaraldeído para aplicação no aumento do perfil aromático de diferentes chás (Çelik et al., 2016). Entretanto, atualmente, o estudo das nanopartículas magnéticas vêm ganhando amplo destaque na imobilização de enzimas, devido à sua baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas, estabilidade térmica, elevada área superficial e, principalmente, devido sua excepcional característica da rápida separação do meio reacional pela simples aplicação de um campo magnético externo (Tischer & Kasche, 1999; Bilal et al., 2018; Dal Magro et al., 2019).

β -glicosidases têm sido imobilizadas neste carreador através de funcionalização com agentes reticulantes como o glutaraldeído (Khan et al., 2012b; Verma et al., 2013a; Park et al., 2018), e a carbodiimida (Ferner et al., 2016; Chamoli et al., 2020). Entretanto, outros compostos com propriedade reticulante vêm sendo estudados, entre eles o biopolímero conhecido como pululano, produzido por *Aerobasidium plutonium*, que tem demonstrado substancial propriedade de

reticulação. Uma β -glicosidase comercial foi imobilizada em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 modificadas com o composto polifenólico ácido aminotânico e posteriormente modificada pelo polialdeído pululano como um reticulador para aumentar a capacidade e a força da nanopartícula (Moradi et al., 2020). Outro composto que tem sido empregado com sucesso como reagente bifuncional é a genipina, uma aglicona do geniposídeo, glicosídeo encontrado na *Gardenia jasminoides* ou no jenipapo (*Genipa americana*). Seu poder reticulante foi testado na imobilização da β -glicosidase do cogumelo *Agrocybe aegerit* e comparado com a imobilização com o glutaraldeído como agente reticulante. Para isso a enzima foi primeiramente adsorvida em nanopartículas de sílica e em seguida o geniposídeo foi adicionado na reação, de modo que a genipina fosse produzida por autocatálise da enzima imobilizada. Os resultados demonstraram que o biocatalisador reticulado com genipina apresentou uma temperatura ótima mais elevada, e uma faixa de pH ótimo foi mais ampla do que a enzima livre e a imobilizada usando glutaraldeído (Naseer et al., 2020). Além disso, uma β -glicosidase comercial imobilizada em quitosana usando genipina como reticulante, também se destacou em comparação com o biocatalisador reticulado com glutaraldeído e com a enzima livre (Phadungcharoen et al., 2019).

Para superar a baixa possibilidade de ligação das nanopartículas de óxido de ferro à enzima, muitos pesquisadores têm estudado diferentes técnicas de revestimento das partículas, além de combinações com polímeros ou outros materiais (Reis et al., 2019). Além disso, estudos têm demonstrado que a força magnética das nanopartículas de Fe_3O_4 pode ser fortalecida após ser modificada com grupos funcionais (Shi et al., 2019). Em um destes estudos as nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 foram bi funcionalizadas com grupos de sílica e amina, e posteriormente ativadas com glutaraldeído para imobilizar β -glicosidase de semente de trigo sarraceno. O derivado aumentou 16 % e 48 % o teor de aromas, e 65 e 5 vezes os flavonóides agliconas na solução de chá verde e de chá preto, respectivamente (Yang et al., 2019). Noutro estudo, nanopartículas magnéticas foram ativadas com grupos amino, e revestidas com silicato de tetraetila, celulose e uma estrutura de nitrato de zinco hexa-hidratado para melhorar suas propriedades. A β -glicosidase recombinante de *Thermomotoga petrophila* DSM 13995 imobilizada neste derivado apresentou excelente estabilidade a altas temperaturas e resistência a ácidos (Shi et al., 2019). Outra interessante nanopartícula híbrida tem sido estudada usando lignina extraída de resíduo lignocelulósico, que neste caso, foi proveniente do licor obtido do pré-

tratamento organossolvente de fibra de coco verde. A β -glicosidase comercial imobilizada nestas nanopartículas de lignina/ Fe_3O_4 , usando epicloridrina como agente de ligação covalente, apresentou alta capacidade de adsorção de corantes têxteis em comparação com outros adsorventes (de Araújo Padilha et al., 2020).

Além das nanopartículas de óxido de ferro, outra nanotecnologia que tem sido amplamente estudada como carreadora na imobilização de β -glicosidases via ligação covalente são as nanopartículas de sílica (Singh et al., 2011; Agrawal et al., 2016; Guo et al., 2018; Sannino et al., 2020). A técnica comumente utilizada para imobilização das β -glicosidases neste carreador foi através da ativação das nanopartículas com glutaraldeído (Agrawal et al., 2016; Guo et al., 2018). Entretanto, recentemente, o uso da molécula bifuncional trietoxissililpropilisocianato (TEPI) para ligação covalente de uma β -glicosidase comercial em nanopartículas de sílica também foi explorado. Os autores relataram que este ligante bifuncional e o uso de um solvente orgânico (acetona anidra) no qual a enzima era insolúvel, e portanto, manteve sua estrutura, formaram um microambiente muito favorável no interior dos nanoporos, melhorando a atividade catalítica da enzima (Sannino et al., 2020).

Dentre a infinidade de materiais e tipos de suportes disponíveis para imobilização covalente de β -glicosidases, também merecem destaque os suportes contendo grupos epóxi (Tu et al., 2006; Gonzalez Pombo et al., 2011; Pinotti et al., 2020), e glioxil (Borges et al., 2014; Pinotti et al., 2020). Ambos os grupos podem reagir com os grupos Lys das aminas primárias em pH 10, promovendo várias ligações entre a enzima e o suporte (Mateo et al., 2007b; Rodrigues et al., 2013). Os suportes epóxi são muito estáveis, tornando possível realizar incubações de longo prazo de enzimas imobilizadas sob condições alcalinas, a fim de obter uma ligação covalente multipontual intensa. Além disso, apresentam braços espaçadores curtos e podem reagir com muitos grupos nucleofílicos presentes na superfície da proteína, por exemplo, Lys, Cys, His, Tyr e, de forma mais lenta, com grupos carboxílicos. Após a reação de imobilização, os grupos epóxi restantes podem ser facilmente bloqueados para interromper qualquer tipo de reação covalente indesejada entre suporte-proteína (Mateo et al., 2002, 2007a). Suportes com grupos epóxi foram utilizados para imobilizar a β -glicosidase de *Issatchenkia terricola* (Gonzalez Pombo et al., 2011), de duas variantes da β -glicosidase termoestável TnBgl1A (wt e N221S/P342L) da *Thermotoga neapolitana* (Khan et al., 2012a), e da β -glicosidase comercial Novozyme 188, em suportes acrílicos Eupergit® C. Ressalto a β -glicosidase imobilizada de

Issatchenkia terrícola que foi aplicada na aromatização do vinho Muscat branco. O tratamento enzimático aumentou significativamente a quantidade de monoterpenos e norisoprenoides, mostrando o potencial da enzima imobilizada para o desenvolvimento de aromas em vinhos (Gonzalez Pombo et al., 2011).

Os grupos glioxil são pequenos aldeídos alifáticos que formam bases de Schiff muito instáveis com grupos amino e não parecem ser úteis para a imobilização de enzimas em pH neutro. No entanto, em condições alcalinas, os suportes de glioxil são capazes de imobilizar enzimas, via, pelo menos, uma reação de dois pontos envolvendo a região da superfície da proteína com maiores densidades de grupos amino. Uma ligação multipontual mais intensa entre a proteína imobilizada e o suporte ativado pode ser promovida, com perda mínima de atividade catalítica, por uma incubação de longo prazo do conjugado proteína-suporte em condições adequadas. Após a reação de imobilização, os grupos glioxil restantes são facilmente bloqueados por redução suave com boro-hidreto. Após essa redução, a enzima permanece ligada ao suporte por meio de ligações amino secundárias muito estáveis e os grupos aldeídos restantes no suporte são convertidos em grupos hidroxila totalmente inertes (Mateo et al., 2006a; López-Gallego et al., 2020). Este grupo reativo foi utilizado na imobilização de algumas β -glicosidases comerciais como da Novozymes (Vieira et al., 2011), Megazyme (Morais Junior et al., 2021), e Genencor (Borges et al., 2014), para aplicação na bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

As preparações enzimáticas comerciais Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Color, Pectinex Smash XXL, Pectinex Ultra Clear e Pectinex BE XXL, Celluclast® 1.5L foram gentilmente doadas pela Novozymes (Espanha). O preparado Rohapect 10 L foi obtido do grupo Amazon (Brasil) e a Lallyzyme Beta foi fornecido pela Lallemand Wine (França). *Aspergillus niger* URM 6642, foi isolado do bioma Mata Atlântica, do acervo do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Cascavel, Brasil) (número de acesso GenBank: KF909374).

p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), glicidol, glicina, glutaraldeído (fração de volume de 25%), boro-hidreto de sódio, celobiose, periodato de sódio,

divinilsulfona (DVS) e EDA foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, EUA). As esferas de agarose CL-4 B foram adquiridos da GE Healthcare. Todos os demais reagentes, solventes e produtos químicos usados foram de grau analítico.

4.2. Determinações Analíticas

4.2.1. Determinação da atividade da β -glicosidase

As atividades das enzimas solúveis e imobilizadas foram determinadas utilizando o pNPG como substrato, e o *p*-nitrofenol foi utilizado como padrão na curva de calibração. A reação foi realizada através da mistura de 100 μ l de pNPG (9 mM) em tampão de citrato de sódio 100 mM a pH 4,8, 100 μ l do mesmo tampão e 100 μ l de enzima livre ou imobilizada, e incubado a 40 ° C por 5 min. Ao final, foi adicionado 1,2 ml de Na₂CO₃ (0,1 M, pH 10) para interromper a reação, e a concentração de *p*-nitrofenol foi medida em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

4.2.2. Quantificação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al., (1951), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Em um tubo de ensaio foram adicionados 100 μ L da amostra diluída e 2,5 mL da solução alcalina de CuSO₄.5H₂O 0,5 %, com NaOH 0,1 M, Na₂CO₃ 2 % e KNaC₄H₄O₆.4H₂O 0,1 % (proporção 1:50). A solução foi incubada por 10 min à 37 °C. Em seguida, 300 μ L de Folin-ciocalteau diluído em água (1:1) foi adicionado e incubado por 30 min no escuro. Após este tempo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 750 nm, contra um controle preparado com água destilada, submetido ao mesmo procedimento.

Os valores de absorvância foram convertidos em concentração de proteína utilizando uma curva de calibração construída com soluções de BSA entre 0,1 mg.mL⁻¹ a 2,0 mg.mL⁻¹.

4.2.3. Efeito do pH na atividade das enzimas e tolerância à glicose

O efeito do pH na atividade enzimática e na tolerância à glicose das preparações de β -glicosidase foi estudado incubando a mistura de reação em pH 3,0 (tampão citrato de sódio 0,1 mol.L⁻¹), 4,8 (tampão citrato de sódio 0,1 mol.L⁻¹), e 7,0

(0,1 mol.L⁻¹ tampão fosfato de sódio), e medindo a atividade enzimática na presença de diferentes concentrações de glicose (0 - 222 mmol.L⁻¹) usando o método de determinação de atividade enzimática descrito no item 4.2.1. A atividade inicial foi padronizada para 2 U.mL⁻¹ para todas as preparações. A atividade relativa foi definida como a atividade da enzima em cada concentração de glicose em comparação com a atividade na ausência de glicose.

4.2.4. Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da constante de Michaelis (K_M) e V_{max} de cada preparação enzimática comercial foram determinados pela hidrólise de pNPG variando a concentração de 60 a 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A constante de inibição (K_I) foi determinada para concentrações de glicose de 5, 10 e 20 mmol.L⁻¹. As reações foram realizadas em pH 4,8 e 40 °C, e os parâmetros foram calculados por regressão não linear utilizando a ferramenta Solver do Microsoft Excel 2016.

4.2.5. Análise da tolerância à glicose na hidrólise da celobiose

As preparações enzimáticas contendo 4 mg de proteína foram incubadas em 1 mL de uma solução de celobiose (117 mmol.L⁻¹) a 40 °C e a reação foi conduzida medindo a liberação de glicose até o sistema atingir o equilíbrio. Em seguida, a mesma concentração inicial de enzima foi adicionada à reação para garantir que o final da reação não fosse devido à inativação da enzima. A reação foi fervida por 10 min, seguida por resfriamento em um banho de gelo. A quantidade de glicose liberada foi medida usando um kit de ensaio enzimático de glicose oxidase (GOD-POD, Spinreact, Espanha) a 37 °C por 15 min, com base no método D-glicose oxidase-peroxidase (Javed et al., 2016). A absorbância foi medida a 505 nm.

4.2.6. Efeito do pH na estabilidade térmica das β -glicosidases

A inativação térmica das preparações de β -glicosidase foi realizada usando 2 U de atividade enzimática, em pH 3,0 (tampão citrato de sódio 100 mmol.L⁻¹), pH 4,8 (tampão citrato de sódio 100 mmol.L⁻¹), e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹) a 60 °C. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e a atividade do biocatalisador foi determinada usando o ensaio pNPG, como descrito no item 4.2.1. A atividade residual foi calculada em relação à atividade enzimática inicial.

4.2.7. Gel de eletroforese SDS-PAGE

O gel de eletroforese SDS-PAGE foi realizado de acordo com Laemmli et al., (1970), usando a Miniprotean tetra-cell (Bio-Rad). Um gel de corrida a 12 % de poliacrilamida foi adicionado em uma zona de separação de 9 cm × 6 cm, seguido pela adição de poliacrilamida a 5 %. As amostras foram suspensas em tampão de carregamento (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; Glicerol 25 %; Dodecil Sulfato de Sódio 2 %; Azul de Bromofenol 0,01 %) e fervidas por 5 min. Após a corrida, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie.

4.3. Preparação dos suportes de agarose

4.3.1. Suporte glioxil-agarose

A preparação do suporte de glioxil-agarose foi realizada de acordo com o método descrito por Mateo et al., (2006a). Cada fração de 10 g de agarose foram lavadas com água destilada e secas a vácuo. Em seguida, NaOH 1 M contendo borohidreto de sódio (NaBH_4) 0,5 M (3 mL de solução por grama de suporte) foram adicionados. Esta suspensão básica foi mantida em banho de gelo sob agitação mecânica, enquanto glicidol foi adicionado gota a gota, a fim de chegar em uma concentração final de 2 M. A suspensão foi agitada suavemente durante a noite (18 h) à temperatura ambiente, em recipiente aberto para liberação de H_2 formado no meio reacional. Após esse período, o suporte foi exaustivamente lavado com água destilada, e filtrado a vácuo. Em seguida, para cada grama do suporte ativado foram adicionados 10 mL de água destilada, e 200 μmols de NaIO_4 . A reação de oxidação foi realizada por 2 h sob agitação suave à temperatura ambiente. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada até pH neutro, filtrado a vácuo e armazenado a 4 °C.

4.3.2. Suporte MANAE e MANAE-glutaraldeído

O suporte de monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE) foi preparado a partir do suporte glioxil-agarose, descrito no item 4.3.1, e modificado com etilenodiamina. Para cada grama de suporte (lavado com água destilada e seco a vácuo), foi adicionado 4 mL de solução de etilenodiamina 2 M, pH 10 (preparado em banho de gelo), e a suspensão ficou sob agitação suave por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, 10 mg.mL^{-1} de NaBH_4 foi adicionado para reduzir o suporte, e a suspensão foi agitada

por mais 2 h. Em seguida, o suporte obtido foi lavado com tampão acetato 100 mM, pH 4 para a remoção do NaBH₄ residual, depois, lavado com tampão carbonato 100 mM, pH 9, para desprotonar os grupos aminos, e, finalmente, com água destilada, seguido pela filtração a vácuo e armazenamento a 4 °C (Zaak et al., 2017).

O suporte MANAE-glutaraldeído foi preparado a partir do suporte MANAE descrito acima. Para isso, cada 10 g do suporte MANAE foi adicionado a 50 mL de uma solução de glutaraldeído a 15 % (v/v) preparado em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7, sob agitação suave durante 18 h à temperatura ambiente (Zaak et al., 2017). Após este período, o MANAE-glutaraldeído obtido foi abundantemente lavado com água destilada para a remoção do excesso de glutaraldeído, filtrado, e armazenado a 4 °C.

4.3.3. Suporte divinilsulfona-agarose

A preparação do suporte de divinilsulfona-agarose foi realizada como descrito por dos Santos et al. (2015b). Um volume de 7,5 mL de divinilsulfona (DVS) foi adicionado à 200 mL de tampão de carbonato de sódio (333 mM) a pH 12,5, e vigorosamente agitada até a solução se tornar homogênea. Em seguida, 10 g de agarose, lavada e seca a vácuo, foram adicionados à solução sob agitação suave por 35 min. Depois disso, o suporte foi abundantemente lavado com água destilada, filtrado e armazenado a 4 °C.

4.3.4. Suporte epóxi-agarose

A preparação do suporte epóxi-agarose foi realizada como descrito por da Silva et al. (2019). Para isso, 10 g de agarose, lavada com água destilada e seca a vácuo, foi adicionada em 100 mL de uma solução de NaOH 2 M contendo 0,6 g de NaBH₄, sob agitação em banho de gelo. Em seguida, 10 mL de epicloridrina foi adicionada lentamente, sempre verificando se não há aumento na temperatura. A suspensão foi mantida sob suave agitação em recipiente aberto por 15 h à temperatura ambiente para a liberação de H₂ formado no meio reacional. Após este tempo, o suporte ativado foi lavado abundantemente com água destilada até pH neutro, filtrado e armazenado a 4 °C.

4.4. Purificação parcial das β -glicosidases

A purificação parcial das enzimas foi realizada, através de cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose, equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5 a 4 °C. Os extratos enzimáticos (15 mg de proteína por g de resina) foram aplicados e subsequentemente eluidos usando um gradiente linear de 0,05-1,0 M de NaCl diluído no mesmo tampão. As alíquotas contendo a maior atividade de β -glicosidase foram reunidas, dialisadas por ultrafiltração usando membrana de corte de 10 kDa e, a seguir, armazenadas a -20 °C até as análises posteriores.

4.5. Imobilização das β -glicosidases

4.5.1. Considerações gerais

Os parâmetros de imobilização foram definidos conforme descrito por Sheldon e van Pelt (2013). O rendimento de imobilização (RI), a eficiência de imobilização (EI) e a atividade recuperada (AR) foram calculados conforme as equações abaixo:

$$RI (\%) = \left[\frac{\text{Atividade Imobilizada (U)}}{\text{Atividade Inicial (U)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$EI (\%) = \left[\frac{\text{Atividade do biocatalisador (U)}}{\text{Atividade imobilizada (U)}} \right] \times 100 \quad (2)$$

$$AR (\%) = \left[\frac{\text{Atividade do biocatalisador (U)}}{\text{Atividade Inicial (U)}} \right] \times 100 \quad (3)$$

As etapas de imobilização foram realizadas medindo a atividade da enzima no sobrenadante e em toda a suspensão em diferentes intervalos de tempo usando pNPG como substrato conforme descrito no item 4.2.1. Adicionalmente, controles com a enzima solúvel foram utilizados para determinar o possível efeito inativador das condições experimentais durante a imobilização. As suspensões foram preparadas na relação 1:10 (suporte/suspensão). A carga das β -glicosidases parcialmente purificadas foi de 10 mg por grama de suporte.

4.5.2. Imobilização em glioxil-agarose

A imobilização das β -glicosidases no suporte glioxil-agarose foi realizada pela adição da enzima preparada em carbonato de sódio 50 mM, pH 10,05, ao suporte, a

4 °C por até 72 h sob agitação contínua em um agitador de rolos horizontal. Após a imobilização, os derivados foram reduzidos pela adição de 1 mg.ml⁻¹ de NaBH₄ sob agitação suave durante 30 min. Os derivados resultantes foram lavados com água destilada abundante, filtrados a vácuo, usando um filtro de vidro sinterizado, e armazenados a 4 °C, até a sua utilização.

4.5.3. Imobilização em MANAE e MANAE-glutaraldeído

Para a imobilização em MANAE-agarose, as preparações enzimáticas foram diluídas em tampão fosfato de sódio 5 mM em pH 5,0, pH 7,0 ou pH 9,0, misturadas com o suporte (1g de suporte para 10mL de solução enzimática) e agitadas suavemente a 4 °C durante 2h. A enzima imobilizada foi filtrada e lavada com o mesmo tampão. Em alguns casos, a enzima, previamente adsorvida em MANAE-agarose, foi tratada com solução de glutaraldeído a 0,5 % (v/v) usando tampão de fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 e 25 °C por 90 min. Posteriormente, a enzima imobilizada modificada foi lavada com o mesmo tampão para remover o excesso de glutaraldeído, filtrados a vácuo, usando um filtro de vidro sinterizado, e armazenados a 4 °C, até a sua utilização (López-Gallego et al., 2005). Esta metodologia originou o derivado denominado MANAE-GLU-Agarose.

A imobilização em MANAE-glutaraldeído foi realizada pela diluição da enzima em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0, na presença ou ausência de NaCl 1M e misturada com o suporte. As suspensões enzima-suporte foram agitadas suavemente a 4 °C durante 24 horas. Transcorrido este tempo os biocatalisadores foram lavados abundantemente com água destilada, filtrados a vácuo, usando um filtro de vidro sinterizado, e armazenados a 4 °C, até a sua utilização. Esta metodologia originou o derivado denominado MANAE-E-GLU.

4.5.4. Imobilização em divinilsulfona-agarose

A imobilização em DVS foi realizada através da diluição da enzima em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, tampão fosfato de sódio pH 7,0, ou carbonato de sódio a pH 9,0, e 10,0, com o suporte, a 4 °C por até 72 h sob agitação contínua em um agitador de rolos horizontal. Após a imobilização, os biocatalisadores imobilizados foram incubados durante 24 h em solução de EDA 1 M a pH 10,0 ou glicina 1 M a pH 8,0 para bloquear os grupos reativos remanescentes. Transcorrido este tempo, os derivados resultantes foram abundantemente lavados com água destilada, filtrados a

vácuo, usando um filtro de vidro sinterizado, e armazenados a 4 °C, até a sua utilização.

4.5.5. Imobilização em epóxi-agarose

Para a imobilização em suporte de epóxi-agarose, as β -glicosidasas foram diluídas em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. As suspensões enzima-suporte foram suavemente agitadas em um agitador de rolos horizontal à 4 °C por até 72 h. Transcorrido este tempo, os derivados resultantes foram abundantemente lavados com água destilada, filtrados a vácuo, usando um filtro de vidro sinterizado, e armazenados a 4 °C, até a sua utilização.

4.6. Caracterização dos biocatalisadores

4.6.1. Efeito da glicose nos biocatalisadores

Para determinar o efeito da glicose nas β -glicosidasas livres e imobilizadas, a atividade das enzimas foram medidas na presença de diferentes concentrações de glicose (5,55 – 222 mmol.L⁻¹) em tampão citrato 0,1 M pH 3,0 e pH 4,8. A atividade enzimática residual foi medida pelo método pNPG, conforme descrito no item 4.2.1. A atividade relativa foi definida como a atividade da enzima em cada concentração de glicose em comparação com a atividade do controle sem glicose. Os resultados também foram expressos como IC₅₀, correlacionando a concentração de glicose que reduz a atividade da β -glicosidase em 50 % de sua atividade inicial, sem glicose, no pH avaliado.

4.6.2. Avaliação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas livres e imobilizadas foram avaliadas incubando os biocatalisadores em tampão citrato de sódio (100 mM, pH 4,8) nas temperaturas de 55 °C, 60 °C, 65 °C ou 70 °C. Periodicamente, alíquotas foram retiradas para determinação da atividade enzimática conforme descrito no item 4.2.1. A inativação térmica foi descrita por uma equação de primeira ordem (Equação 4):

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (4)$$

Onde: A é a atividade da enzima, A_0 é a atividade enzimática inicial, t é o tempo de reação e k é a constante da taxa de inativação na temperatura estudada. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) das enzimas representam o tempo em que a enzima alcança 50 % da sua atividade inicial, e foi calculado a partir dos valores de k , com a seguinte equação (Equação 5):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (5)$$

O fator de estabilização (SF) foi calculado como a razão entre o tempo de meia-vida das β -glicosidases solúveis e imobilizadas para cada temperatura estudada.

4.6.3. Avaliação da estabilidade operacional

A estabilidade operacional das β -glicosidases imobilizadas foi avaliada através de ciclos subsequentes, de reações de hidrólise da celobiose. As reações foram realizadas com 100 mg da enzima imobilizada, 1,0 mL de 117 mmol.L⁻¹ de celobiose preparada em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, à 40 °C por determinado período, a depender do biocatalisador. Após este tempo de reação, as enzimas imobilizadas foram separadas por centrifugação (4.000 g por 5 min e 4 °C), lavadas três vezes com tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, e então reutilizadas em uma nova reação. A atividade enzimática medida no primeiro ciclo foi considerada como 100 % para o cálculo da atividade remanescente após cada ciclo sucessivo. A atividade foi determinada conforme descrito no item 4.2.5.

4.6.4. Preparação do suco de uva

O preparo do suco de uva utilizado nos experimentos de remoção de cor foi realizado conforme descrito por Monteiro et al. (2019). Para isso, 400 g de uvas *Vitis labrusca* foram esmagadas manualmente. Em seguida, foram transferidas para um banho a 70 °C, e maceradas com um agitador de pás durante 10 min. Após este período, água destilada foi adicionada ao macerado em uma relação 1:1 (v/v). O suco foi então filtrado e submetido a leituras de absorvância a 520 nm. O pH final do suco de uva foi de 3,32.

4.6.5. Aplicação dos biocatalisadores no suco de uva e no vinho tinto

Para verificar a capacidade de descoloração das β -glicosidases imobilizadas, através da hidrólise de antocianinas, foram realizados testes em suco de uva, suco de uva diluído em água destilada (1:1), vinho tinto e vinho tinto diluído em água destilada (1:1) conforme descrito por Monteiro et al. (2019), com modificações. O vinho utilizado foi o Montes Claros DOC Alentejo (Portugal), classificado como vinho regional Alentejano produzido a partir de Touriga Nacional, Aragonez e Syrah com percentual alcoólico de 13,5 % e pH 3,43. O suco utilizado foi preparado como descrito no item 4.6.4.

Os testes foram realizados com a adição de 0,5 U totais do biocatalisador imobilizado em um volume de 2 mL do suco ou do vinho. As suspensões foram mantidas a 60 °C, por até 6 h, sob agitação. Após este período, as suspensões foram filtradas, e a coloração do filtrado foi medida por método espectrofotométrico a 520nm. Alíquotas do suco e do vinho, e das suas frações diluídas, foram mantidos nas condições do ensaio como controle da reação e sua absorbância foi considerada como 100 %.

5. ARTIGOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos, e suas formatações estão apresentadas de acordo com as normas das revistas em que foram publicados.

5.1. Physico-chemical properties, kinetic parameters, and glucose inhibition of several beta-glucosidases for industrial applications

As características físico-químicas e cinéticas de uma enzima, ou de um preparado comercial, são fatores importantes a serem avaliados no momento de eleger o biocatalisador industrial mais eficiente e mais econômico. Sendo assim, as atividades de β -glicosidase de nove preparações enzimáticas comerciais foram comparadas avaliando-se os efeitos do pH, estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e tolerância à glicose. Os resultados estão apresentados no manuscrito a seguir, publicado no periódico *Process Biochemistry*, v. 78, p. 82-90, 2019 (DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.008).

**Physico-chemical properties, kinetic parameters, and glucose inhibition of
several beta-glucosidases for industrial applications**

Diandra de Andrades,¹ Natália G. Graebin,¹ Marco A. Z. Ayub,¹ Roberto Fernandez-Lafuente,² Rafael C. Rodrigues^{1,*}

^aBiotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bDepartment of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, ZC 28049, Madrid, Spain

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7793

E-mail address: rafaelcrodrigues@ufrgs.br (R. C. Rodrigues)

Website: www.ufrgs.br/bbb

Abstract

The β -glucosidase activities of nine commercial enzymatic preparations were compared by evaluating the effects of pH, thermal stability, kinetic parameters, and glucose tolerance. The pH value of the reaction medium strongly influenced the activities, stabilities, and glucose inhibition of the assayed β -glucosidases. Celluclast® 1.5 L showed the highest activity on pNPG hydrolysis (70.55 U.mL^{-1} and 0.69 U.mg^{-1}), whereas Lallzyme Beta produced the highest yields on cellobiose hydrolysis (93.4 %). Regarding the glucose tolerance and the pH, Pectinex Ultra SP-L presented the maximum glucose tolerance at pH 3.0, keeping 54 % of its initial activity in the presence of 167 mmol.L^{-1} of glucose, whereas at pH 7.0, Pectinex Smash XXL presented 44 % of activity at 222 mmol.L^{-1} of glucose. Pectinex Smash XXL showed the highest K_i (19.75 mol.L^{-1}), whereas Celluclast® 1.5 L presented the highest K_i/K_M (19). Our results suggest that these commercial preparations are promising sources of β -glucosidases, being Pectinex Smash XXL indicated for applications at neutral pH because of its glucose tolerance and thermal stability at this pH value, whereas Celluclast® 1.5 L, Lallzyme Beta, and Pectinex Ultra SP-L are more recommended for applications at acid pH, such as in fruit juices and wine productions.

Keywords: β -glucosidase; glucose tolerance; kinetic parameters; enzyme activity.

Introduction

β -glucosidases (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) constitute a group of hydrolases ubiquitous in life, including Archaea, Eubacteria, and Eukaryotes, performing a variety of functions in these organisms, such as exogenous glycoside metabolism in animals, release of aromatic compounds in plants, and biomass conversion in microorganisms [1,2]. β -glucosidases are widely studied for many applications in the food, feed, textile, and paper industries [3]. They are applied in several biotechnological processes, including the release of aromatic compounds in fruits and fermentation products [4], flavor enrichment [5], improvement of organoleptic properties of citrus fruit juices [6], thus being among the most used enzymes for juice and beverage industries [7–14]. They can also be used in the formation of some glycosylic bonds [15–17]. Another important application of glucosidases is related to the production of second-generation ethanol from cellulose, coupling a mixed reaction of this enzyme with cellulases and a final fermentation step of the released glucose, in a bioprocess that is an alternative to fuels derived from petroleum [18–20].

The main reaction catalyzed by β -glucosidases is the removing of non-reducing β -D-glucosyl residues from glucoconjugates, including glucosides and 1-O-glycosyl esters [21]. The glucose released by the enzymatic reaction has been described as a strong competitive inhibitor of these enzymes [22–24]. In this type the inhibition, the inhibitor molecule competes by the active site of the enzyme with the substrate, and may involve the formation of an inactive enzyme-inhibitor complex [25]. This product inhibition has a negative impact for the biotechnological application of β -glucosidases, because high enzyme concentrations are necessary to reach acceptable yields [23,26]. Furthermore, in these enzymatic reactions can occur the formation of an enzyme-substrate complex, which is not productive in terms of desirable end-products.

Because some β -glucosidases have more than two possible reaction substrates, glucose can bind in the -1 subsite, blocking the substrate to bind to enzyme at this subsite, thus hampering the reaction. In this case, the substrate could bind in the subsites +1 and +2, leading to the formation of a complex enzyme-glucose-substrate, without product formation [24,26]. However, there are some β -glucosidases that are highly tolerant to glucose inhibition, such as the enzyme from *Candida pelata*, which presents a K_i to glucose of 1,400 mM [27]. Furthermore, for some β -glucosidases from the GH 1 family, the transglycosylation is a phenomenon related to glucose tolerance/stimulation, where these enzymes apparently can exclude water from the active site preferring to use a saccharide as an acceptor [26,28,29].

There are many commercial enzyme preparations showing glucosidase activity, but there is a lack of a proper comparison among the different commercial preparations, including their activities and stabilities under different conditions. One of the main points that can determine the final selection of a specific glucosidase is not only the initial activity of the enzyme but also its tolerance towards glucose, as this is extremely relevant in some applications [4,30]. Reaction conditions such as pH, temperature, and substrate concentration affect the enzyme activity. In the case of β -glucosidases, it could be expected that these reaction conditions, especially the pH, can change the glucose tolerance and the enzyme stability, since the medium pH alters the charges in the enzyme structure, thus the accessibility of substrates and/or inhibitors.

Considering all these aspects, the main objective of this study was to investigate the effects of pH on the hydrolytic activity, the glucose tolerance, the kinetic parameters, and the stability of nine different commercial preparations exhibiting β -glucosidase activity. In this way, we intend to access the different properties of some

of the most used β -glucosidase preparations in the market, with the purpose of facilitating the rapid selection of the best preparation for a specific use, such as in industrial fruit juices production, hydrolysis of cellulose, release of aromas in wine, among others [7,8,20,9–14,18,19].

Material and Methods

Materials

The commercial enzymatic preparations Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Color, Pectinex Smash XXL, Novozym 33095, Pectinex Ultra Clear, and Pectinex BE XXL were kindly donated by Novozymes (Spain); Rohapect 10L was obtained from Amazon group (Brazil) and Lallzyme Beta was provided by Lallemand Wine (France). *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) and cellobiose were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used were of analytical or HPLC grade.

Determination of β -glucosidase activity and protein content

The β -glucosidase activity was quantified using *p*NPG as substrate. The reaction mixture was composed by addition of 100 μ L of *p*NPG (9 mmol.L⁻¹) in 100 μ L of 0.1 mol.L⁻¹ sodium citrate buffer pH 4.8 and 100 μ L of enzyme extract, incubated at 40 °C for 5 min. The reaction was stopped by the addition of 1.2 mL of 0.1 mM Na₂CO₃ pH 12 and the absorbance was measured at 410 nm, with *p*-nitrophenol used as standard in the calibration curve. One enzymatic activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute under the standard assay conditions.

Protein concentration was measured by the Lowry's method [31], using bovine serum albumin (BSA) as the standard. All experiments were performed in triplicates.

Effect of pH on enzymes activities and glucose tolerance

The effect of pH on the enzymatic activities and glucose tolerance of the β -glucosidase preparations was studied by incubating the reaction mixture in pH 3.0, 4.8 (0.1 mol.L⁻¹ sodium citrate buffer), and 7.0 (0.1 mol.L⁻¹ sodium phosphate buffer), and measuring the enzyme activity in the presence of different glucose concentrations (0 to 222 mmol.L⁻¹) using the pNPG method described above. For all preparations, the initial activity was standardized to 2 U.mL⁻¹ according to the protocol described above. The relative activity was defined as the activity of the enzyme at each glucose concentration compared to the activity without glucose.

Determination of kinetic parameters

The kinetic parameters Michaelis constant (K_M) and V_{max} of each commercial enzymatic preparation were determined by the pNPG hydrolysis varying the concentration from 60 to 1,500 μ mol.L⁻¹. The inhibition constant (K_I) was determined for glucose concentrations of 5, 10, and 20 mmol.L⁻¹. The reactions were carried out at pH 4.8 and 40 °C, and the parameters were calculated by non-linear regression using the Solver tool in Microsoft Excel 2016.

Analysis of glucose tolerance on cellobiose hydrolysis

Enzymatic preparations containing 4 mg of protein were incubated in 1 mL of a cellobiose solution (40 g.L⁻¹) at 40 °C and the reaction was conducted measuring the release of glucose until the system reached the equilibrium. Then, the same initial

enzyme concentration was added to the reaction mixture to ensure that reaction end was not due to enzyme inactivation. The reaction was stopped by boiling for 10 min, followed by cooling in an ice bath. The amount of released glucose was measured using a glucose oxidase enzymatic assay kit (GOD-POD, Spinreact, Spain) at 37 °C for 15 min, based on the D-glucose oxidase–peroxidase method [32]. Absorbance was measured at 505 nm.

Effect of pH on thermal stability of the different β -glucosidases

The thermal inactivation of the β -glucosidases preparations was performed using 2 U of enzyme activity, at pH 3.0 (100 mmol.L⁻¹ sodium citrate buffer), pH 4.8 (100 mmol.L⁻¹ sodium citrate buffer), and pH 7.0 (100 mmol.L⁻¹ sodium phosphate buffer) at 60 °C. Periodically, aliquots were taken and the biocatalyst activity was determined using the *p*NPG assay, as described above. The residual activity was calculated in relation to the initial enzyme activity.

Results and Discussion

Enzymatic Activity of Commercial Preparations

Initially, the β -glucosidase activities of the nine commercial enzyme preparations were evaluated using *p*NPG as substrate and the results are shown in Table 1. It should be considered that the specific activity of the extracts may not be related to the specific activity of the different β -glucosidases, as their relative purity may vary and are unknown. Moreover, these preparations are described as pectinase and cellulase activities. The characterization of these activities were the objective of previous studies [33–38]. The highest volumetric and specific activities of β -glucosidases were found for Celluclast® 1.5 L, 70.55 U.mL⁻¹ and 0.69 U.mg⁻¹,

respectively. As stated before, most of the preparations used in our work are described as pectinolytic enzymes. However, all preparations presented β -glucosidase activity. As expected, Celluclast® 1.5L exhibited the highest activity since this preparation is designed for cellulose hydrolysis to liberate glucose. Nevertheless, Pectinex Ultra Color, Pectinex Ultra Clear, and Rohapect 10 L also presented significant β -glucosidase specific activities. Bearing in mind that these preparations are recommended for pectin hydrolysis in fruit juices and in wine production, the secondary activity of β -glucosidase is important in order to release glycosylated aromas and bioactive compounds. Therefore, considering the sugar content of juices and wines, it is also essential that β -glucosidases present in the preparations have a certain glucose tolerance. The characterization of the nine preparations on glucose tolerance and the effects pH on their activities were evaluated in the next sections.

Table 1. Analysis of β -glucosidase activity against pNPG and protein concentration for the commercial enzyme preparations

Enzyme Preparations	β -glucosidase activities (U.mL ⁻¹)	Protein concentrations (mg.mL ⁻¹)	Specific activities (U.mg ⁻¹)
1. Pectinex Ultra SP-L	7.67±0.56	40.43±0.14	0.19
2. Pectinex Ultra Color	18.63±0.03	65.29±1.49	0.28
3. Pectinex Smash XXL	0.20±0.00	9.91±0.48	0.02
4. Novozym 33095	10.55±0.06	94.70±0.66	0.11
5. Pectinex Ultra Clear	23.97±0.88	83.37±2.10	0.29
6. Pectinex BE XXL	4.95±0.12	45.90±1.15	0.11
7. Rohapect 10L	9.96±0.13	44.52±0.89	0.22
8. Celluclast® 1.5 L	70.55±1.06	101.72±2.84	0.69
9. Lallzyme Beta	0.31±0.01	3.10±0.00	0.10

All values are the mean \pm SD of three replicates.

Cellobiose hydrolysis of the commercial preparations

In general, enzyme activity decreases over time. This can be due to inactivation from reaction conditions such as pH or temperature, as well as product inhibition. In the case of β -glucosidases, it is known that these enzymes are inhibited by glucose, because glucose is a competitive inhibitor [25]. In order to evaluate whether the enzymes were inactivated by the reaction conditions or inhibited by glucose, the commercial preparations were incubated in a solution of cellobiose (117 mmol.L⁻¹) to measure the hydrolysis over time. When glucose concentration reached equilibrium, new fresh enzyme was added to the reaction medium. The results are presented in Figure 1. Initially, there was little or no product present, thus the increase in glucose concentration proceeded quickly. However, as the reaction advanced, there was a

significant accumulation of product, and the reaction rate decreased considerably until it came to a halt. It was observed that after the addition of more active enzyme, there was no increase in hydrolysis reaction, for any of the commercial preparations. Therefore, it is possible to say that the β -glucosidase activity was inhibited by the release of glucose from the hydrolysis of cellobiose for all studied preparations, demonstrating the strong competitive inhibition effect of the glucose upon these enzymes.

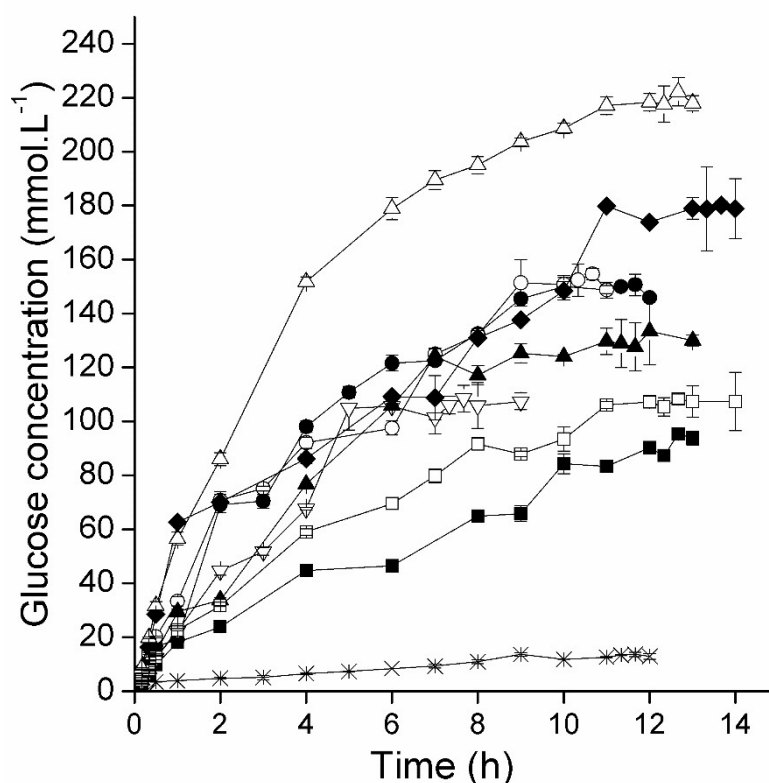


Fig. 1. Analysis of glucose tolerance over time using cellobiose as substrate. (■) Pectinex Ultra SP-L, (●) Pectinex Ultra Color, (×) Pectinex Smash XXL, (▽) Novozym 33095, (○) Pectinex Ultra Clear, (▲) Pectinex BE XXL, (◆) Rohapect 10L, (□) Celluclast® 1.5 L, (△) Lallzyme Beta. The values shown represent means \pm SD from triplicate assays (n=3).

The cellobiose hydrolysis stopped at different ratios of concentrations of glucose and cellobiose, depending on the enzyme preparation. Lallzyme Beta, Rohapect 10L,

Pectinex Ultra Clear, and Pectinex Ultra Color were completely inhibited at around 218 mmol.L⁻¹, 180 mmol.L⁻¹, 151 mmol.L⁻¹, and 149 mmol.L⁻¹ of glucose, respectively (Table 2). The maximal theoretical glucose concentration considering the initial cellobiose concentration is 240 mmol.L⁻¹. Interestingly, in this study, the preparations showing inhibition of hydrolysis at the highest glucose concentrations match enzyme preparations with the highest cellulase activity, as reported by Dal Magro et al. [34]. According to the authors, Pectinex Ultra Clear was the preparation that provided the highest yields of grape juice extraction, whereas Lallzyme Beta showed the highest bioactive compounds concentrations. In addition, these commercial preparations showed good activities of the enzymes of the pectinolytic complex, pectinase (PE), polygalacturonase (PG), and pectin methylesterase (PME) in preparation. The biosynthesis of these enzymes by several fungi species are also stimulated or repressed by glucose [39,40]. Since the synergistic enzyme system comprising the core cellulolytic enzyme supplemented by hemicellulases and pectinases is the basis for efficient hydrolysis of lignocelluloses, the study of these synergistic interactions becomes very important for the application of these enzyme preparations on complex raw materials such as fruits, fermentable wort, and biomass residues [41].

Table 2. Glucose concentration and cellobiose hydrolysis yields

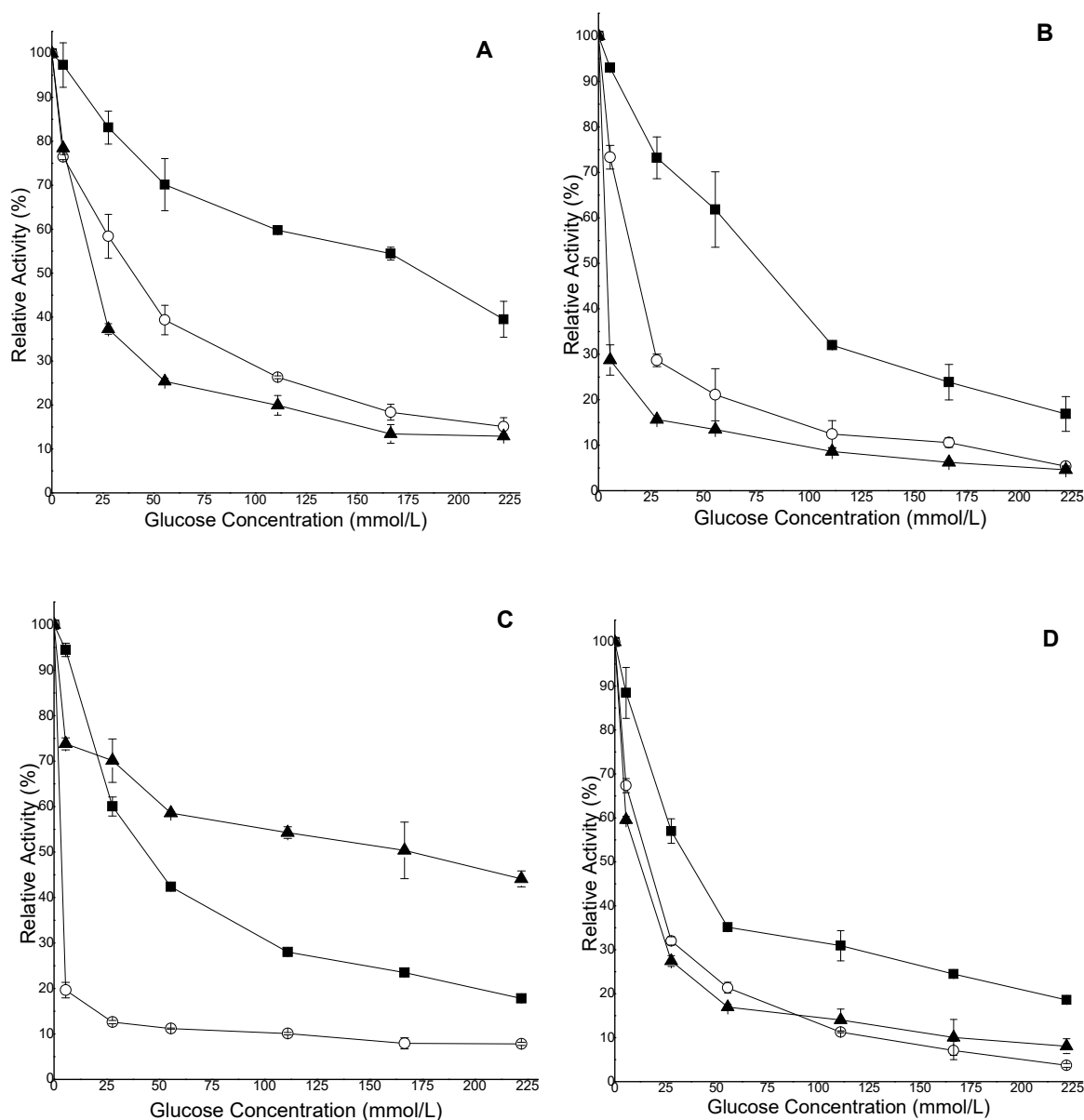
Enzyme Preparations	Glucose	
	Concentrations (mmol.L ⁻¹)	Yields (%)
1. Pectinex Ultra SP-L	90.21	38.6
2. Pectinex Ultra Color	148.87	63.7
3. Pectinex Smash XXL	13.65	5.8
4. Novozym 33095	105.66	45.2
5. Pectinex Ultra Clear	151.33	64.6
6. Pectinex BE XXL	129.67	55.48
7. Rohapect 10L	179.81	76.9
8. Celluclast® 1.5 L	107.29	45.9
9. Lallzyme Beta	218.29	93.4

Among all the enzymatic preparations studied, Pectinex Smash XXL was inhibited at the lowest glucose concentrations and produced the lowest hydrolysis yields (13.65 mmol.L⁻¹ and 5.8 %, Table 2). This behavior is corroborated by the low specific activity obtained for this commercial preparation, 5 times lower than that obtained for Lallzyme Beta, Pectinex BE XXL, and Novozym 33095 (Table 1).

Effect of pH on glucose tolerance from commercial preparations

In order to verify the effect of pH on glucose tolerance of the enzymatic preparations, β -glucosidase activity was measured at three different pH values (3.0, 4.8, and 7.0) in the presence of varying glucose concentrations, using *p*NPG as substrate. As can be observed in Figure 2, Pectinex Ultra SP-L presented about 54 % of its activity in the presence of 167 mmol.L⁻¹ of glucose at pH 3.0, whereas the preparations Pectinex Ultra Color, Pectinex Smash XXL, Novozym 33095, Pectinex

Ultra Clear, and Celluclast® 1.5 L kept between 24 % and 28 % of their activities under those conditions. High glucose tolerance at low pH values is a very important feature for technological applications of β -glucosidases in wine-making [42] and grape juice [33], because these beverages have natural acidic pH values. Consequently, enzymes with high activity and low glucose inhibition at this pH value are very promising and present considerable economic interest [4,43,44].



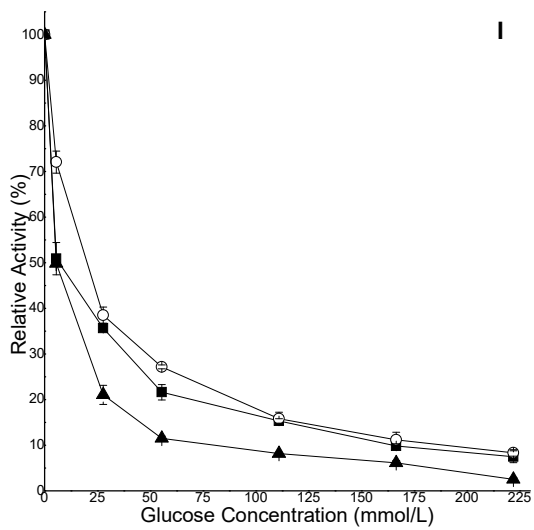
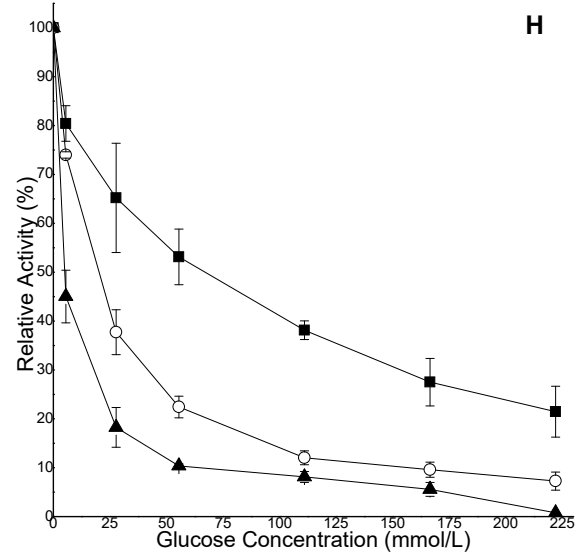
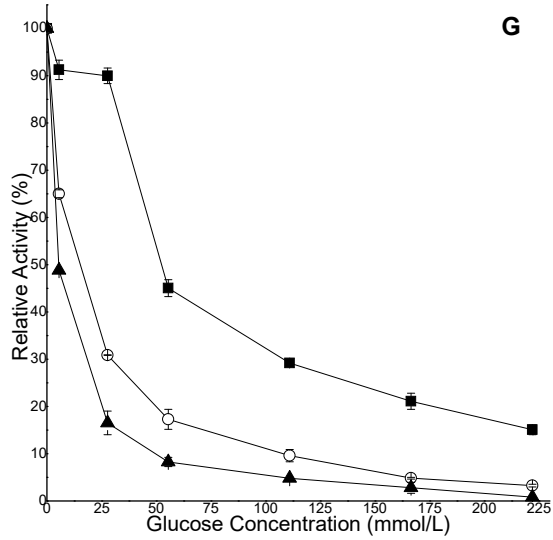
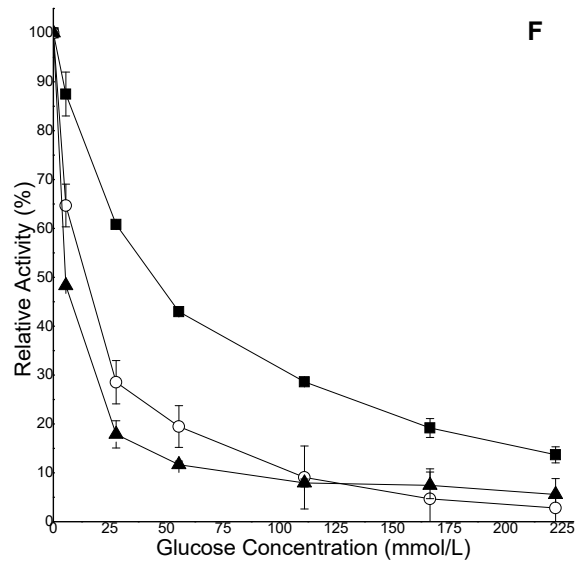
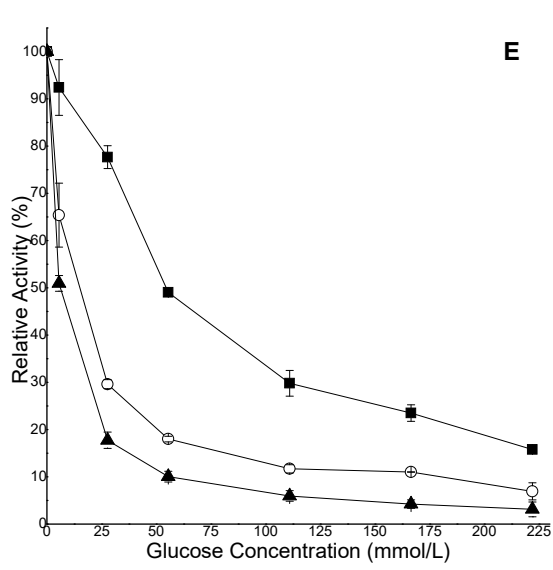


Fig 2. Effect of pH on the glucose tolerance of enzymes. (A) Pectinex Ultra SP-L, (B) Pectinex Ultra Color, (C) Pectinex Smash XXL, (D) Novozym 33095, (E) Pectinex Ultra Clear, (F) Pectinex BE XXL, (G) Rohapect 10L, (H) Celluclast® 1.5 L, (I) Lallzyme Beta. (■) pH 3.0; (○) pH 4.8; (▲) pH 7.0. Residual activities were assayed at 40 °C. The values shown represent means \pm SD from triplicate assays (n=3) carried out with three separate preparations of β -glucosidases.

On the other hand, Lallzyme Beta showed no significant differences between pH 3.0 and 4.8, with a slight decrease of its activity at pH 7.0. A different behavior was observed for Pectinex Smash XXL. This preparation kept 44 % of its activity at 222 mmol.L⁻¹ of glucose at pH 7.0. A high glucose tolerance towards its products in neutral reaction medium is also a very significant feature in biotechnological applications in pharmacology, cosmetic industries, and conversion and synthesis of biomolecules of high added value [22,45].

The results obtained in this work show that each enzyme preparation presents a quite different glucose tolerance depending on the pH. According to Giuseppe et al. [46], the comparative analysis of active sites of β -glucosidases showing high, moderate, or low glucose tolerances, indicated that beyond the shape and the +2 subsite, the electrostatic properties of the deep active site entrance also determine the degree of tolerance of it towards glucose. While β -glucosidase from *Trichoderma reesei*, which presents low glucose tolerance, has the active site surrounded by negatively charged residues, the *Neotermes koshunensis* β -glucosidase, a high glucose-tolerance enzyme, presents a more neutral entrance [46–48]. Therefore, changes in the medium pH value, for example reducing the pH, can favor the protonation of anionic groups of the protein, making its surface less prone to glucose inhibition. Thus, the structural characteristics and charges of each enzyme preparation should influence its tolerance towards glucose. Nevertheless, more detailed studies

should be considered to better understand the relationship between pH and glucose tolerance.

Kinetic parameters

The kinetic parameters V_{max} , K_M , and K_I for the hydrolysis of pNPG of the nine commercial preparations are presented in Table 3 and Michalis-Menten plots in Figure S1 (Supplementary Material). The lowest Michaelis constant (K_M) values were obtained for Celluclast® 1.5 L (0.42 mmol.L⁻¹), followed by Pectinex Ultra SP-L (0.62 mmol.L⁻¹) and Novozym 33095 (0.68 mmol.L⁻¹). These enzyme preparations presented K_M values lower than that of other described β -glucosidases, such as the enzymes from *Stereum hirsutum* (2.5 mmol.L⁻¹) [49], and *Penicillium purpurogenum* KJS506 (5.1 mmol.L⁻¹) [50], that were isolated from the soil, and also other commercial preparations from almonds (43.2 mmol.L⁻¹) [51], or *A. niger* (3.5 mmol.L⁻¹) [52] from Sigma.

Table 3. Kinetic parameters of the enzyme preparations against pNPG at pH 4.8 and 40 °C.

Enzyme Preparation	K_M (mmol.L ⁻¹)	V_{max} (U.mg ⁻¹)	K_I (mmol.L ⁻¹)	K_I/K_M
1. Pectinex Ultra SP-L	0.62	0.29	5.78	9.32
2. Pectinex Ultra Color	1.40	0.39	1.55	1.11
3. Pectinex Smash XXL	2.64	0.06	19.75	7.48
4. Novozym 33095	0.68	0.12	2.06	3.03
5. Pectinex Ultra Clear	0.94	0.24	2.71	2.88
6. Pectinex BE XXL	1.61	0.23	4.64	2.88
7. Rohapect 10L	0.99	0.33	3.26	3.29
8. Celluclast® 1.5 L	0.42	0.24	8.01	19.07
9. Lallzyme Beta	1.46	0.79	6.95	4.76

Interestingly, the lower K_M values were obtained for the preparations Celluclast® 1.5 L, Pectinex Ultra SP-L, and Novozym 33095, which are produced from *T. reesei*, *A. aculeatus*, and from a co-culture of the *A. aculeatus* and *A. niger*, respectively. On the other hand, the highest values of K_M were obtained for preparations Pectinex Smash XXL, Pectinex BE XXL, and Lallzyme Beta, all from *A. niger*. The crystal structures of β -glucosidase from *T. reesei* and *A. aculeatus* show that the widest active-site entrance eases the substrate access to the catalytic site [48,53]. However, there are few studies reporting the structure of β -glucosidase from *A. niger* [54].

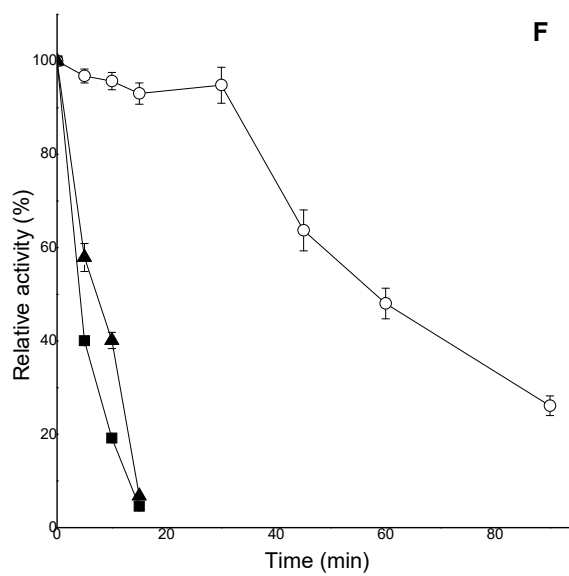
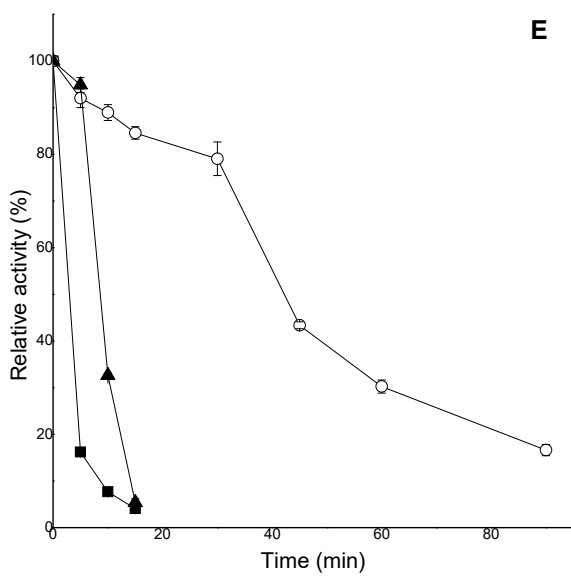
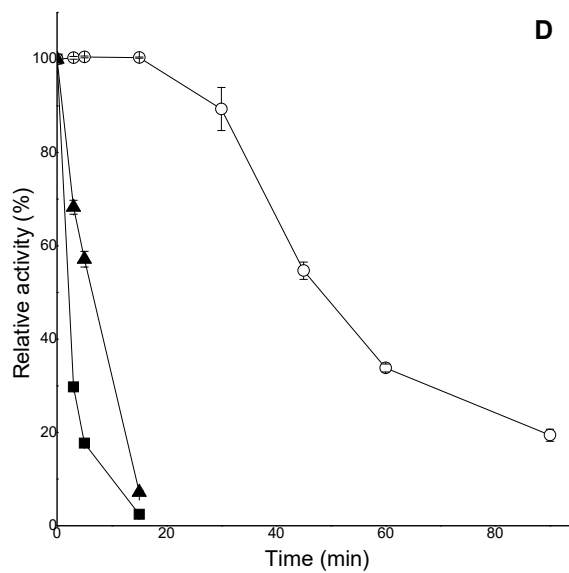
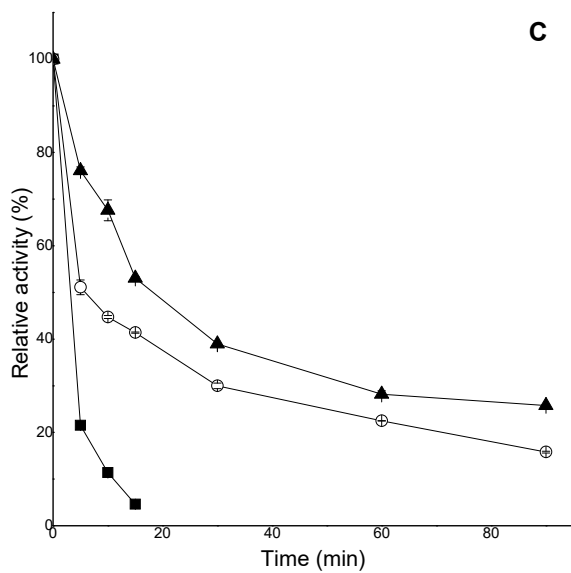
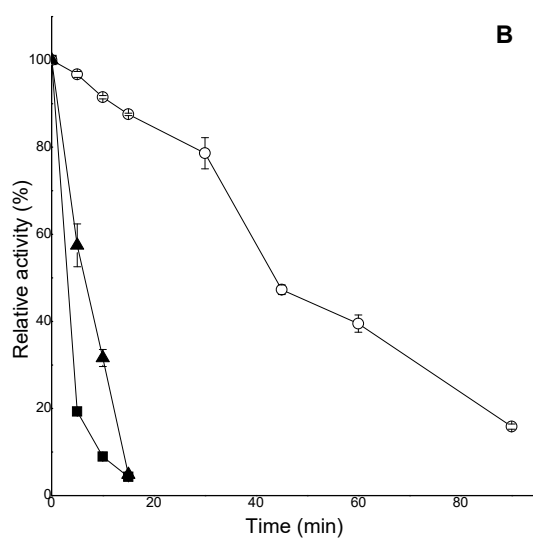
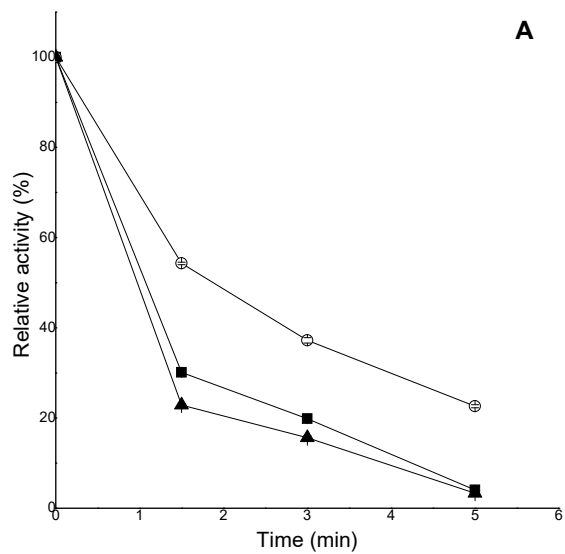
Structural differences of each of these enzymes, specially the channel that leads to subsite -1/+1, and net charge of the amino acids in this channel, are important features to how easy or difficult is the access of the substrate to their active sites.

The effect of glucose concentration on the activity of β -glucosidase is also shown in Table 3, by the inhibition constant (K_i) using *p*NPG as substrate. Pectinex Smash XXL presented the highest glucose K_i among the tested enzymes in this study (19.75 mmol.L⁻¹), followed by Celluclast® 1.5 L (8.01 mmol.L⁻¹), Lallzyme Beta (6.95 mmol.L⁻¹), and Pectinex Ultra SP-L (5.78 mmol.L⁻¹). According to Riou et al. [55] and Murray et al. [56] competitive inhibition by glucose is a common property of the most fungal β -glucosidases, with K_i ranging from 0.3 to 100 mmol.L⁻¹. In addition, the best ratio between K_i and K_M (19) was obtained for Celluclast® 1.5 L because the glucosidase from this enzymatic preparation is characterized by a high K_i value and low K_M value. The high affinity for *p*NPG of the Pectinex Ultra SP-L glucosidase, and the high inhibition constant for glucose of the enzyme in Pectinex Smash XXL also caused high K_i/K_M ratios for these enzymatic preparations, of 9.3 and 7.48, respectively (Table 3). Interestingly, some β -glucosidases with high K_i (Pectinex Smash XXL, Pectinex Ultra SP-L, and Celluclast® 1.5 L) were also the commercial preparations

that showed the lowest yields for the cellobiose hydrolysis. Teugjas and Väljamäe [57], studying cellobiose hydrolysis and glucose inhibition of β -glucosidases from *Acremonium thermophilum* and *Thermoascus aurantiacus*, demonstrated a relationship between the strength of glucose inhibition and the affinity for cellobiose. The authors showed that an increased tolerance to glucose inhibition was accompanied by a decrease in catalytic efficiency versus cellobiose.

Thermal stability of the different β -glucosidases preparations

The thermal stabilities of the different β -glucosidase preparations were studied at 60 °C under three different values of pH: pH 3.0, 4.8 (100 mmol.L⁻¹ citrate buffer), and pH 7.0 (100 mmol.L⁻¹ phosphate buffer), results being depicted in Figure 3. The biocatalysts were more resistant to deactivation by temperature when the incubation was performed at their optimum reaction pH (4.8). The highest stability was obtained for glucosidase from Celluclast® 1.5 L, retaining more than 50 % of its activity after incubation for 3 h at pH 4.8 and 60 °C, whereas under the other pH tested, the enzyme was completely inactivated in less than 15 min. The glucosidases of Lallzyme Beta and Pectinex BE XXL retained about 56 % and 48 % of their initial activities after 1 h under the same conditions. On the other hand, the β -glucosidase of Pectinex Smash XXL presented a different behavior, being more stable at pH 7.0. This biocatalyst kept about 30 % of its activity after 1 h of incubation at pH 7 and 60 °C. As stated before, the pH has an important role for enzyme stability. It will affect the application of each specific enzyme and allow obtaining the maximum productivity in each case.



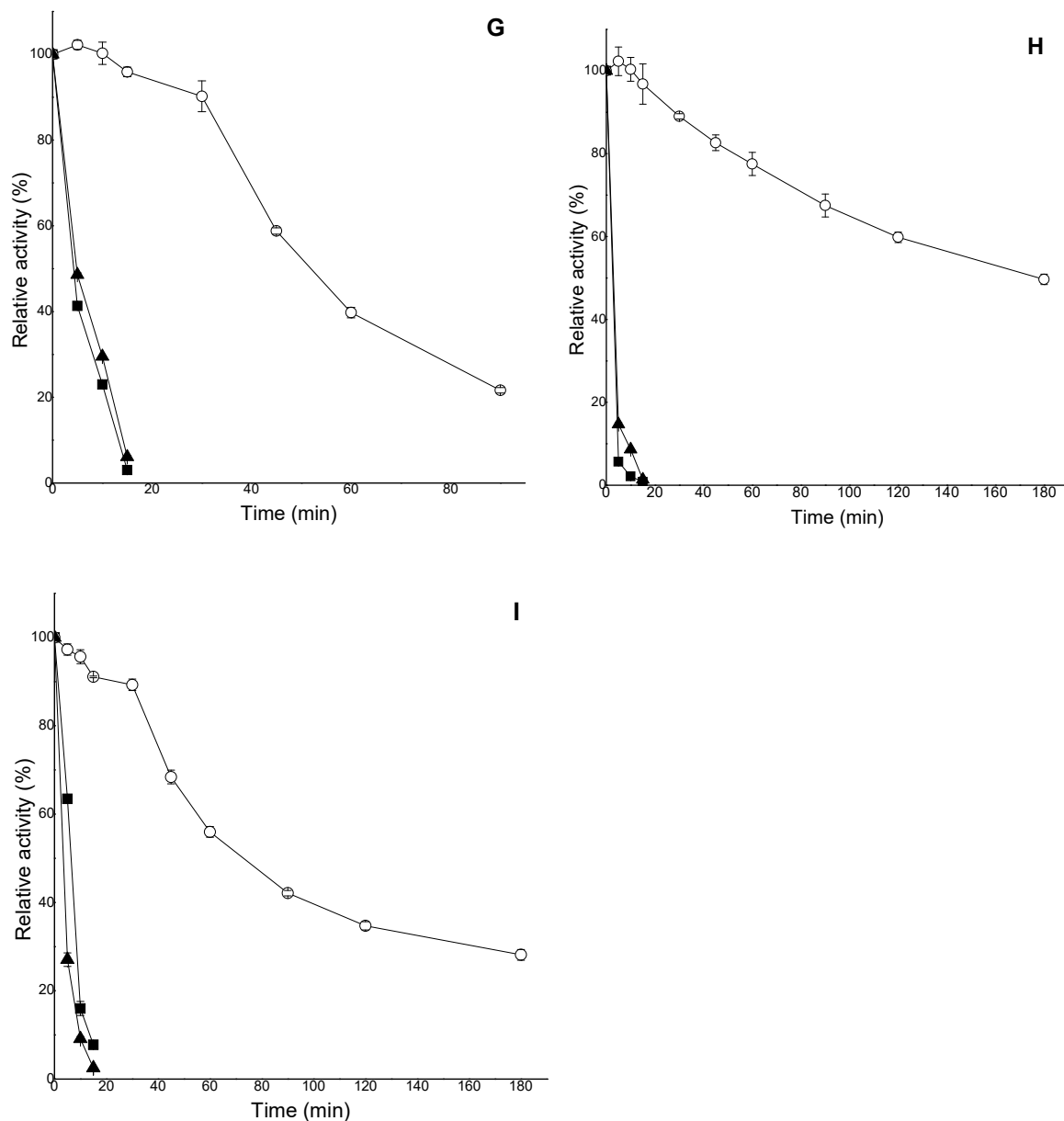


Fig 3. Effects of pH on the thermal inactivation of different glucosidase preparations. (A) Pectinex Ultra SP-L, (B) Pectinex Ultra Color, (C) Pectinex Smash XXL, (D) Novozym 33095, (E) Pectinex Ultra Clear, (F) Pectinex BE XXL, (G) Rohapect 10L, (H) Celluclast® 1.5 L, (I) Lallzyme Beta. (■) pH 3.0; (○) pH 4.8; (▲) pH 7.0. Residual activities were assayed at 60 °C. The values shown represent means \pm SD of triplicate assays (n=3) carried out with three separate preparations of β -glucosidase.

Conclusions

Cellulose hydrolysis reaction carried out with nine commercial preparations containing β -glucosidases showed that the inhibition of enzyme activity occurs mainly

due to the presence of glucose in the reaction medium, but without influence on enzyme inactivation based on reaction pH or temperature. Additionally, it was possible to observe that the pH value affects the glucose inhibition of the β -glucosidase activity and, depending on the structural characteristics of the enzyme, its glucose tolerance will be higher at more acidic or neutral pH. β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L showed the highest glucose tolerance at low pH 3.0, suggesting its promising use in the wine and juice industries. Celluclast® 1.5 L has also shown a good tolerance to glucose at pH 3.0, as well as low K_M value. The β -glucosidase from Pectinex Smash XXL kept 50 % of its activity, at glucose concentrations as high as 200 mmol.L⁻¹ at pH 7.0, suggesting its use in biotechnological applications at this pH, such as in the pharmaceutical and cosmetic industries. Furthermore, the β -glucosidase of Pectinex Smash XXL presented the highest K_I for glucose using *p*NPG as substrate. Overall, the commercial preparations studied can be alternative sources of β -glucosidase activity presenting different concentrations of the enzyme and glucose tolerance. The modification of the reaction medium pH considerably affected the inhibition of the enzymatic activity, and its thermostability, depending on the structural characteristics of the enzyme and its particularities. These results contribute to a more economical and efficient choice of the best commercial preparation for specific applications, for example, in juice and wine processing where, in the first case, because of sugar content, a β -glucosidase with glucose tolerance is desired. Moreover, we believe that these characteristics can be further enhanced by immobilizing these important enzymes, as immobilization is a powerful tool to modulate enzyme stability, activity, and resistance to inhibitors.

Acknowledgments

This work was supported by scholarships (D. Andrades from CNPq; N. Graebin, from CAPES), and grants from CNPq (process 403505/2013-5) and FAPERGS (process 17/2551-0000939-8) from Brazil and from the MINECO from Spanish Government, (project number CTQ2017-86170-R). The authors wish to thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain), and LNF for kindly supplying the enzymes used in this research.

References

- [1] Y. Bhatia, S. Mishra, V.S. Bisaria, Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 22 (2002) 375–407. doi:10.1080/07388550290789568.
- [2] J.R. Ketudat Cairns, A. Esen, β -Glucosidases, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 3389–3405. doi:10.1007/s00018-010-0399-2.
- [3] W. Hashimoto, H. Miki, H. Nankai, N. Sato, S. Kawai, K. Murata, Molecular Cloning of Two Genes for β -d-Glucosidase in *Bacillus sp.* GL1 and Identification of One as a Gellan-Degrading Enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 360 (1998) 1–9. doi:10.1006/abbi.1998.0929.
- [4] R.R. Singhanian, A.K. Patel, R.K. Sukumaran, C. Larroche, A. Pandey, Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production, *Bioresour. Technol.* 127 (2013) 500–507. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012.
- [5] K. Chen, Y. Lo, C. Liu, R. Yu, C. Chou, K. Cheng, Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for

- β -glucosidase, Food Chem. 139 (2013) 79–85. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.093.
- [6] A. Belancic, Z. Gunata, M.-J. Vallier, E. Agosin, β -Glucosidase from the Grape Native Yeast *Debaryomyces vanriijiae*: Purification, Characterization, and Its Effect on Monoterpene Content of a Muscat Grape Juice, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1453–1459. doi:10.1021/jf025777l.
- [7] R. Agrawal, A.K. Verma, A. Satlewal, Application of nanoparticle-immobilized thermostable β -glucosidase for improving the sugarcane juice properties, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 33 (2016) 472–482. doi:10.1016/j.ifset.2015.11.024.
- [8] A. Todaro, R. Palmeri, R.N. Barbagallo, P.G. Pifferi, G. Spagna, Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using β -Glucosidase from various sources, Food Chem. 107 (2008) 1570–1575. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.075.
- [9] R. Palmeri, G. Spagna, β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application, Enzyme Microb. Technol. 40 (2007) 382–389. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.007.
- [10] R.N. Barbagallo, G. Spagna, R. Palmeri, C. Restuccia, P. Giudici, Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications, Enzyme Microb. Technol. 35 (2004) 58–66. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.005.
- [11] Z. Gunata, S. Bitteur, J.-M. Brillouet, C. Bayonove, R. Cordonnier, Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape, Carbohydr. Res. 184 (1988) 139–149. doi:https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80012-0.

- [12] P. Winterhalter, Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 452–455. doi:10.1021/jf00092a026.
- [13] W. Schwab, P. Schreier, Glycosidic conjugates of aliphatic alcohols from apple fruit (*Malus sylvestris* Mill cult. Jonathan), *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 757–763. doi:10.1021/jf00093a037.
- [14] G. Krammer, P. Winterhalter, M. Schwab, P. Schreier, Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *syriaca*), *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 778–781. doi:10.1021/jf00004a032.
- [15] J. Yang, R. Gao, Y. Zhou, S. Anankanbil, J. Li, G. Xie, Z. Guo, β -Glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10 for exclusive synthesis of galactotrisaccharides: Kinetics and thermodynamics insight into reaction mechanism, *Food Chem.* 240 (2018) 422–429. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.155.
- [16] M. Ma, M. Okuyama, M. Sato, T. Tagami, P. Klahan, Y. Kumagai, H. Mori, A. Kimura, Effects of mutation of Asn694 in *Aspergillus niger* α -glucosidase on hydrolysis and transglucosylation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 6399–6408. doi:10.1007/s00253-017-8402-6.
- [17] Y. Kang, B. Wei, D. Guo, S. Zheng, Production of Alkyl Polyglucoside Using *Pichia pastoris* GS115 Displaying *Aspergillus aculeatus* β -Glucosidase I, in: *Lect. Notes Electr. Eng.*, 2015: pp. 417–426. doi:10.1007/978-3-662-45657-6_44.
- [18] J. Berlowska, W. Cieciora, S. Borowski, M. Dudkiewicz, M. Binczarski, I. Witonska, A. Otlewska, D. Kregiel, Simultaneous Saccharification and

- Fermentation of Sugar Beet Pulp with Mixed Bacterial Cultures for Lactic Acid and Propylene Glycol Production, *Molecules*. 21 (2016) 1380. doi:10.3390/molecules21101380.
- [19] M. Rastogi, S. Shrivastava, Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 80 (2017) 330–340. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>.
- [20] G. Singh, A.K. Verma, V. Kumar, Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases, *3 Biotech.* 6 (2016) 3. doi:10.1007/s13205-015-0328-z.
- [21] J.R. Ketudat Cairns, B. Mahong, S. Baiya, J.-S. Jeon, β -Glucosidases: Multitasking, moonlighting or simply misunderstood?, *Plant Sci.* 241 (2015) 246–259. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.014>.
- [22] A. Sørensen, M. Lübeck, P.S. Lübeck, B.K. Ahring, Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials, *Biomolecules*. 3 (2013) 612–631. doi:10.3390/biom3030612.
- [23] F.H.M. Souza, L.P. Meleiro, C.B. Machado, A.L.R.L. Zimbardi, R.F. Maldonado, T.A.C.B. Souza, D.C. Masui, M.T. Murakami, J.A. Jorge, R.J. Ward, R.P.M. Furriel, Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens* RP86, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 106 (2014) 1–10. doi:10.1016/j.molcatb.2014.04.007.
- [24] S. Kuusk, P. Väljamäe, When substrate inhibits and inhibitor activates: implications of β -glucosidases, *Biotechnol. Biofuels.* 10 (2017) 7. doi:10.1186/s13068-016-0690-z.

- [25] M. Chauve, H. Mathis, D. Huc, D. Casanave, F. Monot, N. Ferreira, Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases, *Biotechnol. Biofuels.* 3 (2010) 3. doi:10.1186/1754-6834-3-3.
- [26] J.C.S. Salgado, L.P. Meleiro, S. Carli, R.J. Ward, Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases – A review, *Bioresour. Technol.* 267 (2018) 704–713. doi:10.1016/j.biortech.2018.07.137.
- [27] B.C. Saha, R.J. Bothast, Production, purification, and characterization of a highly glucose- tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3165–3170.
- [28] T. Matsuzawa, K. Yaoi, Screening, identification, and characterization of a novel saccharide-stimulated β -glycosidase from a soil metagenomic library, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 633–646. doi:10.1007/s00253-016-7803-2.
- [29] L.P. Meleiro, J.C.S. Salgado, R.F. Maldonado, S. Carli, L.A.B. Moraes, R.J. Ward, J.A. Jorge, R.P.M. Furriel, Engineering the GH1 β -glucosidase from *Humicola insolens*: Insights on the stimulation of activity by glucose and xylose, *PLoS One.* 12 (2017) e0188254. doi:10.1371/journal.pone.0188254.
- [30] S. Chamoli, P. Kumar, N.K. Navani, A.K. Verma, Secretory expression, characterization and docking study of glucose-tolerant β -glucosidase from *B. subtilis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 85 (2016) 425–433. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.001.
- [31] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [32] M.R. Javed, A. Buthe, M.H. Rashid, P. Wang, Cost-efficient entrapment of β -glucosidase in nanoscale latex and silicone polymeric thin films for use as stable

- biocatalysts, Food Chem. 190 (2016) 1078–1085.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.040>.
- [33] L. Dal Magro, D. Goetze, C.T. Ribeiro, N. Paludo, E. Rodrigues, P.F. Hertz, M.P. Klein, R.C. Rodrigues, Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters, Food Bioprocess Technol. 9 (2016) 365–377.
doi:10.1007/s11947-015-1634-5.
- [34] L. Dal Magro, L.M.G. Dalagnol, V. Manfroi, P.F. Hertz, M.P. Klein, R.C. Rodrigues, Synergistic effects of Pectinex Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice, LWT - Food Sci. Technol. 72 (2016) 157–165. doi:10.1016/j.lwt.2016.04.046.
- [35] L. Dal Magro, P.F. Hertz, R. Fernandez-Lafuente, M.P. Klein, R.C. Rodrigues, Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification, RSC Adv. 6 (2016) 27242–27251. doi:10.1039/C6RA03940E.
- [36] L. Dal Magro, V.C.C. Silveira, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuto, S. Nicolodi, P.F. Hertz, M.P. Klein, R.C. Rodrigues, Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: Synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification, Int. J. Biol. Macromol. 115 (2018) 35–44.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.028.
- [37] L.M.G. Dalagnol, L. Dal Magro, V.C.C. Silveira, E. Rodrigues, V. Manfroi, R.C. Rodrigues, Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: A new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds, Food Bioprod. Process. 105 (2017) 197–204.
doi:10.1016/j.fbp.2017.07.009.

- [38] L.M.G. Dalagnol, V.C.C. Silveira, H.B. da Silva, V. Manfroi, R.C. Rodrigues, Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters, *Process Biochem.* 61 (2017) 80–87. doi:10.1016/j.procbio.2017.06.029.
- [39] L. Olsson, T.M.I.E. Christensen, K.P. Hansen, E.A. Palmqvist, Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 612–619. doi:10.1016/S0141-0229(03)00181-9.
- [40] R.C. Fontana, M.M. Silveira, Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium, *Brazilian J. Chem. Eng.* 29 (2012) 683–690. doi:10.1590/S0104-66322012000400001.
- [41] T. Laothanachareon, B. Bunterngsook, S. Suwannarangsee, L. Eurwilaichitr, V. Champreda, *Bioresource Technology* Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 682–690. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.053.
- [42] M.J. Ferner, G. Müller, C. Schumann, P. Kampeis, R. Ulber, H. Raddatz, Immobilisation of glycosidases from commercial preparation on magnetic beads. Part 1. Characterisation of immobilised glycosidases with a particular emphasis on β -glucosidase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 123 (2016) 23–28. doi:10.1016/j.molcatb.2015.11.005.
- [43] P. González-Pombo, L. Fariña, F. Carrau, F. Batista-Viera, B.M. Brena, A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization

- and application for aroma enhancement of white Muscat wine, *Process Biochem.* 46 (2011) 385–389. doi:10.1016/j.procbio.2010.07.016.
- [44] L. Chen, N. Li, M.H. Zong, A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization, *Process Biochem.* 47 (2012) 127–132. doi:10.1016/j.procbio.2011.10.023.
- [45] Z. Gao, D. Van Hop, L.T.H. Yen, K. Ando, S. Hiyamuta, R. Kondo, The production of β -glucosidases by *Fusarium proliferatum* NBRC109045 isolated from Vietnamese forest, *AMB Express.* 2 (2012) 49. doi:10.1186/2191-0855-2-49.
- [46] P.O. de Giuseppe, T. de A.C.B. Souza, F.H.M. Souza, L.M. Zanphorlin, C.B. Machado, R.J. Ward, J.A. Jorge, R. dos P.M. Furriel, M.T. Murakami, Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 70 (2014) 1631–1639. doi:10.1107/S1399004714006920.
- [47] H.-L. Lee, C.-K. Chang, W.-Y. Jeng, A.H.-J. Wang, P.-H. Liang, Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability, *Protein Eng. Des. Sel.* 25 (2012) 733–740. doi:10.1093/protein/gzs073.
- [48] W.-Y. Jeng, N.-C. Wang, M.-H. Lin, C.-T. Lin, Y.-C. Liaw, W.-J. Chang, C.-I. Liu, P.-H. Liang, A.H.-J. Wang, Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*, *J. Struct. Biol.* 173 (2011) 46–56. doi:10.1016/j.jsb.2010.07.008.
- [49] L.J. Nguyen NPT, Lee KM, Lee KM, Kim IW, Kim YS, Jeya M, One-step purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum.*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 87 (2010) 2107–2116.

- [50] J.-K. Jeya, Marimuthu; Joo, Ah-Reum; Lee, Kyoung-Mi; Tiwari, Manish Kumar; Lee, Kyoung-Min; Kim, Sang-Hwan; Lee, Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 1473–1484.
- [51] J. Zhang, D. Wang, J. Pan, J. Wang, H. Zhao, Q. Li, X. Zhou, Efficient resveratrol production by immobilized β -glucosidase on cross-linked chitosan microsphere modified by L-lysine, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 104 (2014) 29–34. doi:10.1016/j.molcatb.2014.03.003.
- [52] 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. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047.
- [53] K. Suzuki, J.-I. Sumitani, Y.-W. Nam, T. Nishimaki, S. Tani, T. Wakagi, T. Kawaguchi, S. Fushinobu, Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*, *Biochem. J.* 452 (2013) 211–221. doi:10.1042/BJ20130054.
- [54] P. Thongpoo, L.S. McKee, A.C. Araújo, P.T. Kongsaree, H. Brumer, Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 2739–2749. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.014.
- [55] C. Riou, J.-M. Salmon, M.-J. Vallier, Z. Günata, P. Barre, Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3607–3614.

- [56] P. Murray, N. Aro, C. Collins, A. Grassick, M. Penttilä, M. Saloheimo, M. Tuohy, Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*, Protein Expr. Purif. 38 (2004) 248–257. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.08.006>.
- [57] H. Teugjas, P. Väljamäe, Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification, Biotechnol Biofuels. 6 (2013). doi:10.1186/1754-6834-6-105.

Supplementary Material

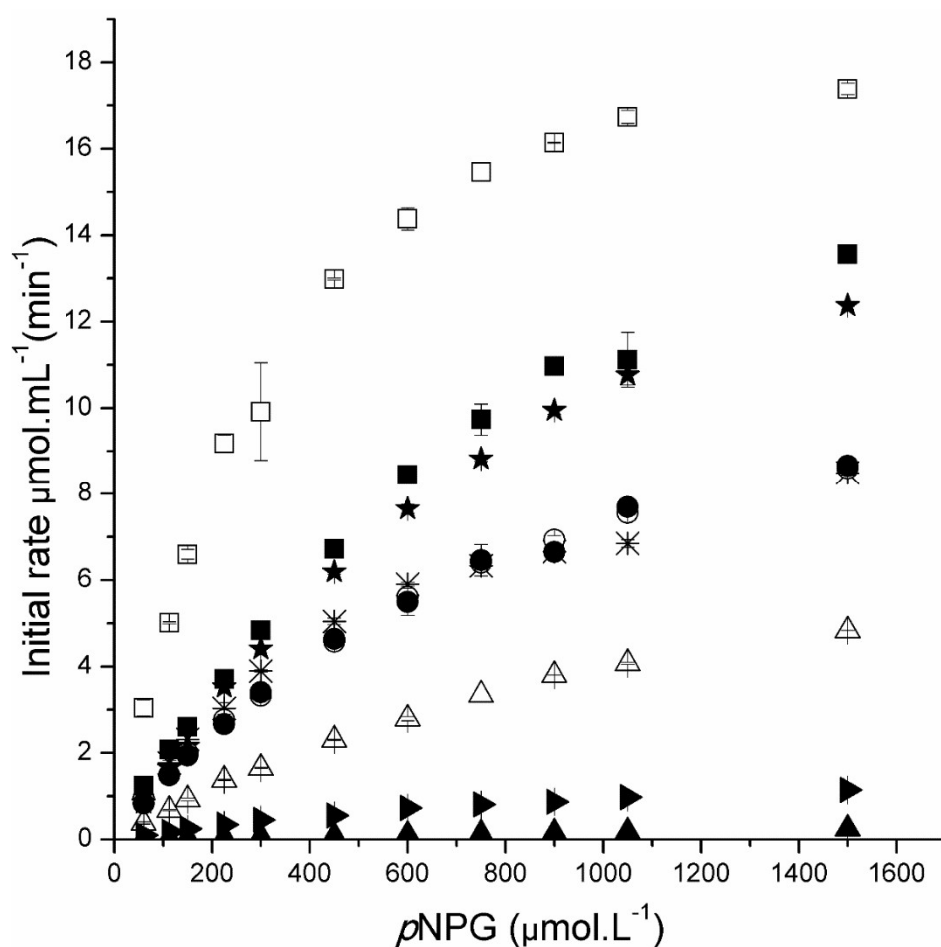


Figure S1. Comparative Michaelis-Menten plots of β -glucosidases from commercial preparations. (*) Pectinex Ultra SP-L; (★) Pectinex Ultra Color; (▲) Pectinex Smash XXL; (○) Novozym 33095; (■) Pectinex Ultra Clear; (△) Pectinex BE XXL; (●) Rohapect 10L; (□) Celluclast® 1.5; and (▶) Lallzyme Beta. The values shown represent means \pm SD from triplicate assays (n=3).

5.2. Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: optimal protocol depends on the enzyme

Com base nos resultados do trabalho anterior, dois preparados comerciais com atividade de β -glucosidase (Pectinex Ultra SP-L e Pectinex Ultra Clear) e de um isolado de *A. niger* URM 6642 foram selecionados para os estudos subsequentes. As enzimas foram parcialmente purificadas, e posteriormente, imobilizadas usando diferentes estratégias: adsorção iônica em grânulos aminados (MANAE)-agarose, por modificação de biocatalisadores com glutaraldeído ou em suportes pré-ativados de glutaraldeído. As imobilizações também foram realizadas em pH 5, 7 e 9 para analisar a influência das possíveis diferentes orientações das moléculas da enzima na superfície do suporte. As estabilidades térmicas, a tolerância à inibição da glicose e a estabilidade operacional dos diferentes biocatalisadores imobilizados também foram testados. Os resultados estão apresentados no manuscrito a seguir, publicado no periódico *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 129, p. 672-678, 2019 (DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057).

Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: optimal protocol depends on the enzyme

Diandra de Andrades,¹ Natália G. Graebin,¹ Marina Kimiko Kadowaki² Marco A. Z. Ayub,¹ Roberto Fernandez-Lafuente,³ Rafael C. Rodrigues^{1,*}

¹Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Center of Medical Sciences and Pharmaceutical, Western Paraná State University, Rua Universitária 2069, ZC 85819-110, Cascavel, PR, Brazil.

³Department of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, ZC 28049, Madrid, Spain

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7793

E-mail address: rafaelcrodrigues@ufrgs.br (R. C. Rodrigues)

Website: www.ufrgs.br/bbb

Abstract

Three β -glucosidases (Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Clear and homemade preparation from *Aspergillus niger*) were immobilized using different strategies: ionic adsorption on aminated (MANAE)-agarose beads at pH 5, 7, and 9, followed by biocatalysts modification with glutaraldehyde, or on glutaraldehyde pre-activated supports. The pH of the immobilization was altered to allow different enzyme molecule orientations on the support surface. The biocatalysts from Pectinex Ultra SP-L showed the highest thermal and operational stabilities when immobilized on MANAE-agarose-glutaraldehyde at pH 7. The β -glucosidase from Pectinex Ultra Clear and from *A. niger* produced best results when immobilized on MANAE-agarose beads at pH 5 and 7, respectively, which was later treated with glutaraldehyde. The best immobilization results using pre-activated supports were observed for the enzyme present in Pectinex Ultra SP-L, to which the highest thermal stabilities were obtained. Remarkably, the enzyme from *A. niger*, immobilized on MANAE-agarose at pH 9 and subsequently treated with glutaraldehyde, produced the highest stabilization (approximately 560 times more stable than soluble enzyme at 60 °C). Results showed that optimal protocol for β -glucosidases immobilizations using the glutaraldehyde chemistry must be individually tested and tailored to each type of enzyme.

Keywords: MANAE-agarose; Glutaraldehyde; Enzyme stabilization; Ionic adsorption; Covalent attachment.

1. Introduction

Enzymes are biocatalysts widely used in different industrial processes because of their high activity, selectivity, and specificity compared to chemical catalysts [1,2]. Enzymes are able to produce complex compounds under very mild reaction conditions, allowing to develop more sustainable processes [1,2]. Because of the biological origins of enzymes, they generally have operational characteristics that differ from those required for an industrial process [3,4]. One of the most useful strategies to successfully use enzymes in biotechnological processes is their immobilization [5–7]. A proper enzyme immobilization is a powerful tool to improve enzymatic properties, such as resistance to drastic reaction conditions (e.g., pH and temperature far from their physiological range), enhanced enzyme activity, multiple reusability or continuous use, and improvement of substrate specificity and enantiospecificity, or product selectivity [8,9].

The immobilization methods are based on the distinctive characteristics of functional groups of the amino acid side chains of the enzymes, which interact to (or react with) the support in several ways. The enzymes can be attached on the support surface by adsorption via reversible bonds, like van der Waals forces, hydrophobic, or ionic linkages, or by irreversible chemical bonds, such as covalent attachment [10]. The diverse characteristics of supports, reactive groups, and immobilization protocols allow preparing a battery of immobilized enzymes with possible different properties. Therefore, the studies of new matrices and immobilization strategies are important steps to overcome current obstacles for enzymes effective industrial applications [11].

Non-covalent immobilization methods are known for their simplicity, generally non-destructive towards enzyme activity, and being obtained under mild immobilization conditions [9,12]. Moreover, the use of reversible enzyme immobilization methods

presents the possibility of reducing the cost of the support because it can be reused after the loss of enzyme activity by its desorption and enzyme reload [9,13,14]. One support largely used for this type of immobilization is the monoaminoethyl-N-ethyl-agarose (MANAE-agarose), an anion-exchanger matrix showing primary and secondary amino groups [15]. However, the enzyme risks progressive release into the reaction medium, caused by changes in temperature, pH, or ionic strength [12,13].

The covalent attachment provides an irreversible binding of the biocatalyst to the support, and, for this reason, it prevents enzyme leakage. Nevertheless, it is a process that needs generally more steps, longer reaction times and the use of complex chemicals [16]. Thus, this should be used only if the enzyme properties are really improved compared to the reversible immobilization. Among the strategies to covalently immobilize enzymes, the use of glutaraldehyde as the activating agent is generally utilized because of its high versatility [17]. Glutaraldehyde reacts with primary amino groups of the enzyme and the support, resulting in a heterofunctional support, having both physical and chemical interaction capacities [18,19]. The reaction mechanism between the glutaraldehyde and the enzyme molecule is not limited to just one mechanism, allowing to immobilize an enzyme under different ways [15,20–22].

One of the most used strategies using glutaraldehyde is the activation of aminated supports [15,18–22]. At low ionic strength, the enzymes generally are firstly immobilized on this glutaraldehyde-amino activated support by ionic exchange, usually much more rapidly than by the direct covalent attachment [15,18–22]. Additionally, after the ionic exchange, some groups of the enzyme surface may react with the glutaraldehyde groups located in the support giving covalent bonds. In contrast, when a moderately high ionic strength is used, the covalent attachment is the first step of the immobilization, usually involving the terminal amino group of the enzyme (the external

one bearing the lowest pK) [18,21]. Other immobilization strategy via glutaraldehyde chemistry is the post-immobilization treatment of the biocatalyst with glutaraldehyde after enzyme immobilization by ionic exchange on the aminated support [19,22–24]. The pH of immobilization may affect several critical points. Firstly, it may change the reactivity of the enzyme with the support (higher when the pH is higher). Secondly, the orientation of the enzyme molecule adsorption may change depending on the pH value [25].

The β -glucosidases (β -D-glucopyranoside glucohydrolase; EC 3.2.1.21) are an important group of enzymes responsible for the hydrolysis of β -1,4-glycosidic bond in disaccharides, oligosaccharides, aryl-, and alkyl β -glucosides. These enzymes are extensively studied because their wide range of applications in food, feed, textile, and paper industries [26].

Considering all these aspects, the objectives of this work were to study the immobilization of three different β -glucosidases on MANAE agarose support, using glutaraldehyde chemistry under different conditions and strategies. The thermal stabilities, tolerance towards glucose inhibition, and the operational stability of the different immobilized biocatalysts in repeated cellobiose hydrolysis reactions were also tested. Although there are some studies about β -glucosidase immobilization [21,27–29], reports concerning the specific β -glucosidases used in this work were not found.

2. Material and Methods

2.1 Materials

Three β -glucosidases were studied in this work: from Pectinex Ultra SP-L, produced by *A. aculeatus* (according to the manufacturer), from Pectinex Ultra Clear produced by mix of *A. aculeatus* and *A. niger* (according to the manufacturer), and a

homemade preparation from *A. niger* URM 6642 (GenBank accession number: KF909374), isolated from Atlantic rainforest biome, located in the Bela Vista Biological Refuge (Foz do Iguassu, Paraná, Brazil), was used as a producer of β -glucosidase enzyme, as described elsewhere [30]. 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG), glycidol, glutaraldehyde (25 % volume fraction), sodium borohydride, sodium periodate, and ethylenediamine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The 4 % CL agarose beads were from GE Healthcare. All other reagents were of analytical grade.

2.2 Enzymatic activity assays and protein quantification

The activities of soluble and immobilized β -glucosidases were determined using *p*NPG as substrate. The reaction was carried out mixing 100 μ L of *p*NPG (9 mM) in 100 mM sodium citrate buffer at pH 4.8, 100 μ L of the same buffer and 100 μ L of enzyme incubated at 40 °C for 5 min. The reaction was stopped by adding 1.2 mL of 0.1 M Na₂CO₃ at pH 10 and quantified at 410 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute. Protein concentration was measured by the Lowry method [31], using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

2.3 Partial Purification of β -glucosidases

Ion-exchange chromatography was performed on DEAE-Sepharose column equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer, at pH 5 and 4 °C. The enzyme crude extract (15 mg of protein/g resin) was applied and subsequently eluted using a linear gradient of 0.05-1.0 M NaCl in same buffer. The proteins showing the highest β -

glucosidase activities were pooled, ultrafiltrated using a 10 kDa cut-off membrane, and stored at -20 °C until further analyses.

2.4 Preparation of supports and immobilization

MANAE-agarose was prepared from glyoxyl supports [32] according to the protocol described by Fernandez-Lafuente et al. [15]. The MANAE support was activated using glutaraldehyde, as described by Betancor et al. [19]. The immobilizations were carried out using 10 mg of partially purified β -glucosidases per gram of support. Thus, for immobilization on MANAE-agarose, the enzyme extract was diluted in 5 mM sodium phosphate buffer at pH 5.0, pH 7.0, or pH 9.0, mixed with the support (1 g of support to 10 mL of enzyme solution) and gently stirred at 4 °C for 2 h. The immobilized enzyme was filtered and washed using the same buffer. In some cases, the enzyme, previously adsorbed on MANAE-agarose, was treated with 0.5 % (v/v) glutaraldehyde solution using 5 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C for 90 min. Subsequently, the modified immobilized enzyme was washed with the same buffer to remove the excess of glutaraldehyde [33].

For the immobilization on MANAE-agarose-glutaraldehyde, the enzyme was diluted in 5 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 (1:10 support:enzyme solution, mass fraction), either in the absence or the presence of 1 M NaCl and mixed with the support. The enzyme-support suspensions were gently stirred at 4 °C for 24 h.

The immobilization steps were followed by measuring the enzyme activity in the supernatant and in the whole suspension at different time intervals using *p*NPG as substrate, as described above. Additionally, controls of soluble enzyme were used to determine the possible inactivating effect of the experimental conditions during the immobilization. All prepared biocatalysts were stored at 4 °C until further use.

The immobilization parameters were defined as described by Sheldon and van Pelt (2013). The immobilization yield (IY), the immobilization efficiency (IE), and the activity recovery (RA) are calculated as shown below:

$$\text{Immobilization Yield (\%)} = \left[\frac{\text{Immobilized activity}}{\text{Offered activity}} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Efficiency (\%)} = \left[\frac{\text{Observed activity}}{\text{Expected Immobilized activity}} \right] \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Activity recovery (\%)} = \left[\frac{\text{Observed activity}}{\text{Offered activity}} \right] \times 100 \quad (3)$$

2.5 Effect of glucose on β -glucosidase activity

To determine the glucose inhibitions, activities were measured in the presence of different glucose concentrations. The reaction mixture (enzyme and *p*NPG) was incubated in 0.1 mol.L⁻¹ citrate buffer pH 3.0 and 4.8 in the presence of different glucose concentrations (5.55 - 222 mmol.L⁻¹). The relative activity was defined as the activity of the enzyme at each glucose concentration compared to the activity of the control without glucose.

2.6 Inactivation assays

The thermal stabilities of the soluble and immobilized β -glucosidases were studied by incubating the biocatalyst in 100 mM sodium citrate buffer (pH 4.8), at 60 °C Periodically, the residual activities of the enzyme samples were measured. The thermal inactivation was defined by the first order reaction described by Sadana and Henley (1987):

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (4)$$

Where A is the enzyme activity, A_0 is the initial enzyme activity, t is the reaction time, and k is the inactivation rate constant at the studied temperature. The half-life ($t_{1/2}$) was calculated from the values of k:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (5)$$

The stabilization factor (SF) was calculated as the ratio between the half-lives of the soluble and immobilized β -glucosidases for each temperature studied.

2.7 Reuse of the biocatalyst

The reuse of the immobilized β -glucosidases was evaluated in reactions of cellobiose hydrolyses. An amount of 100 mg of the biocatalyst (approximately 0.4 U) was added to 1.0 mL of substrate solution (40 g.L^{-1}) prepared in 100 mM sodium citrate buffer at pH 4.8 and incubated at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. After each cycle of hydrolysis, the immobilized β -glucosidase was recovered by centrifugation at $4,000 \text{ g}$ for 5 min and washed 3 times with 100 mM sodium citrate buffer pH 4.8. The reaction was repeated for 12 cycles and the percentage of residual activity of the immobilized enzyme was determined after each cycle.

3. Results and Discussion

3.1. Partial Purification of the β -glucosidases

The enzymatic extracts were partial purified to allow the immobilization of β -glucosidase with high specific activity, removing some of the other contaminant proteins, as described in the methods section. It was possible to obtain β -glucosidases partially purified at different degrees of activities: 3.4-folds to a specific activity of 0.3 U.mg^{-1} protein, with a yield of 61.5 % for Pectinex Ultra Clear; 5.3-folds to a specific activity of 2.8 U.mg^{-1} protein, with a yield of 73 % for Pectinex Ultra SPL; and 4.7-folds

to a specific activity of 1.2 U.mg⁻¹ protein, with a yield of 42 % for the *in-house* preparation of enzyme from *A. niger*. Results are shown in Table 1.

A partial purification of protein is important for immobilization, because the volumetric activity of the biocatalyst can be enhanced by eliminating some proteins that can compete with the target enzyme [9]. Thus, for the next experiments, partially purified free enzymes were used for immobilization and thermal stabilities assays.

Table 1: Purification of β -glucosidases on DEAE-Sepharose

	Purification step	Total activity (U.mL ⁻¹)	Total protein (mg.mL ⁻¹)	Specific activity (U.mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification factor
Pectinex Ultra Clear	Crude extract	0.52±0.01	6.62±0.06	0.08±0.00	100	1.0
	DEAE- Sepharose	0.32±0.01	1.19±0.05	0.27±0.00	61.5	3.4
Pectinex Ultra SP-L	Crude extract	3.48±0.20	6.58±1.01	0.53±0.03	100	1.0
	DEAE- sepharose	2.53±0.02	0.90±0.18	2.82±0.12	72.7	5.3
<i>A. niger</i>	Crude extract	2.02±0.08	7.88±0.09	0.26±0.01	100	1.0
	DEAE- Sepharose	0.84±0.02	0.69±0.00	1.22±0.02	41.6	4.7

Results are presented as means \pm SD (n = 3).

3.2 β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L

3.2.1 Enzyme immobilization

Initially, the partially purified β -glucosidase ($0.56 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) contained Pectinex Ultra SP-L was immobilized on MANAE-agarose support at three different pH values (pH 5, 7, and 9) and the results are presented in Table 2. The immobilization of the enzyme proceeded quickly for all pH values, faster at pH 5 (more than 85 % in 15 min), followed by immobilization at pH 7 and at pH 9 (81 % and 70 %, respectively, in 15 min). This fast immobilization has been reported also by β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* IFO9748 expressed in *Pichia pastoris* KM71H with fused cellulose binding module 3, when adsorbed on regenerated amorphous cellulose (RAC) [34]. β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L is a commercial enzymatic preparation produced by the filamentous fungus *A. aculeatus* and its isoelectric point is 4.7 [35]. Thus, the enzyme is already a polyanion even at pH 5. Therefore, the effect of the pH in the immobilization rate should be derived mainly from the support ionization, with the primary amino group having a pK of 6.8 [15]. The changes in the enzyme surface ionic character can affect its interaction with the support surface and alter the adsorption characteristics, orientation, or localized ionic attraction/repulsion [36].

Table 2: Immobilization of β -glucosidase contained on Pectinex Ultra SP-L on different supports.

Support	Immobilization Yields (%)	Activity recovery (%)	Activity (U/g)
MANAE-agarose pH 5.0	97.77	92.07	4.80±0.03
MANAE-agarose pH 7.0	95.84	84.72	4.46±0.08
MANAE-agarose pH 9.0	77.47	65.66	3.46±0.03
MANAE-GLU-agarose	97.84	95.11	3.54±0.02
MANAE-GLU-agarose + 1M NaCl	21.00	5.79	0.36±0.03
MANAE-E-GLU pH 5.0	98.50	78.87	2.42±0.06
MANAE-E-GLU pH 7.0	97.27	84.78	3.7±0.05
MANAE-E-GLU pH 9.0	97.82	84.58	4.48±0.12

After treating the immobilized enzyme with glutaraldehyde, the immobilized enzyme from Pectinex Ultra SP-L also exhibited high activity recovery with low differences among the three studied first immobilization pH values (Table 2).

This enzyme was also immobilized on MANAE-agarose support pre-activated with glutaraldehyde using low-ionic strength (5 mM sodium phosphate) at pH 7. The activity recovery was the highest for this enzyme, with 97 % of immobilization efficiency, and 95 % of activity recovery. The enzyme was also immobilized on pre-activated support in the presence of 1 M NaCl, to prevent the ionic adsorption. In this strategy, β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L presented an immobilization yield of only 21 %. This result confirmed that ionic exchange was the first step of the immobilization of the enzyme on pre-activated glutaraldehyde supports. Due to the low immobilization yield, this preparation was no longer used in further studies.

3.2.2 Thermal Stability

The β -glucosidase of Pectinex Ultra SP-L immobilized by adsorption on MANAE-agarose improved the enzyme stability. The highest thermal stability among the prepared biocatalysts by ionic exchange was obtained when the enzyme was immobilized at pH 7 (SF of 2.2) (Table 3). This result suggests that the orientation of the enzyme molecule could not be the same when immobilized at different pH values [25], and the possible difference in enzyme orientation affected the final enzyme stability. This result also suggests that the anionic exchange of the enzyme on the support has a positive effect on enzyme stability, perhaps because of the stabilization of the enzyme structure. In addition, when the enzyme immobilized on MANAE-agarose was treated with glutaraldehyde, the stability was improved in all immobilization pH values, and the half-life at 60 °C ($t_{1/2}$) increased 6.8, 7.8, and 17 times, compared to the free form, when the enzyme had been immobilized at pH 5, 7, and 9, respectively. However, the highest thermal stability of the immobilized β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L was obtained when the biocatalyst was immobilized on MANAE-agarose-glutaraldehyde at pH 7, exhibiting a stabilization factor of 22.3-fold.

Table 3: Thermal stability of different immobilized enzymes at 60 °C

Biocatalyst	Pectinex Ultra SP-L		Pectinex Ultra Clear		<i>A. niger</i>	
	T _{1/2} (h)	SF*	T _{1/2} (h)	SF*	T _{1/2} (h)	SF*
Free enzyme	0.04	-	3.11	-	5.95	-
MANAE-agarose pH 5.0	0.08	2	5.03	1.6	7.76	1.3
MANAE-agarose pH 7.0	0.09	2.2	5.30	1.7	14.04	2.4
MANAE-agarose pH 9.0	0.07	1.8	4.80	1.5	6.46	1.1
MANAE-GLU-agarose	0.89	22.3	118.79	38.2	85.32	14.3
MANAE-E-GLU pH 5.0	0.27	6.8	332.53	106.9	1710.97	287.6
MANAE-E-GLU pH 7.0	0.31	7.8	216.83	69.7	2335.73	392.6
MANAE-E-GLU pH 9.0	0.68	17	683.93	219.9	3328.26	559.4

* SF: Stabilization factor

3.3 β -glucosidase from Pectinex Ultra Clear

3.3.1 Enzyme Immobilization

Table 4 shows the immobilization yields and activity recoveries when immobilizing β -glucosidase contained in Pectinex Ultra Clear, following different immobilization strategies. The ionic exchange was faster at pH 7 (75 % of the enzyme was immobilized after 15 min), reaching an immobilization yield of 89 % and an activity recovery of 70 %. At pH 5 or 9, only 49 % and 57 % of the enzyme was attached to the support at the same time, respectively. Similar results were reported on adsorption immobilization of glucosidase from *A. niger* on MANAE-agarose beads, regarding the higher immobilization yield at pH 7 than at pH 5 [21]. At pH 5, the anionic property of the enzyme would be reduced, while at pH 9 the cationic character of the support would be reduced. Therefore, an optimal, intermediary ion exchange rate at pH 7 could be devised.

Table 4: Immobilization of β -glucosidase contained on Pectinex Ultra Clear on different supports.

Support	Immobilization Yields (%)	Activity recovery (%)	Activity (U/g)
MANAE-agarose pH 5.0	76.69	49.85	1.54±0.06
MANAE-agarose pH 7.0	88.98	70.34	2.60±0.22
MANAE-agarose pH 9.0	72.45	57.16	1.24±0.01
MANAE-GLU-agarose	99.04	72.52	4.46±0.09
MANAE-GLU-agarose + 1M NaCl	11.22	0.12	0.06±0.00
MANAE-E-GLU pH 5.0	98.16	66.39	4.08±0.10
MANAE-E-GLU pH 7.0	96.71	53.72	1.98±0.02
MANAE-E-GLU pH 9.0	98.82	69.82	3.50±0.03

The glutaraldehyde treatment of the β -glucosidase from Pectinex Ultra Clear, adsorbed onto MANAE-agarose support at pH 5, 7, and 9 had scarce effect on enzyme activity (66, 53 and 69 % of activities recoveries, respectively).

The immobilization on supports activated with glutaraldehyde at pH 7 produced 99 % of immobilization yield and 70 % of activity recovery. However, the immobilization yield decreased to only 11 % when 1 M NaCl was utilized during the immobilization reaction. Again, this showed that the first step of the immobilization at low ionic strength medium was the adsorption by ion exchange.

3.3.2 Thermal Stability

The immobilization on MANAE-agarose via ionic exchange produced a slight increase in enzyme stability ($SF > 2$), in this instance there were no differences among different immobilization pH values (Table 3).

The treatment of these enzyme preparations with glutaraldehyde significantly increased the enzyme stability. In relation to the free enzyme inactivated at 60 °C, the enzyme immobilized at pH 9 was, approximately, 220-fold more stable, it was 107-fold more stable at pH 5; and finally, it was 70-fold more stable at pH 7. These results suggest that, although the ionically-exchanged enzymes have very similar stabilities, the orientation of the enzyme molecule was in fact different, perhaps giving different possibilities for enzyme multipoint covalent attachment.

The immobilization of the β -glucosidase on MANAE-agarose-glutaraldehyde support also allowed for a significant stabilization. The stabilities of this preparation were approximately 38-times higher than that of the free enzyme. However, this value is lower than that obtained treating the previously adsorbed enzyme with glutaraldehyde.

3.4 β -glucosidase from *A. niger*

3.4.1 Enzyme immobilization

Results are shown in Table 5, regarding the immobilization parameters by adsorption on MANAE-agarose of the β -glucosidase obtained from *A. niger* at different pH. High percentage (more than 90 %) of β -glucosidase was adsorbed on MANAE-agarose at the three studied pH, but the activity recovery decreased with increasing the immobilization pH (89, 83, and 77 %, for pH 5, 7, and 9, respectively), as similarly observed for Pectinex Ultra SP-L. The treatment of this preparation with glutaraldehyde gave immobilization yields higher than 95 % and activity recovered higher than 65 % (Table 4). Additionally, the immobilization on MANAE-agarose-glutaraldehyde support of the β -glucosidase from *A. niger* also produced good immobilization parameters: about 95 % immobilization yield and 92 % activity recovery (Table 4). The addition of

1 M NaCl at pH 7 produced negligible immobilization yields (4.6 %.), the lowest between the 3 studied enzymes, suggesting that amino groups of this enzyme are poorly reactive at pH 7, which means that the terminal amino group is of low accessibility or displays a high pK .

Table 5: Immobilization of β -glucosidase from *A. niger* on different supports.

Support	Immobilization yield (%)	Activity recovery (%)	Activity (U/g)
MANAE-agarose pH 5.0	94.54	89.73	9.58±0.02
MANAE-agarose pH 7.0	90.31	83.57	10.74±0.09
MANAE-agarose pH 9.0	92.29	77.84	5.98±0.01
MANAE-GLU-agarose	94.99	91.85	9.14±0.14
MANAE-GLU-agarose + 1M NaCl	4.63	1.99	0.72±0.08
MANAE-E-GLU pH 5.0	96.97	66.06	3.18±0.08
MANAE-E-GLU pH 7.0	97.42	72.83	9.36±0.07
MANAE-E-GLU pH 9.0	97.17	69.24	3.24±0.01

3.4.2 Thermal stability

The thermal stabilities of the soluble and the immobilized preparations of β -glucosidase from *A. niger* were also compared. The stabilizations of the ionically exchanged proteins were the highest among the analyzed enzymes, with a SF over 2 when immobilized at pH 7. Table 3 shows that the biocatalyst immobilized on MANAE-agarose at pH 9 and subsequently treated with glutaraldehyde reached a SF of approximately 560, the highest among the three tested enzymes. The stability of the adsorbed enzyme is not correlated to the stability of ionically adsorbed enzyme. This may be based on different causes; one of the reasons for a lower stability of the

ionically adsorbed enzymes may be the presence of Lys on enzyme surface on the area involved in the adsorption over the amino groups in the support that weaken the adsorption strength. However, in this case, the glutaraldehyde treatment may allow for a more intense multipoint covalent attachment.

In comparison, immobilization of β -glucosidase from *A. niger* on sponge by covalent binding with glutaraldehyde, and on MANAE-glutaraldehyde presented half-life values of 72.95 min and 98 min, at 65 °C, respectively [29,37]. At higher temperatures (70 °C), *A. niger* enzyme immobilized on MANAE-agarose at different pH, then cross-linked with glutaraldehyde, presented a stabilization factor of 65 (immobilized at pH 9), 53 (immobilized at pH 7) and 36-fold (immobilized at pH 5), with half-lives of 17.69, 14.40, and 9.82 h, respectively.

The stability of β -glucosidase from *A. niger* immobilized on MANAE-agarose at pH 7 and cross-linking with glutaraldehyde was similar to the reported for the thermostable glucosidase from *Halothermothrix orenii*, which presented half-life of 6 h at 70 °C [38]. Our biocatalyst had half-lives of 14.4 h at the same temperatures (data not shown). It is further noted that this immobilization strategy permitted a much higher stabilization than that observed using commercial β -glucosidase from *A. niger* immobilized on Eupergit C (half-life of 20 h at 65 °C) [39], or immobilized on amino-epoxy agarose (half-life of almost 23 h at 65 °C) [29]. Both supports are known for their ability to form multiple covalent bonds with the enzyme, which tend to increase stability of the three dimensional structure of the enzyme at elevated temperatures [29,39].

The results presented in Table 3 showed that the enzyme stability was also enhanced by immobilization on MANAE-agarose-glutaraldehyde support. The immobilized biocatalyst was 14-times more stable than the free enzyme. However, the

stabilization was lower than that obtained to the adsorbed enzyme and then cross-linked with glutaraldehyde.

3.5. Inhibition by glucose

Competitive inhibition by glucose is a well-described phenomenon for several β -glucosidases, although some enzymes can be glucose-tolerant or glucose-stimulated [40]. The application of β -glucosidases to hydrolyze glycosidic bonds requires a biocatalyst less sensitive to product inhibition for industrial use. Thus, different immobilizations processes have occasionally been demonstrated to reduce enzyme inhibition for their products [41,42]. β -glucosidases from Pectinex Ultra SP-L and from *A. niger* showed that glucose tolerance slightly increased compared to free enzyme, after immobilization of the enzyme onto MANAE-agarose at pH 7. In addition, a slight increase on K_i was also shown for β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L immobilized on MANAE agarose and then treated with glutaraldehyde, and immobilized on glutaraldehyde MANAE agarose, both at pH 7. Similar results were found for β -glucosidase from *A. niger* via cross-linking with glutaraldehyde [21]. Variations in reaction pH resulted in changes of the ionic form of the active sites of the enzymes, influencing the enzyme features. These pH variations can also alter the three-dimensional shape of the immobilized enzyme molecule [43]. Thus, immobilization at pH 7 seems to favor β -glucosidase activity in higher glucose concentrations when compared with the free form. However, this positive effect of immobilization is only observed when the reaction was performed at pH 3.0. This fact seems to be related with the electrostatic properties of the deep active sites entrance of β -glucosidases. β -glucosidases with high glucose tolerance present a more neutral active site entrance [44–46]. On the other hand, no significant differences on glucose

tolerance activity were observed, compared to soluble enzyme, for the different β -glucosidase derivatives from Pectinex Ultra Clear and other strategies used for Pectinex Ultra SP-L and *A. niger*.

3.7. Operational stabilities of the different immobilized β -glucosidases

Reusability studies of the immobilized β -glucosidases were carried out using the two biocatalysts that presented the highest thermal stability for each enzyme using cellobiose as substrate. Fig. 1a shows the results obtained for the immobilized β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L on MANAE-agarose-glutaraldehyde and MANAE-agarose at pH 9, followed by glutaraldehyde cross-linking. The enzyme showed residual activities of approximately 66 % and 50 %, respectively, up to 12 successive cycles. The β -glucosidase from Pectinex Ultra Clear immobilized on MANAE-agarose at pH 5 and pH 9 and cross-linked with glutaraldehyde retained similar activities (approximately 65 %) after 12 cycles, as it is illustrated in Fig. 1b. Additionally, β -glucosidase from *A. niger* kept 68 % and 82 % of its activity for the biocatalysts prepared on MANAE-agarose at pH 5 and pH 9 followed by glutaraldehyde cross-linking, after the 12th cycle (Fig. 1c). The biocatalysts prepared in this study presented good reusability in comparison with other reports. β -glucosidase immobilized on nanosized silicates via covalent coupling using APTES and glutaraldehyde as linking agents, retaining 81% of its activity after only five cycles of reuse at 50 °C [47]. The β -glucosidase from *A. awamori* immobilized on commercial gelatin cross-linked with glutaraldehyde kept 83 % of its initial activity at the 10th cycle [48]. Moreover, the results obtained in this work compared well with those reported using the commercial β -glucosidase immobilized on chitosan-chitin activated with glutaraldehyde, which kept only 21 % of its activity after seven reuses [49]. Therefore,

good reusability was observed on the immobilization strategies of the β -glucosidases studied in this research, which could significantly reduce the operation costs for industrial applications of these biocatalysts [50].

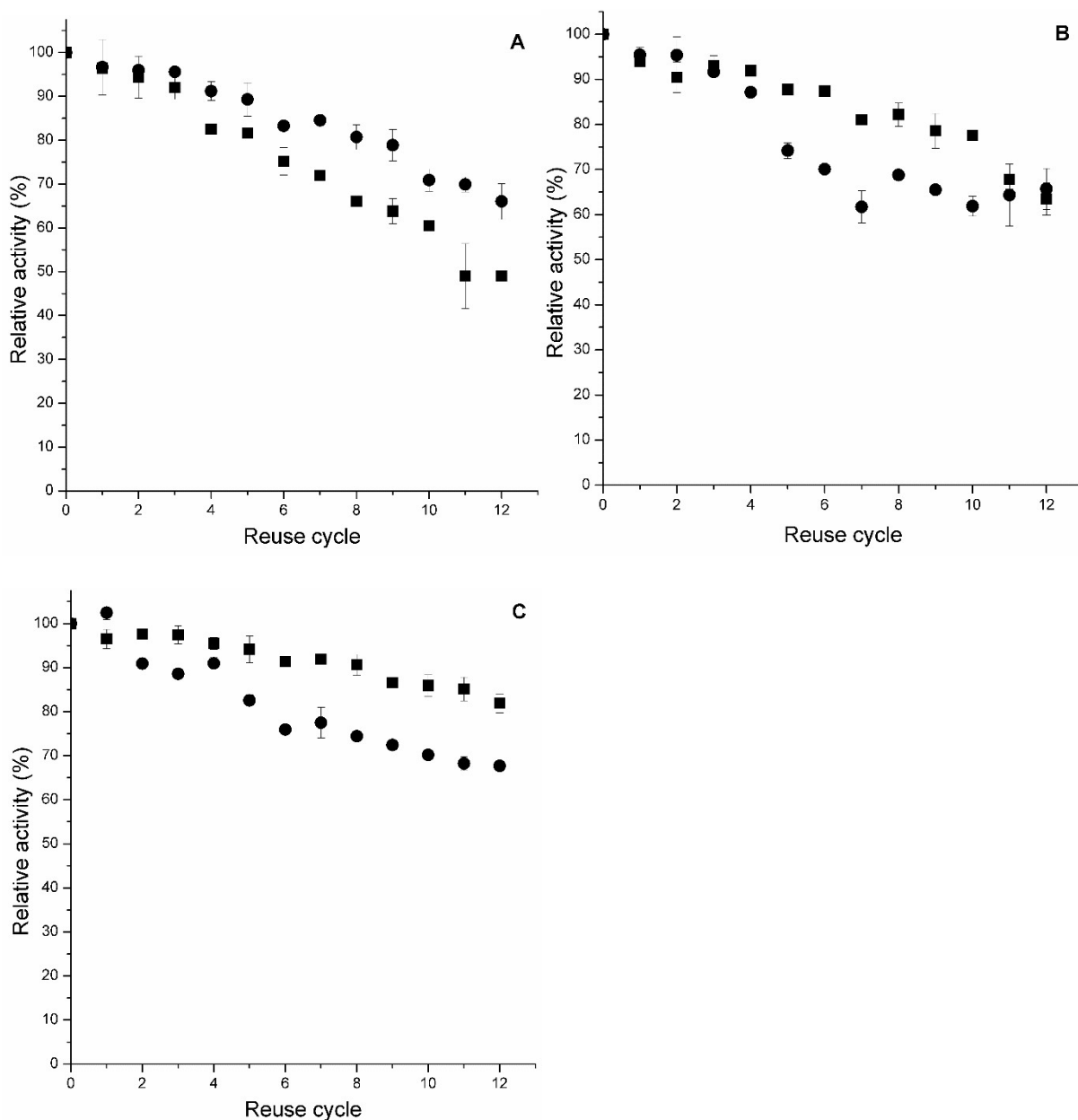


Fig. 1: Repeated hydrolysis of cellobiose. (a) β -glucosidase contained on Pectinex Ultra SP-L immobilized on (●) MANAE-agarose-glutaraldehyde at pH 7.0 and (■) MANAE-agarose at pH 9.0 and treated with glutaraldehyde. (b) β -glucosidase contained on Pectinex Ultra Clear (●) immobilized on MANAE-agarose at pH 5.0 and (■) pH 9.0 both treated with glutaraldehyde. (c) β -glucosidase from *A. niger* immobilized on (●) MANAE-agarose at pH 7.0 and (■) pH 9.0 both treated with glutaraldehyde.

4. Conclusions

This paper exemplifies the versatility of glutaraldehyde as a chemical for enzyme immobilization, at the same time showing that the “optimal” protocol for enzyme immobilization strongly depends on the enzyme properties. Although the adsorption of the enzyme followed by treatment with glutaraldehyde is the strategy that would allow the most intense multipoint covalent attachment, this protocol worked well only for 2 of the 3 analyzed enzymes. Pectinex Ultra SP-L maximum stability was observed when the enzyme was immobilized on glutaraldehyde pre-activated supports. On the other hand, the role of the immobilization pH was found to be critical for the final results. The enzyme from *A. niger* was 2-times more thermal stable when immobilized by ionic exchange at pH 7 than to pH 5 or 9. For the β -glucosidase contained in Pectinex Ultra Clear, however, the effects were only clear after treatment with glutaraldehyde. The enzyme immobilized by ionic exchange at pH 9 and then treated with glutaraldehyde was 2-times more stable than the enzyme immobilized at pH 5 and 3-times than to enzyme immobilized at pH 7. That way, by exploiting the versatility of the glutaraldehyde chemistry, we have been able to prepare very stable and active immobilized biocatalyst of the 3 involved enzymes.

Acknowledgments

This work was supported by scholarships (D. Andrades from CNPq; N. Graebin, from CAPES), and grants from CNPq (process 403505/2013-5) and FAPERGS (process 17/2551-0000939-8) from Brazil and from the MINECO from Spanish Government, (project number CTQ2017-86170-R).

References

- [1] J.M. Woodley, New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 321–327.
- [2] R.A. Sheldon, J.M. Woodley, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801–838.
- [3] J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1443–1454.
- [4] J. Chapman, A. Ismail, C. Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, *Catalysts.* 8 (2018) 238.
- [5] D. Brady, J. Jordaan, Advances in enzyme immobilisation, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1639–1650.
- [6] S.A. Ansari, Q. Husain, Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 512–523.
- [7] R. Dicosimo, J. McAuliffe, A.J. Poulouse, G. Bohlmann, Industrial use of immobilized enzymes, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6437–6474.
- [8] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290–6307.
- [9] C. Garcia-Galan, Á. 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.
- [10] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235.

- [11] J.C.S. dos Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes, *ChemCatChem*. 7 (2015) 2413–2432.
- [12] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption*. 20 (2014) 801–821.
- [13] J.J. Virgen-Ortíz, V.G. Tacias-Pascacio, D.B. Hirata, B. Torrestiana-Sanchez, A. Rosales-Quintero, R. Fernandez-Lafuente, Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports, *Enzyme Microb. Technol.* 96 (2017) 30–35.
- [14] J.J. Virgen-Ortíz, S. Peirce, V.G. Tacias-Pascacio, V. Cortes-Corberan, A. Marzocchella, M.E. Russo, R. Fernandez-Lafuente, Reuse of anion exchangers as supports for enzyme immobilization: Reinforcement of the enzyme-support multiinteraction after enzyme inactivation, *Process Biochem.* 51 (2016) 1391–1396.
- [15] R. Fernandez-Lafuente, C.M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida, J.M. Guisan, Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 546–550.
- [16] 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.
- [17] O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Adv.* 4 (2014) 1583–1600.

- [18] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*, *Process Biochem.* 47 (2012) 1220–1227.
- [19] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J.M.M. Guisán, Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 877–882.
- [20] E.-H. Siar, S. Arana-Peña, O. Barbosa, M. Zidoune, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization/Stabilization of Ficin Extract on Glutaraldehyde-Activated Agarose Beads. Variables That Control the Final Stability and Activity in Protein Hydrolyses, *Catalysts.* 8 (2018) 149.
- [21] P.G. Vazquez-Ortega, M.T. Alcaraz-Fructuoso, J.A. Rojas-Contreras, J. López-Miranda, R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of dimeric β -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 110 (2018) 38–45.
- [22] H. Zaak, S. Peirce, T. de Albuquerque, M. Sassi, R. Fernandez-Lafuente, Exploiting the Versatility of Aminated Supports Activated with Glutaraldehyde to Immobilize β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Catalysts.* 7 (2017) 250.
- [23] J.M. Palomo, R.L. Segura, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisán, Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 704–707.

- [24] G. Fernández-Lorente, J.M. Palomo, C. Mateo, R. Munilla, C. Ortiz, Z. Cabrera, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 2610–2615.
- [25] T.L. de Albuquerque, S. Peirce, N. Rueda, A. Marzocchella, L.R.B. Gonçalves, M.V.P. Rocha, R. Fernandez-Lafuente, Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability, *Process Biochem.* 51 (2016) 875–880.
- [26] J.R. Ketudat Cairns, A. Esen, β -Glucosidases, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 3389–3405.
- [27] N.G. Graebin, J.D.N. Schöffner, D. De Andrades, P.F. Hertz, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues, Immobilization of glycoside hydrolase families GH1, GH13, and GH70: State of the art and perspectives, *Molecules*. 21 (2016) 1–38.
- [28] 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.
- [29] M.F. Vieira, A.M.S. Vieira, G.M. Zanin, P.W. Tardioli, C. Mateo, J.M. Guisán, β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 69 (2011) 47–53.
- [30] A. Oriente, R. Tramontina, D. de Andrades, C. Henn, J.L.C. Silva, R.C.G. Simão, A. Maller, M. de L.T.M. Polizeli, M.K. Kadowaki, Characterization of a novel *Aspergillus niger* beta-glucosidase tolerant to saccharification of lignocellulosic biomass products and fermentation inhibitors, *Chem. Pap.* 69 (2015) 1050–1057.

- [31] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [32] J.M. Guisán, Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 375–382.
- [33] F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 70–75.
- [34] S. Hu, D. Wang, J. Hong, A Simple Method for Beta-glucosidase Immobilization and Its Application in Soybean Isoflavone Glycosides Hydrolysis, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 23 (2018) 39–48.
- [35] C.H. Decker, J. Visser, P. Schreier, β -Glucosidases from Five Black *Aspergillus* Species: Study of Their Physico-Chemical and Biocatalytic Properties, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4929–4936.
- [36] J.N. Talbert, J.M. Goddard, Enzymes on material surfaces, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 93 (2012) 8–19.
- [37] S.A. Ahmed, N.M.A. El-Shayeb, A.M. Hashem, S.A. Saleh, A.F. Abdel-Fattah, Biochemical studies on immobilized fungal β -glucosidase, *Brazilian J. Chem. Eng.* 30 (2013) 747–758.
- [38] N. Hassan, T.-H. Nguyen, M. Intanon, L.D. Kori, B.K.C. Patel, D. Haltrich, C. Divne, T.C. Tan, Biochemical and structural characterization of a thermostable β -glucosidase from *Halothermothrix orenii* for galacto-oligosaccharide synthesis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 1731–1744.

- [39] M. Tu, X. Zhang, A. Kurabi, N. Gilkes, W. Mabee, J. Saddler, Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for Lignocellulose Hydrolysis, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 151–156.
- [40] J.C.S. Salgado, L.P. Meleiro, S. Carli, R.J. Ward, Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases – A review, *Bioresour. Technol.* 267 (2018) 704–713.
- [41] C. Mateo, R. Monti, B.C.C. Pessela, M. Fuentes, R. Torres, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1259–1262.
- [42] J.A. Figueira, H.H. Sato, P. Fernandes, Establishing the Feasibility of Using β -Glucosidase Entrapped in Lentikats and in Sol–Gel Supports for Cellobiose Hydrolysis, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 626–634. d
- [43] J. Jia, Y. Yang, Immobilization of β -Glucosidase on Modified Attapulgit, *Adv. Mater. Res.* 774–776 (2013) 540–543.
- [44] H.-L. Lee, C.-K. Chang, W.-Y. Jeng, A.H.-J. Wang, P.-H. Liang, Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability, *Protein Eng. Des. Sel.* 25 (2012) 733–740.
- [45] W.-Y. Jeng, N.-C. Wang, M.-H. Lin, C.-T. Lin, Y.-C. Liaw, W.-J. Chang, C.-I. Liu, P.-H. Liang, A.H.-J. Wang, Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*, *J. Struct. Biol.* 173 (2011) 46–56.
- [46] P.O. de Giuseppe, T. de A.C.B. Souza, F.H.M. Souza, L.M. Zanphorlin, C.B. Machado, R.J. Ward, J.A. Jorge, R. dos P.M. Furriel, M.T. Murakami, Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 70 (2014) 1631–1639.

- [47] Y. Carvalho, J.M.A.R. Almeida, P.N. Romano, K. Farrance, P. Demma Carà, N. Pereira, J.A. Lopez-Sanchez, E.F. Sousa-Aguiar, Nanosilicalites as Support for β -Glucosidases Covalent Immobilization, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 182 (2017) 1619–1629.
- [48] V.S. Nishida, R.F. de Oliveira, T. Brugnari, R.C.G. Correa, R.A. Peralta, R. Castoldi, C.G.M. de Souza, A. Bracht, R.M. Peralta, Immobilization of *Aspergillus awamori* β -glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process, *Int. J. Biol. Macromol.* 111 (2018) 1206–1213.
- [49] S. Romo-Sánchez, M. Arévalo-Villena, E. García Romero, H.L. Ramirez, A. Briones Pérez, Immobilization of β -Glucosidase and Its Application for Enhancement of Aroma Precursors in Muscat Wine, *Food Bioprocess Technol.* 7 (2014) 1381–1392.
- [50] Y. Zhou, S. Yuan, Q. Liu, D. Yan, Y. Wang, L. Gao, J. Han, H. Shi, Synchronized purification and immobilization of his-tagged β -glucosidase via Fe_3O_4 /PMG core/shell magnetic nanoparticles, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41741.

Immobilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry:**optimal protocol depends on the enzyme**

Diandra de Andrades, Natália G. Graebin, Marina Kimiko Kadowaki Marco A. Z. Ayub, Roberto Fernandez-Lafuente, Rafael C. Rodrigues

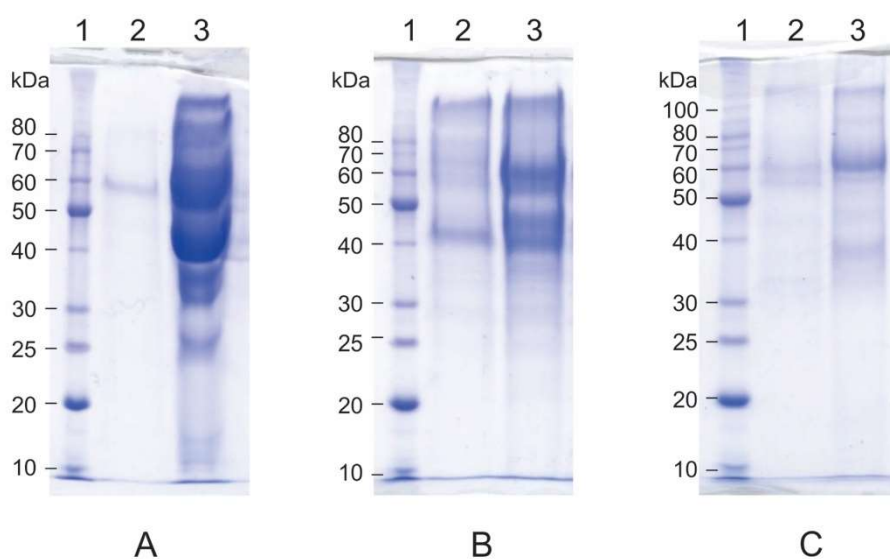
Supplementary Material

Figure S1. SDS-PAGE of β -glucosidase purification using DEAE-Sepharose. (A) from Pectinex Ultra SP-L; (B) from Pectinex Ultra Clear; (C) from *A. niger*. Lane 1: molecular weight marker (kDa); Lane 2: proteins adsorbed on DEAE-Sepharose; Lane 3: enzyme crude extract.

5.3. Preparation of immobilized/stabilized biocatalysts of β -glucosidases from different sources: Importance of the support active groups and the immobilization protocol

Neste trabalho, avaliamos a possibilidade de imobilizar, melhorar a estabilidade e reduzir a inibição da glicose das β -glicosidases das preparações comerciais, Pectinex Ultra SP-L e Celluclast® 1.5L usando grânulos de agarose ativados por glioxil, epóxi ou divinilsulfona. Estes dois preparados comerciais apresentaram boa atividade específica e tolerância à glicose no trabalho inicial, o que nos incentivou a melhorar suas propriedades por imobilização. As imobilizações em divinilsulfona também foram realizadas em pH 5, 7, 9 e 10 para analisar a influência das possíveis diferentes orientações das moléculas da enzima na superfície do suporte. Os biocatalisadores com melhores rendimentos foram testados com EDA 1 M em pH 10,0 ou glicina 1 M em pH 8,0 para bloquear os grupos excedentes do suporte. As estabilidades térmicas, a tolerância à inibição da glicose e a estabilidade operacional dos diferentes biocatalisadores imobilizados também foram testados. Os resultados estão apresentados no manuscrito a seguir, publicado no periódico *Biotechnology Progress*, v. 35, e2890, p. 1-11, 2019 (DOI: 10.1002/btpr.2890).

Preparation of immobilized / stabilized biocatalysts of beta-glucosidases from different sources: importance of the support active groups and the immobilization protocol

Diandra de Andrades,¹ Natália G. Graebin,¹ Marco A. Z. Ayub,¹ Roberto Fernandez-Lafuente^{*,2} and Rafael C. Rodrigues^{1,*}

¹Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Department of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, ZC 28049, Madrid, Spain

* Co-corresponding authors:

Rafael. C. Rodrigues. Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: +55 51 3308 7793; E-mail address: rafaelfcrodrigues@ufrgs.br. Website: www.ufrgs.br/bbb

Roberto Fernandez-Lafuente. Department of Biocatalysis, C/ Maria Curie 2, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, ZC 28049, Madrid, Spain Tel: + 34 915854149.; E-mail address: rfl@icp.csic.es

Abstract

β -glucosidases from two different commercial preparations, Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L, were immobilized on divinyl sulfone supports at pH 5.0, 7.0, 9.0, and 10. In addition, the biocatalysts were also immobilized in agarose beads activated by glyoxyl, and epoxide as reagent groups. The best immobilization results were observed using higher pH values on divinyl sulfone-agarose, and for Celluclast® 1.5L, good results were also obtained using the glyoxil-agarose immobilization. The biocatalyst obtained using Pectinex Ultra SP-L showed the highest thermal stability, at 65 °C, and an operational stability of 67 % of activity after 10 reuses cycles when immobilized on DVS-agarose immobilized at pH 10 and blocked with EDA. The β -glucosidase from Celluclast® 1.5L produced best results when immobilized on DVS-agarose immobilized at pH 9 and blocked with glycine, reaching 7.76-fold higher thermal stability compared to its free form and maintaining 76 % of its activity after 10 successive cycles. The new biocatalysts obtained by these protocols showed reduction of glucose inhibition of enzymes, demonstrating the influence of immobilization protocols, pH, and blocking agent.

Keywords: Covalent immobilization; Enzyme stabilization; Epoxide; Divinyl sulfone; glucose tolerance.

1. Introduction

Enzyme immobilization techniques have been designed to solve the problem of enzyme solubility in aqueous media, which makes the reuse of these relatively expensive biocatalysts complex.¹ Due to this necessity, many researchers have studied how to couple the immobilization process and the overcome of other enzyme uses challenge, such as enzyme stability, activity (mainly under harsh conditions), selectivity or specificity, resistance to inhibitor, and even the protein purity.²⁻⁸ In this way, immobilization became a critical step in the design of enzyme biocatalysts and it must be considered along other enzyme stabilization strategies.⁹⁻¹⁴

The final characteristics of the immobilized biocatalyst depend on different factors. In most cases, a multipoint covalent immobilization should be desired as this may permit to rigidify the molecule structure, although it is a difficult task.^{2,3,7} The support is a key factor, and some of its characteristics are important, such as the possibility to introduce many reactive groups to interact with the enzyme, to possess a flat surface, and to obtain a fully inert surface after immobilization.¹⁵ In this sense, agarose is an ideal support because it is appropriate to be used in mechanically stirred tanks, being fully inert, except for the moieties introduced by the immobilization process.¹⁶ The immobilization protocol is the second critical aspect to be taken in consideration.^{2,3,8,10} This must allow to control the number of enzyme-supports bonds, which will determine the final activity/stability properties of the biocatalyst. Generally, more enzyme–support bonds produce a more stable biocatalyst, in some instances with a lower activity.¹⁷ Thus, the reaction time and the pH of the immobilization are very important factors that determine the possibilities of the reactivity of the enzyme and support groups, and therefore to achieve an intense multipoint covalent attachment.¹⁷ Finally, the chemical active group in the support is also critical. It is necessary to have

a molecule that is stable under conditions where the enzyme is reactive, with low steric hindrances to the enzyme-support reaction, and that could be deactivated after the enzyme-support reaction.¹⁸ The length of the spacer arm is also very important. A long spacer arm allows a high number of enzyme-support interactions, but each bond will confer lower rigidity to the enzyme.¹⁸ Among the supports used for enzyme immobilization, glyoxyl-activated supports have been considered for long time as ideal supports to produce multipoint covalent attachment: the enzyme-aldehyde imine bond was so weak that only when several bonds were established, the enzyme becomes fixed to the support.¹⁹ Thus, the enzyme will be immobilized by its richest Lys surface area. Glyoxyl groups are very stable and have no steric hindrances to react with the primary amino groups.²⁰ The main limitations comes from the necessity of immobilizing the enzyme at alkaline pH value because of the pKa of Lys (10.67), since only primary amino groups can react with glyoxyl groups, and also because the reaction end-point involves the use of sodium borohydride, that can inactivate some enzymes.²⁰ Recently, to overcome this limitation, other reduction methods that avoid the use of borohydride have been proposed.²¹

An alternative to glyoxyl moieties are the epoxy groups.²² They can also react with primary amino groups similar to glyoxyl, but they can react with other enzyme groups such as thiol (Cys), imidazole (His), phenol (Tyr) and also with carboxylic groups (Asp and Glu).^{22,23} As reaction end-point, the remaining groups can be blocked and this can be a tool for tailoring enzyme features.^{24,25} However, the reactivity is so slow that in most cases the previous adsorption of the protein on the support is required to immobilize the enzyme¹⁸ with exception of proteins containing non-oxidized Cys.²⁶ Divinylsulfone activated agarose has been recently proposed as an ideal method to achieve enzyme multipoint immobilization. Vinylsulfone supports showed to be very

reactive with amino, thiol, imidazole, or phenol groups; it can be blocked using a variety of blocking reagents; and allows a number of enzyme-support interactions much higher than glyoxyl-agarose.^{27,28} However, the spacer arm is long, which is not always correlated to higher enzyme stabilization.²⁸ Interestingly, the immobilization could be carried out at pH ranging from 5 to 10, involving in the first attachment different enzyme reactive groups.²⁸ This immobilization supports had been proposed to immobilize enzymes, but the stabilization possibilities have not been properly exploited.^{29–36}

In this work, we evaluated the possibility to immobilize, improve the stability, and reduce glucose inhibition of β -glucosidases from two different commercial preparations, Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L using agarose beads activated by either glyoxyl, epoxide, or vinylsulfone. β -glucosidases (β -D-glucopyranoside glucohydrolase; EC 3.2.1.21) are very important enzymes in diverse areas from energy production (hydrolyzing cellobiose to fermentable glucose) to food and feed technology, pharmaceutical, textile, and paper industries.^{37–40} Both preparations, Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L, are composed mainly by pectinase and cellulase activities, respectively, and were previously characterized by their β -glucosidase activities, showing good specific activity and glucose tolerance,⁴¹ which encouraged us to improve their properties by immobilization. In Figure 1, we present a schematic representation of all immobilizations tested in our work, showing the reactions between enzyme and support, and blocking agent and support. Thermal stabilities, tolerance to glucose, and operational stability of the different immobilized biocatalysts in repeated batches of cellobiose hydrolysis were also tested.

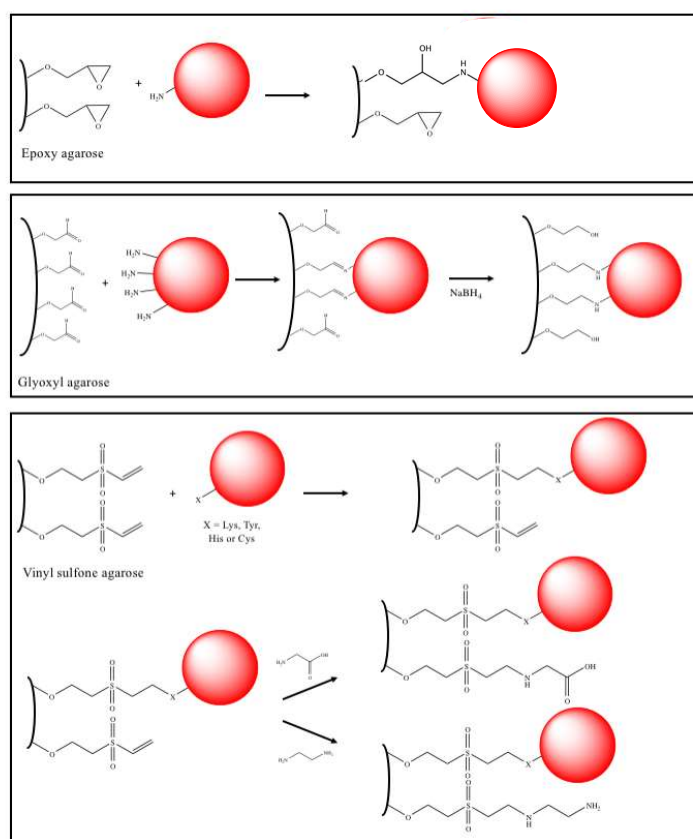


Figure 1. Schematic representation of immobilization protocols used in this study.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The commercial enzymatic preparations Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L were kindly donated by Novozymes (Spain). Ethylenediamine (EDA), divinyl sulfone, glycidol, glycine, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) and cellobiose were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sepharose CL-4 B beads were from GE Healthcare. All other chemicals used were of analytical or HPLC grade.

2.2. Enzymatic activity assays and protein quantification

The analysis of β -glucosidase activities was carried out according to Andrades et al.⁴² as follows. The activities of soluble and immobilized enzymes were determined

using *p*NPG as substrate, and *p*-nitrophenol was used as standard in the calibration curve. The reaction was performed mixing 100 μ L of *p*NPG (9 mM) in 100 mM sodium citrate buffer at pH 4.8, 100 μ L of the same buffer and 100 μ L of free or immobilized enzyme, and incubated at 40 °C for 5 min. At the end, 1.2 mL of Na₂CO₃ (0.1 M, pH 10) was added to stop the reaction, and the *p*-nitrophenol concentration was measured in spectrophotometer at 410 nm. One enzymatic activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute. Protein concentration was measured by the Lowry method,⁴³ using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

2.3. Preparation of supports

Glyoxyl support was prepared by etherification of agarose and glycidol and subsequent oxidation with periodate, according to protocol described by Guisán.⁴⁴ The divinylsulfone-agarose support was prepared activating the agarose matrix agarose with divinyl sulfone as described by Ortega-Muñoz et al.³¹ To prepare the epoxy-agarose support, the agarose beads were epoxylated with epichlorohydrin as previously reported.^{45,46}

2.4. β -glucosidase immobilization

The enzymatic extracts were partially purified by using a DEAE-Sepharose matrix in order to remove part of the other contaminant proteins, as described in Andrades et al.⁴² After purification, the extracts presented 0.90 mg.mL⁻¹ and 1.90 mg.mL⁻¹ of protein and 2.82 U.mg⁻¹ and 0.54 U.mg⁻¹ of specific activity from Pectinex Ultra SP-L and from Celluclast® 1.5L, respectively. All immobilizations were carried out using 10 mg of partially purified β -glucosidase extract per gram of support.

Immobilization on glyoxyl-agarose beads was performed by adding the enzyme prepared in 50 mM sodium carbonate at pH 10.0, mixed with the support (1:10 support:enzyme solution, mass fraction) at 4 °C for up to 48 h under continuous stirring. After the immobilization, derivatives were reduced by addition 1 mg.mL⁻¹ of solid sodium borohydride. After gentle stirring for 30 min, the resulting derivatives were washed with abundant distilled water.

For the immobilization on epoxy-agarose support, the enzyme was diluted in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. The enzyme-support suspensions were gently stirred at 4 °C during 48 h.

The immobilization on divinylsulfone-agarose was carried out in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.0, sodium phosphate buffer pH 7.0 or sodium carbonate at pH 9.0 and 10.0, at 4 °C under gentle shaking for 48 h. After immobilization, the immobilized biocatalysts were incubated for 24 h in 1 M EDA solution at pH 10.0 or 1 M glycine at pH 8.0 to block the support. Finally, all biocatalysts prepared were washed with an excess of distilled water and stored at 4 °C until further use.

2.5. Study of the glucose inhibition of different β -glucosidase biocatalysts

Activities were measured in the presence of different glucose concentrations (5.55-222 mmol.L⁻¹) in 0.1 M citrate buffer pH 4.8 to determine the glucose inhibitions of the free and immobilized β -glucosidases. Residual enzyme activity was measured by *p*NPG method, as previously described. The results were expressed as IC₅₀ correlating the glucose concentration that reduces β -glucosidase activity at fifty percent of its initial activity without glucose at pH 4.8.

2.6. Thermal stability of free and immobilized β -glucosidases

The thermal stabilities of the free and immobilized enzymes were assessed by incubating the β -glucosidase in a sodium citrate buffer (100 mM, pH 4.8) at 65 °C. Aliquots were periodically withdrawn for the quantification of the residual enzymatic activities of the soluble enzyme and the suspension of immobilized enzyme to estimate the half-life.

2.7. Operational stability

The operational stability of immobilized β -glucosidases was assayed in subsequent cycles of cellobiose hydrolysis. The reactions were performed using 100 mg of the immobilized enzyme, 1.0 mL of 40 g.L⁻¹ cellobiose in 100 mM sodium citrate at pH 4.8 and 40 °C. After 3 h of reaction, the immobilized enzymes were separated by centrifugation (4,000 g for 5 min and 4 °C), washed 3-times with 100 mM sodium citrate at pH 4.8 and then reused in a new fresh reaction. The reaction was repeated for 10 cycles and degree of hydrolysis in the first reaction was considered as 100 %.

3. Results and Discussion

3.1. β -glucosidases immobilization

The β -glucosidases from Pectinex Ultra SP-L and from Celluclast® 1.5L were initially partially purified and then used for immobilization on DVS-agarose at pH of 5.0, 7.0, 9.0 and 10.0, and then blocked with glycine, glyoxyl-agarose at pH 10.0 and epoxy-agarose at pH 7.0.

The results for immobilization of β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L are presented in Figure 2. As observed, after 48 h, the immobilization yields on DVS-agarose at pH 5 and 7 were very low, whereas at pH 9 the immobilization yield was

around 33 %, and at pH 10 the immobilization yield was 37 %, representing an activity of 0.72 and 0.60 U.g⁻¹, respectively. This relatively low immobilization yields could be attributed to a high glycosylation of the enzyme, which makes the interaction between the enzyme and the support complex. Moreover, as showed by dos Santos et al.²⁷, the increase in the pH increases the reactivity of amino acids present at the enzyme surface, especially Lys, Cys and His with divinyl sulfone groups, which explains the highest immobilization yield at pH 10.

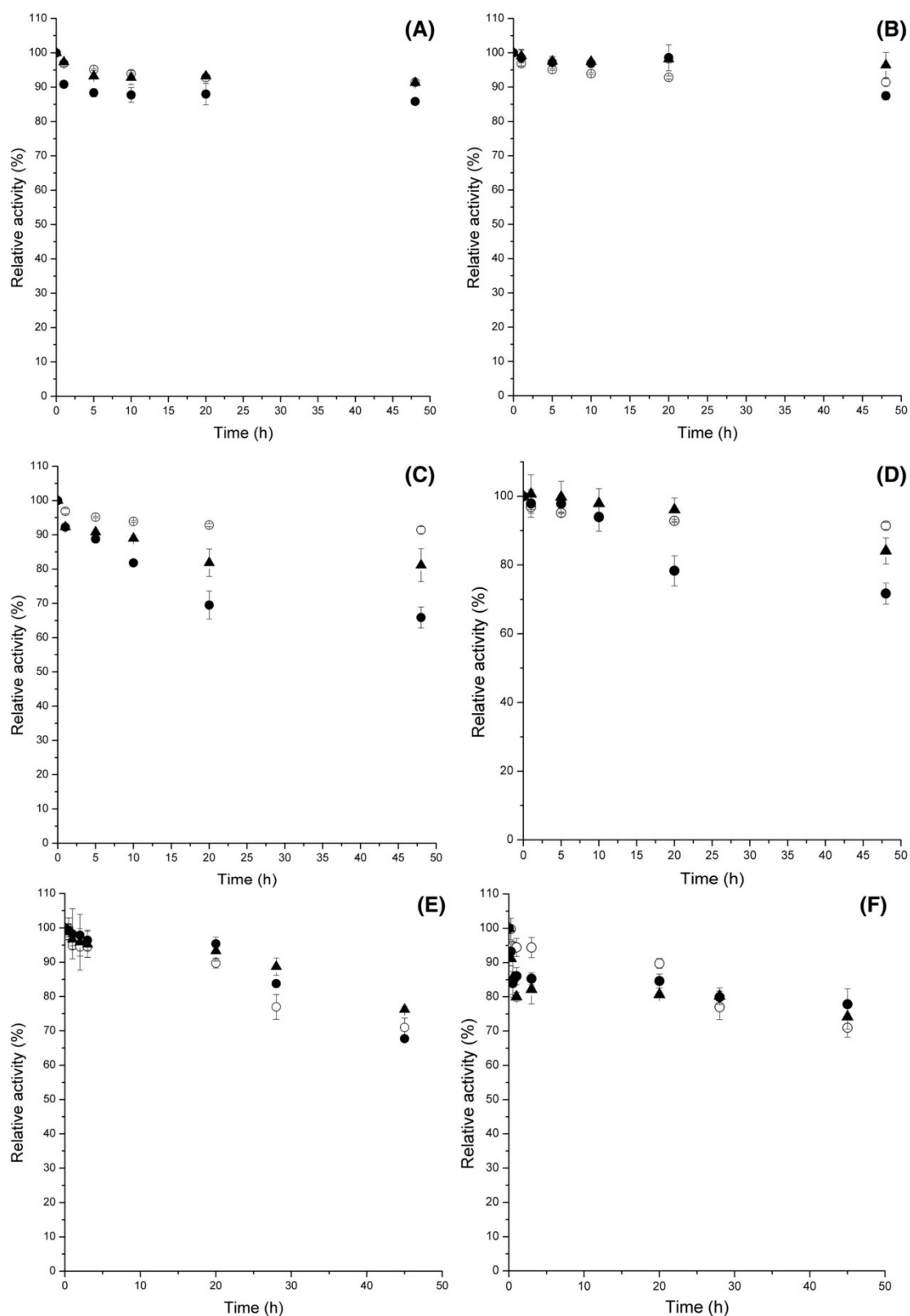


Figure 2. Immobilization course of β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L on DVS-agarose pH 5.0 (a); pH 7.0 (b); pH 9.0 (c); and pH 10 (d); Glyoxyl-agarose (e); and Epoxy-agarose (f). Reference (○); supernatant (●); suspension (▲).

On the other hand, the immobilization yields were lower than 8 % and 4 % using glyoxyl-agarose at pH 10.0 and epoxy-agarose at pH 7.0, respectively. For an epoxy support, this low result can be explained by the fact that the enzyme needs to be directly covalently immobilized on the support, and the previous adsorption of the enzyme could not be achieved using agarose.¹⁸ The low immobilization yield on glyoxyl-agarose suggest that the enzyme might be low on Lys residues in its surface, or that the glycosyl chains make difficult the enzyme reaction with the support.²⁰ This makes vinyl sulfone more suitable groups to immobilize this enzyme because DVS can react with other amino acids than Lys, contrary to glyoxyl.²⁷

Figure 3 shows the immobilization courses of β -glucosidase from Celluclast® 1.5L by the different strategies studied. The enzyme partially-purified was immobilized on DVS-agarose using pH 5.0, 7.0, 9.0, and 10.0 and then blocked with glycine. The immobilization yield on DVS-agarose increased as the pH increase, being 9.9 % at pH 5.0, 11.3 % at pH 7.0, 20.8 % at pH 9.0, and 43 % at pH 10.0 after 48 h of immobilization (Figure 3A-D), and the highest activity was obtained at pH 10, 3.92 U.g⁻¹. These results corroborate the expected reaction property that, as pH increases, so does the reactivity of the enzyme versus the vinylsulfone groups on the support.²⁷ However, the immobilization rate was not high as in other cases,^{42,47} very likely because this enzyme is also very glycosylated.

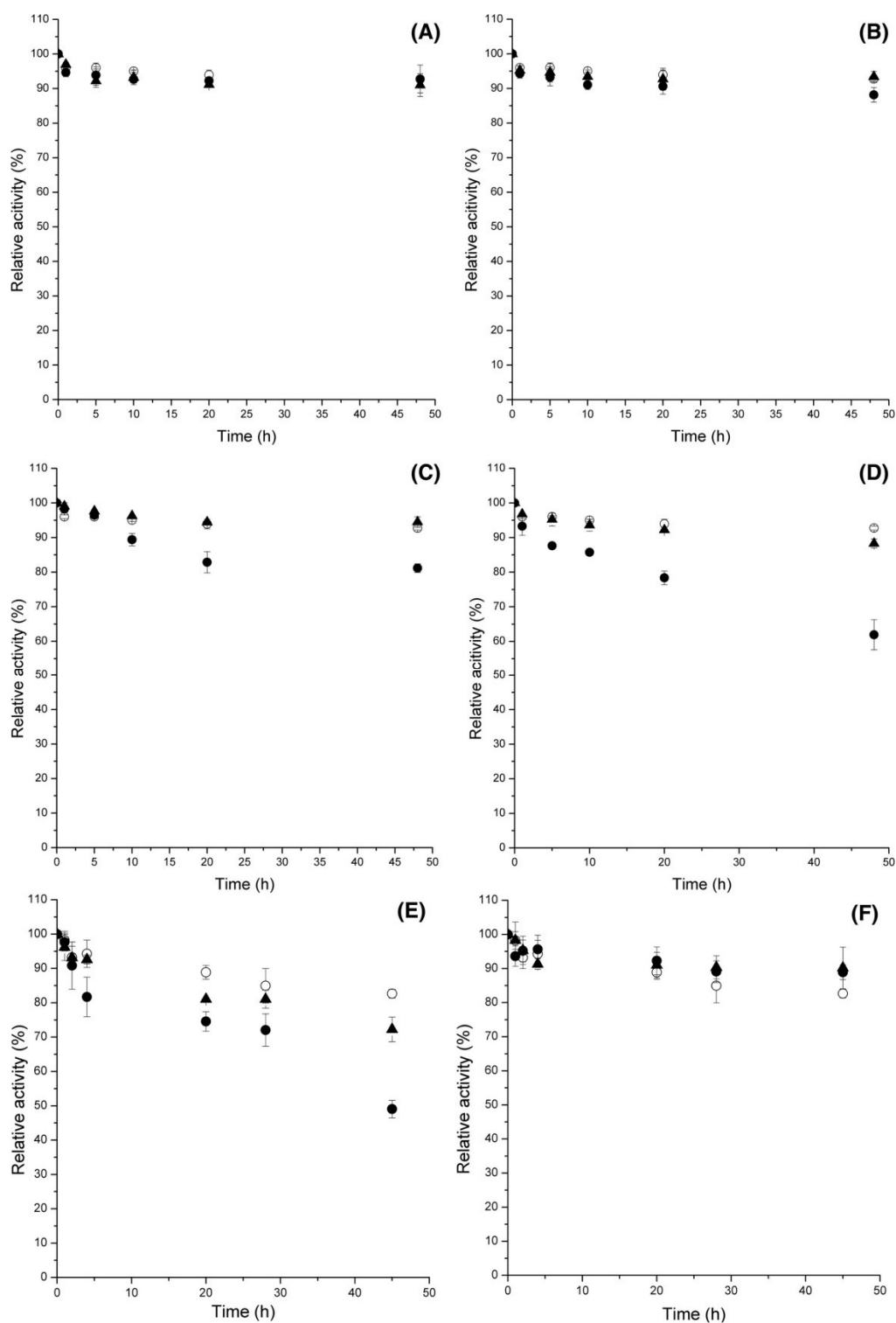


Figure 3. Immobilization course of β -glucosidase from Celluclast® 1.5L on DVS-agarose pH 5.0 (a); pH 7.0 (b); pH 9.0 (c); and pH 10 (d); Glyoxyl-agarose (e); and Epoxy-agarose (f). Reference (\circ); supernatant (\bullet); suspension (\blacktriangle).

β -glucosidase from Celluclast® 1.5L was also immobilized on glyoxyl-agarose reaching an immobilization yield of 49 % (Figure 3E). In contrast with results for β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L, in this case it was possible that an accessible area rich in Lys residues allowed the immobilization on glyoxyl agarose, and maybe this area could be the responsible for immobilization on DVS at pH 10. On the other hand, as observed for Pectinex Ultra SP-L, it was not possible to immobilize the β -glucosidase from Celluclast® 1.5L on epoxy agarose support (Figure 3F), again showing that if the enzyme is not primary adsorbed on the support, the immobilization rate is very slow, although the support can react with the same groups of the enzyme as vinyl sulfone activated supports.¹⁸

Because the good results obtained in the immobilization on DVS-agarose at pH 10.0, we tested the effects of changing the enzyme microenvironment after immobilization using 1 M EDA at pH 10.0 as blocking reagent instead 1 M glycine at pH 8.0. Blocking the support after immobilization is convenient to prevent any undesired enzyme-support reaction. The change in the blocking reagent has been reported to affect enzyme activity and stability.^{28,48-50} In our case, the change of glycine for EDA did not change the enzyme activity. Thus, the derivative blocked with glycine was also tested for glucose inhibition and thermal stability.

3.2. Inhibition by glucose

Different immobilizations protocols have occasionally reduced enzyme inhibition by reaction products.^{51,52} Thus, the effect of glucose on the activity of free and immobilized enzymes using different glucose concentrations (ranging from 5.55 to 222 mmol.L⁻¹) was evaluated. The results are presented as IC₅₀ correlating the glucose concentration that reduces enzyme activity by one-half of its activity without

glucose at pH 4.8. β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L showed that glucose tolerance increased after immobilization of the enzyme onto DVS-agarose at pH 10 compared to immobilization at pH 9. Thus, the concentration of inhibitor required to decrease the activity by 50 % of the enzyme immobilized on DVS-agarose at pH 10 and then blocked with glycine was 2.4-fold higher in comparison to the concentration required if the enzyme was immobilized at pH 9. This may be explained by different orientation of the enzyme when immobilized at pH 9 or 10, or possibly by different distortion of the enzyme structure. When immobilized on DVS-agarose at pH 10 and then blocked with EDA, the concentration of glucose required was 1.25-fold higher to reduce the enzyme activity to 50 % compared to the same preparation blocked with glycine, and 1.7-fold higher than using the free enzyme. Therefore, the blocking agent influenced the inhibition caused by glucose, even when the catalysts had the same rigidity and orientation, just by altering the enzyme microenvironment and the enzyme-support interactions.

Using Celluclast® 1.5L, the immobilization on DVS-agarose at pH 9 or at pH 10 blocked with EDA presented similar activity inhibition as the free enzyme. However, when the enzyme was immobilized at pH 10 and blocked with glycine, the concentration of glucose required to reduce 50 % the enzyme activity, increased by a factor of 2. Thus, the immobilization pH, influencing the orientation or the distortion of the enzyme molecule and the blocking agent, which influences the enzyme environment and enzyme-support interactions, reduced enzyme inhibition. It should be noted that the best results for Celluclast® 1.5L were obtained using the blocking agent that produced the lowest results using Pectinex Ultra SP-L, suggesting that changes in the glucose or substrate concentrations were not the responsible for the changes in

the inhibition. Immobilization on glyoxyl-agarose also reduced enzyme inhibition by glucose, doubling its concentration to reduce the enzyme activity by 50 % (Table 1).

Table 1. Effect of glucose concentration on the activities of β -glucosidases free and immobilized from Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L.

Biocatalyst	IC ₅₀ * (mmol.L ⁻¹)
β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L	
Free enzyme	45.4
Immobilized on DVS-agarose pH 9 blocked with Gly	26.0
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with Gly	62.2
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with EDA	77.4
β -glucosidase from Celluclast® 1.5L	
Free enzyme	28.5
Immobilized on DVS-agarose pH 9 blocked with Gly	33.9
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with Gly	50.5
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with EDA	26.2
Glyoxyl-agarose	56.1

IC₅₀ is the value of glucose concentration that decreases by fifty percent the β -glucosidase activity in absence of glucose.

3.3. Thermal stability

Table 2 shows the thermal inactivation parameters of soluble and differently immobilized forms of β -glucosidases of Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L at 65 °C. The best stability results for β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L were found when the biocatalyst was immobilized on DVS-agarose at pH 10, blocked with EDA or glycine, showing stabilization factors of 13.6 and 7.3 compared to the free form, respectively. It is interesting to note that it seems more relevant for the enzyme stability

the blocking reagent than the immobilization pH, because the derivative immobilized at pH 9 blocked with glycine showed similar thermal stability than the immobilized at pH 10, also blocked with glycine. This behavior was also observed for the immobilization of trypsin on DVS-agarose, where the derivative blocked with EDA presented better thermal stability than the ones blocked with β -mercaptoethanol or glycine²⁸.

Table 2. Parameters of deactivation models purified and immobilized β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L and Celluclast® 1.5L at 65 °C.

Biocatalyst	k (h ⁻¹)*	t _{1/2} (h)*	SF*
β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L			
Free enzyme	15.19	0.007	-
Immobilized on DVS-agarose pH 9 blocked with Gly	15.59	0.046	6.6
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with Gly	12.67	0.051	7.3
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with EDA	5.44	0.095	13.6
β -glucosidase from Celluclast® 1.5L			
Free enzyme	1.80	0.25	-
Immobilized on DVS-agarose pH 9 blocked with Gly	0.32	1.94	7.76
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with Gly	0.67	0.73	2.92
Immobilized on DVS-agarose pH 10 blocked with EDA	1.62	0.43	1.72
Glyoxyl-agarose	0.89	0.66	2.64

* k: first order inactivation constant; t_{1/2}: half-life; SF: stabilization factor

The thermal stability of the soluble and the immobilized β -glucosidase of Celluclast® 1.5L on different supports showed that the biocatalyst immobilized on DVS-agarose pH 9 was approximately 8-times more stable than the soluble enzyme. On the other hand, for this enzyme, the effect of blocking agent on enzyme stability was not observed because the stability of the derivatives immobilized at pH 10 and then blocked with either EDA or glycine were similar. Nevertheless, the enzyme

orientation in the immobilization was crucial for the enzyme stability. The three immobilized enzymes at pH 10 (two on DVS-agarose and the glyoxyl-agarose) presented lower stabilities than the derivatives immobilized at pH 9.

Thus, the β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L immobilized on DVS-agarose at pH 10 and blocked with EDA and the β -glucosidase from Celluclast® 1.5L immobilized on DVS-agarose at pH 9 and block with EDA were tested for cellobiose hydrolysis in repeated batches.

3.4. Operational stabilities

The biocatalysts presenting the highest thermal stability for each enzyme were tested in repeated batch reactions using cellobiose as substrate at pH 4.8 and 40 °C. As shown in Figure 4, the immobilized Pectinex Ultra SP-L β -glucosidase on DVS-agarose immobilized at pH 10 and blocked with EDA kept around 67 % of its initial activity after 10 batches. The Celluclast® 1.5L β -glucosidase maintained approximately 76 % of residual activity after 10 batches when immobilized on DVS-agarose pH 9 and blocked with glycine.

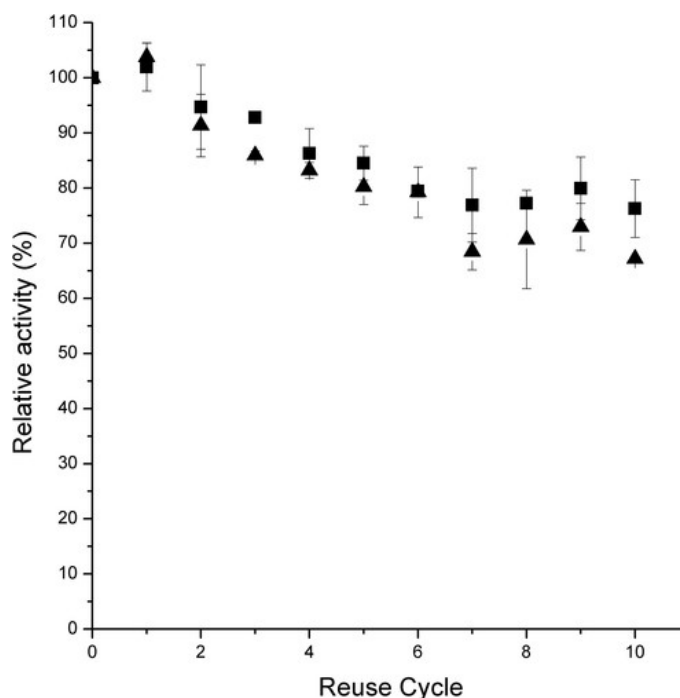


Figure 4. Repeated hydrolysis of cellobiose of β -glucosidase from Pectinex Ultra SP-L immobilized on DVS-agarose immobilization pH 10 blocked with EDA (▲) and from Celluclast® 1.5L on DVS-agarose immobilization pH 9 blocked with glycine (■).

4. Conclusions

We obtained the immobilization of β -glucosidases on divinyl sulfone supports, being this the first report on the literature. Two different β -glucosidases were partially purified and immobilized on DVS-agarose at four different pH values and compared to the largely used glyoxyl-agarose and epoxy-agarose. The immobilization pH was very important for immobilization yields. Higher pH values increase the reactivity of amino acids of enzyme surface with vinyl sulfone. The change in the immobilization pH also affected the enzyme stability and glucose tolerance, probably by changing the enzyme orientation on the support surface. The reaction microenvironment promoted by the blocking reagent affected the glucose tolerance of the β -glucosidase of Celluclast® 1.5L, where the derivative blocked with glycine was twice as more resistant to glucose than the one blocked with EDA. Finally, both β -glucosidases could be reused for at least 10 batches for cellobiose hydrolysis, keeping around 70 % of their initial activities.

Acknowledgments

This work was supported by scholarships (D. Andrades from CNPq; N. Graebin, from CAPES), and grants from CNPq (process 403505/2013-5) and FAPERGS (process 17/2551-0000939-8) from Brazil and from the MINECO from Spanish Government, (project number CTQ2017-86170-R).

References

1. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6223-6235. doi:10.1039/c3cs60075k.
2. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-lorente G, Guisan JM, Fernandez-lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(6):1451-1463. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
3. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6290-6307. doi:10.1039/C2CS35231A.
4. Iyer P V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 2008;43(10):1019-1032. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.004.
5. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv.* 2015;33(5):435-456. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.006.

6. Bilal M, Cui J, Iqbal HMN. Tailoring enzyme microenvironment: State-of-the-art strategy to fulfill the quest for efficient bio-catalysis. *Int J Biol Macromol.* 2019;130:186-196. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.02.141.
7. Bilal M, Asgher M, Cheng H, Yan Y, Iqbal HMN. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Crit Rev Biotechnol.* 2019;39(2):202-219. doi:10.1080/07388551.2018.1531822.
8. Bilal M, Rasheed T, Zhao Y, Iqbal HMN, Cui J. "Smart" chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *Int J Biol Macromol.* 2018;119:278-290. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.134.
9. Virgen-Ortíz JJ, dos Santos JCS, Berenguer-Murcia Á, Barbosa O, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. *J Mater Chem B.* 2017;5(36):7461-7490. doi:10.1039/C7TB01639E.
10. Rueda N, dos Santos JCS, Ortiz C, Torres R, Barbosa O, Rodrigues RC, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Chem Rec.* 2016;16(3):1436-1455. doi:10.1002/tcr.201600007.
11. Rodrigues RC, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernandez-Lafuente R. Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: coupling genetic modification and physicochemical tools. *RSC Adv.* 2014;4(72):38350-38374. doi:10.1039/C4RA04625K.
12. Rodrigues RC, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of

- Enzymes. *Adv Synth Catal.* 2011;353(13):2216-2238. doi:10.1002/adsc.201100163.
13. Cowan DA, Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb Technol.* 2011;49(4):326-346. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.06.023.
 14. Hernandez K, Fernandez-Lafuente R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb Technol.* 2011;48(2):107-122. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.10.003.
 15. dos Santos JCS, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem.* 2015;7(16):2413-2432. doi:10.1002/cctc.201500310.
 16. Zucca P, Fernandez-Lafuente R, Sanjust E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules.* 2016;21(11):1577. doi:10.3390/molecules21111577.
 17. Pedroche J, del Mar Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Guisán JM, Millán F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(5):1160-1166. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.08.023.
 18. Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme

- Properties. *Biomacromolecules*. 2013;14(8):2433-2462.
doi:10.1021/bm400762h.
19. Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Grazu V, Pessela BCC, Giacomini C, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista-Viera F, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37(4):456-462.
 20. Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F, Pessela BCC, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol*. 2006;39(2):274-280.
 21. H. Orrego A, Romero-Fernández M, Millán-Linares M, Yust M, Guisán J, Rocha-Martin J. Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Aldehyde-Supports: 2-Picoline Borane as an Alternative Reducing Agent. *Catalysts*. 2018;8(8):333. doi:10.3390/catal8080333.
 22. Turková J, Bláha K, Malaníková M, Vančurová D, Švec F, Kálal J. Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3–12. *Biochim Biophys Acta - Enzymol*. 1978;524(1):162-169. doi:10.1016/0005-2744(78)90114-6.
 23. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B Enzym*. 2000;10(1-3):157-176. doi:10.1016/S1381-1177(00)00124-7.
 24. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by

- favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26(7):509-515. doi:10.1016/S0141-0229(99)00188-X.
25. Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente G, Pedroche J, Fernández-Lafuente R, Guisan JMM, Tam A, Daminati M. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol Prog.* 2002;18(3):629-634. doi:10.1021/bp010171n.
26. Grazú V, López-Gallego F, Montes T, Abian O, González R, Hermoso JA, García JL, Mateo C, Guisán JM. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. *Process Biochem.* 2010;45(3):390-398. doi:10.1016/j.procbio.2009.10.013.
27. dos Santos JCS, Rueda N, Barbosa O, Fernández-Sánchez JF, Medina-Castillo AL, Ramón-Márquez T, Arias-Martos MC, Millán-Linares MC, Pedroche J, Yust M del M, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. *RSC Adv.* 2015;5(27):20639-20649. doi:10.1039/C4RA16926C.
28. dos Santos JCS, Rueda N, Barbosa O, Millán-Linares M del C, Pedroche J, del Mar Yuste M, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. *J Mol Catal B Enzym.* 2015;117:38-44. doi:10.1016/j.molcatb.2015.04.008.
29. Lopez-Jaramillo FJ, Ortega-Muñoz M, Megia-Fernandez A, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F. Vinyl Sulfone Functionalization: A Feasible Approach for the Study of the Lectin–Carbohydrate Interactions. *Bioconjug Chem.* 2012;23(4):846-855. doi:10.1021/bc200681c.

30. Prikryl P, Lenfeld J, Horak D, Ticha M, Kucerova Z. Magnetic bead cellulose as a suitable support for immobilization of α -chymotrypsin. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168(2):295-305. doi:10.1007/s12010-012-9772-y.
31. Ortega-Muñoz M, Morales-Sanfrutos J, Megia-Fernandez A, Lopez-Jaramillo FJ, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F. Vinyl sulfone functionalized silica: a “ready to use” pre-activated material for immobilization of biomolecules. *J Mater Chem*. 2010;20(34):7189-7196. doi:10.1039/C0JM00720J.
32. Medina-Castillo AL, Morales-Sanfrutos J, Megia-Fernandez A, Fernandez-Sanchez JF, Santoyo-Gonzalez F, Fernandez-Gutierrez A. Novel synthetic route for covalent coupling of biomolecules on super-paramagnetic hybrid nanoparticles. *J Polym Sci Part A Polym Chem*. 2012;50(19):3944-3953. doi:10.1002/pola.26203.
33. Labus K, Turek A, Liesiene J, Bryjak J. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. *Biochem Eng J*. 2011;56(3):232-240. doi:10.1016/j.bej.2011.07.003.
34. Bryjak J, Liesiene J, Kolarz BNN. Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;61(1):66-74. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.07.006.
35. Bale Oenick MD, Danielson SJ, Daiss JL, Sunderberg MW, Sutton RC. Antigen-binding activity of antibodies immobilized on styrene copolymer beads. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1990;48(9):651-654.
36. Morales-Sanfrutos J, Lopez-Jaramillo J, Ortega-Muñoz M, Megia-Fernandez A, Perez-Balderas F, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F. Vinyl sulfone: A

- versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Org Biomol Chem.* 2010;8(3):667-675. doi:10.1039/b920576d.
37. Chang F, Xue S, Xie X, Fang W, Fang Z, Xiao Y. Carbohydrate-binding module assisted purification and immobilization of β -glucosidase onto cellulose and application in hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *J Biosci Bioeng.* 2018;125(2):185-191. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.09.001.
38. Fusco FA, Fiorentino G, Pedone E, Contursi P, Bartolucci S, Limauro D. Biochemical characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*. *Int J Biol Macromol.* 2018;113:783-791. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.018.
39. Agrawal R, Verma AK, Satlewal A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable β -glucosidase for improving the sugarcane juice properties. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016;33(Complete):472-482. doi:10.1016/j.ifset.2015.11.024.
40. Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K. Characterization of a Novel β -Glucosidase from a Compost Microbial Metagenome with Strong Transglycosylation Activity. *J Biol Chem.* 2013;288(25):18325-18334. doi:10.1074/jbc.M113.471342.
41. Andrades D de, Graebin NG, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Physico-chemical properties, kinetic parameters, and glucose inhibition of several beta-glucosidases for industrial applications. *Process Biochem.* 2019;78:82-90. doi:10.1016/j.procbio.2019.01.008.
42. de Andrades D, Graebin NG, Kadowaki MK, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme. *Int J Biol Macromol.* 2019;129:672-678. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057.

43. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
44. Guisán JM. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 1988;10(6):375-382. doi:10.1016/0141-0229(88)90018-X.
45. da Silva RM, Paiva Souza PM, Fernandes FAN, Gonçalves LRB, Rodrigues S. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in epoxy-agarose- tailoring oligosaccharides synthesis. *Process Biochem.* 2019;78:71-81. doi:10.1016/j.procbio.2019.01.009.
46. Beppu MM, Arruda EJ, Vieira RS, Santos NN. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. *J Memb Sci.* 2004;240(1-2):227-235. doi:10.1016/j.memsci.2004.04.025.
47. Vazquez-Ortega PG, Alcaraz-Fructuoso MT, Rojas-Contreras JA, López-Miranda J, Fernandez-Lafuente R. Stabilization of dimeric β -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. *Enzyme Microb Technol.* 2018;110:38-45. doi:10.1016/j.enzmictec.2017.12.007.
48. Albuquerque TL d., Rueda N, dos Santos JCS, Barbosa O, Ortiz C, Binay B, Özdemir E, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochem.* 2016;51(7):865-874. doi:10.1016/j.procbio.2016.04.002.
49. dos Santos JCS, Rueda N, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by

altering its nanoenvironment. *Enzyme Microb Technol.* 2015;77:1-7. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.05.001.

50. dos Santos JCS, Rueda N, Sanchez A, Villalonga R, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. *RSC Adv.* 2015;5(45):35801-35810. doi:10.1039/C5RA03798K.
51. Mateo C, Monti R, Pessela BCC, Fuentes M, Torres R, Manuel Guisán J, Fernández-Lafuente R. Immobilization of Lactase from *Kluyveromyces lactis* Greatly Reduces the Inhibition Promoted by Glucose. Full Hydrolysis of Lactose in Milk. *Biotechnol Prog.* 2004;20(4):1259-1262. doi:10.1021/bp049957m.
52. Figueira JA, Sato HH, Fernandes P. Establishing the Feasibility of Using β -Glucosidase Entrapped in Lentikats and in Sol–Gel Supports for Cellobiose Hydrolysis. *J Agric Food Chem.* 2013;61(3):626-634. doi:10.1021/jf304594s.

5.4. Resultados não apresentados na forma de artigo

5.4.1. Aplicação no suco de uva e vinho tinto

A β -glicosidase é uma das enzimas responsáveis pela degradação das antocianinas, grupo de compostos fenólicos responsáveis pela coloração vermelha, azul e violeta de muitas frutas, vegetais e flores (Marszałek et al., 2017). Este composto é o principal pigmento das uvas tintas e seus derivados como o suco e o vinho tinto (Behrens et al., 2018). Sendo assim, a atividade de hidrólise das antocianinas (antocianase) pela β -glicosidase nos sucos e vinhos tintos pode acarretar perda da sua coloração. Diante disso, as β -glicosidases de Pectinex Ultra SP-L, e Pectinex Ultra Clear imobilizadas em MANAE, MANAE-Glutaraldeído (MANAE-Glu) e MANAE-Enzima-Glutaraldeído (MANAE-E-Glu), e a β -glicosidase de Celluclast® 1.5L imobilizada em glioxil-agarose e divinilsulfona-agarose (DVS) foram aplicadas na hidrólise de antocianinas, e conseqüentemente, remoção de cor do suco de uva e do vinho tinto.

A diminuição na absorbância das amostras demonstrou que os biocatalisadores de Pectinex Ultra SP-L imobilizado em MANAE-glutaraldeído e MANAE com posterior reticulação com glutaraldeído apresentaram a maior capacidade de hidrólise de antocianinas. Nestes suportes a enzima alcançou 91,6 % e 92,3 % de descoloração, após 4 horas de reação, no suco de uva (Figura 6A), e 97,8 % e 95,5 % no suco de uva diluído (Figura 6B), respectivamente. Estes mesmos biocatalisadores também apresentaram 70,8 % e 74,8 % de descoloração no vinho tinto (Figura 7A), após 6 horas de reação, e 93,5 % e 89,9 % no vinho tinto diluído (Figura 7B), respectivamente. As β -glicosidases com alta atividade de hidrólise de antocianinas são uma eficiente ferramenta na produção de vinhos brancos com coloração vermelha reduzida ou na produção de vinhos roses a partir de uvas tintas, onde o processo de maceração pode ser prolongado e o excesso de cor removido por tratamento enzimático (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998; Palmeri & Spagna, 2007; Medina et al., 2019; Monteiro et al., 2019)

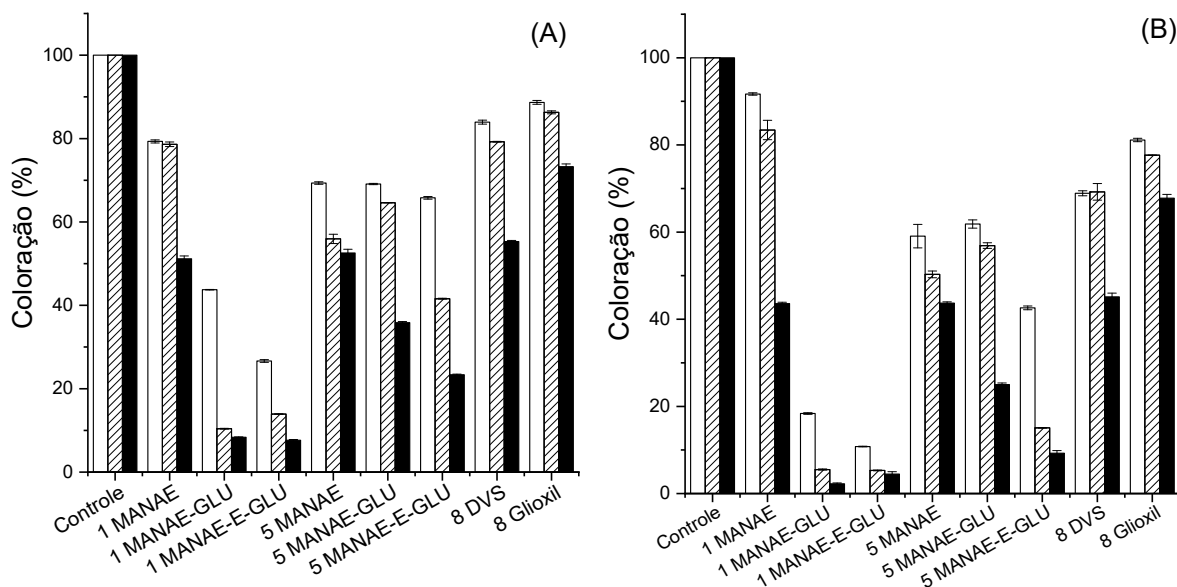


Figura 6. Redução de cor do suco de uva (A), e suco de uva diluído (1:1) (B), nos tempos de 1 h (coluna branca), 2 h (coluna riscada) e 4 h (coluna preta) mantidas sob agitação a 60 °C. O controle corresponde ao suco incubado nas mesmas condições da reação na ausência dos derivados. β -glicosidase de Pectinex Ultra SP-L representada pelo número 1, β -glicosidase de Pectinex Ultra Clear pelo número 5, e β -glicosidase de Celluclast® 1.5L pelo número 8.

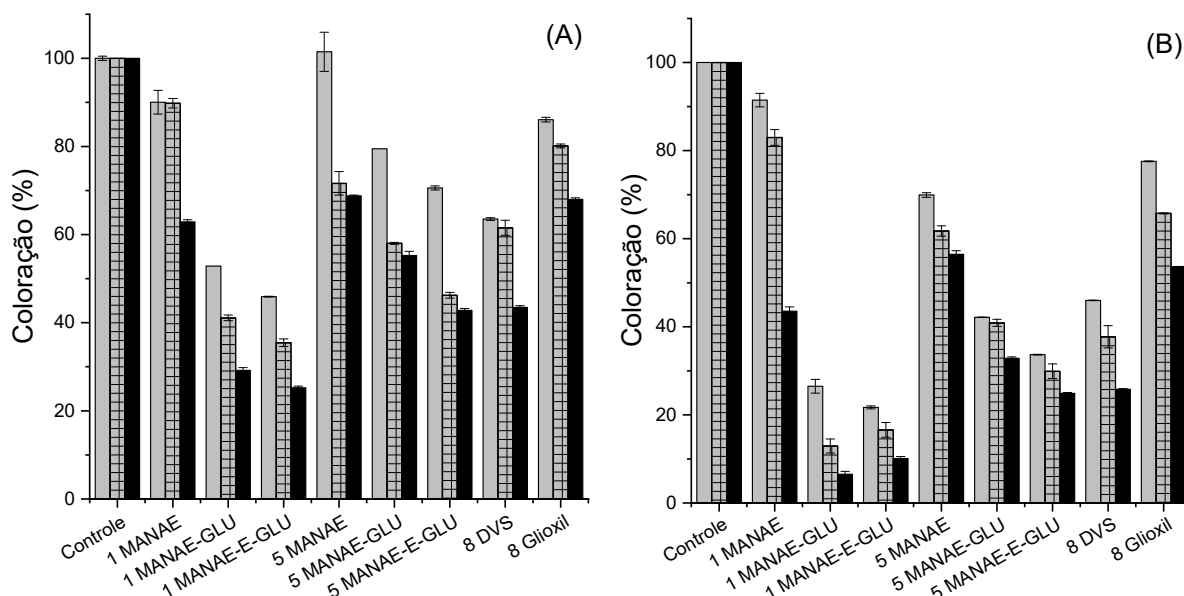


Figura 7. Redução de cor do vinho tinto (A), e vinho tinto diluído (1:1) (B), nos tempos de 2 h (coluna cinza), 4 h (coluna riscada) e 6 h (coluna preta) mantidas sob agitação a 60 °C. O controle corresponde ao vinho incubado nas mesmas condições da reação na ausência dos derivados. β -glicosidase de Pectinex Ultra SP-L representada pelo número 1, β -glicosidase de Pectinex Ultra Clear pelo número 5, e β -glicosidase de Celluclast® 1.5L pelo número 8.

Os demais biocatalisadores estudados apresentaram menor descoloração do suco e do vinho. Os melhores resultados foram obtidos com a β -glicosidase de Pectinex Ultra Clear imobilizada em MANAE-agarose e a β -glicosidase de Celluclast® 1.5L imobilizada em glioxil-agarose. Na presença destes biocatalisadores, o suco de uva manteve 52,6 % e 73,3 % da coloração inicial, após 4 horas de reação (Figura 6A), e 43,7 % e 67,8 % no suco de uva diluído (Figura 6B), respectivamente. Além disso, também mantiveram 68,8 % e 68,0 % da cor inicial do vinho tinto (Figura 7A), após 6 horas de reação, e 56,5 % e 53,6 % no vinho tinto diluído (Figura 7B), respectivamente. Quando utilizadas para o aumento do aroma, melhorando a extração de cor e sabor é desejável que as β -glicosidases não causem a perda da coloração da uva tinta para sua efetiva aplicação nestas bebidas (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998; Monteiro et al., 2019).

6. DISCUSSÃO GERAL

A presente Tese de Doutorado teve como principal objetivo desenvolver biocatalisadores imobilizados com atividade de β -glicosidase para aplicação em bebidas à base de uva. Primeiramente, investigou-se a possibilidade de atividade de β -glicosidase em nove diferentes preparados enzimáticos. Os preparados estudados são comercializados para uso na produção de sucos e vinhos com o intuito de melhorar a qualidade da bebida, reduzindo a viscosidade, aumentando a extração do suco e melhorando os processos de prensagem e clarificação (Dal Magro et al., 2016). Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Color e Pectinex Ultra Clear são comercializados pela Novozymes como preparações pectinolíticas, com atividade declarada de poligalacturonase, enquanto Pectinex Smash XXL tem atividade declarada de pectina liase. Por outro lado, a Lallzyme Beta pode ser destacada por sua alta atividade secundária de β -glicosidase, e foi especialmente desenvolvida para melhorar o perfil aromático do vinho, uma vez que esta enzima é capaz de hidrolisar os compostos aromáticos glicosilados (Villena et al., 2007; Dal Magro et al., 2016). As demais preparações comerciais estudadas não possuem atividade específica declarada. Entretanto, os trabalhos em nosso grupo de pesquisa demonstraram que, todas as preparações estudadas, são uma mistura de diferentes enzimas e apresentaram atividade de β -glicosidase. Assim, o conhecimento das diferentes atividades exatas

contidos nestes preparados são uma informação importante para fazer a escolha certa para a indústria (Dal Magro et al., 2016b, 2016a).

Em seguida, os efeitos do pH sobre a atividade hidrolítica, a tolerância à glicose, os parâmetros cinéticos e a estabilidade frente à temperatura, das nove diferentes preparações comerciais foram estudadas.

Neste estudo a tolerância à glicose e a estabilidade térmica foram testados em diferentes pHs (3,0, 4,8 e 7,0). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que cada preparação enzimática apresenta uma tolerância à glicose bastante diferente dependendo do pH. A β -glicosidase de Pectinex Ultra SP-L apresentou a maior tolerância à glicose em pH 3,0, sugerindo seu uso promissor na indústria de vinhos e sucos. Celluclast® 1,5 L também demonstrou boa tolerância à glicose em pH 3,0, bem como baixo valor K_M . A β -glicosidase de Pectinex Smash XXL manteve 50 % de sua atividade na presença de glicose, quando em pH 7,0, sugerindo seu uso em aplicações biotecnológicas que utilizem um pH neutro, como na indústria farmacêutica e cosmética.

Após estes resultados, três das nove preparações foram selecionadas para os estudos de imobilização com base principalmente nos dados de atividade de β -glicosidase e tolerância à glicose. Sendo elas, as preparações comerciais Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Clear e Celluclast® 1.5L. Além delas, a cepa de *Aspergillus niger* URM 6642, isolada do bioma Mata Atlântica, do acervo do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Cascavel, Brasil) gentilmente doada pela Prof^a Dr^a Marina K. Kadowaki, também foi selecionada. A β -glicosidase produzida por esta cepa também apresentou promissora tolerância à glicose, bem como a outros produtos da fermentação da biomassa lignocelulósica.

Os experimentos de imobilização foram realizados com as quatro β -glicosidasas selecionadas em cinco diferentes suportes: MANAE, MANAE-glutaraldeído, glioxil-agarose, divinilsulfona-agarose e epóxi-agarose.

O estudo das enzimas que foram capazes de se imobilizarem em MANAE e MANAE-glutaraldeído (Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra Clear e *A. niger* URM 6642) foram aprofundados. Para isso as enzimas foram imobilizadas no suporte MANAE-agarose em pH 5, 7 e 9. O pH da imobilização foi alterado para permitir diferentes orientações das moléculas da enzima na superfície do suporte. Estas preparações também foram estudadas por modificação pós-imobilização com glutaraldeído, denominados de MANAE-enzima-glutaraldeído. A caracterização dos

biocatalisadores, em relação as estabilidades térmicas, a tolerância à inibição da glicose e a estabilidade operacional em reações de hidrólise de celobiose repetidas foram estudadas. As enzimas apresentaram rendimentos de imobilização e atividade recuperada, em sua maioria, de 90 % e 70 %, respectivamente. Os resultados obtidos com a imobilização do biocatalisador de *A. niger* merecem destaque. A enzima imobilizada em MANAE-agarose a pH 9,0 com posterior tratamento com glutaraldeído manteve 82 % de sua atividade após 12 ciclos de reuso. Além disso, apresentou uma meia-vida de mais de 3000 horas a 60 °C.

Além disso, também foi realizado um estudo das enzimas que foram capazes de se imobilizarem em glioxil-agarose e divinilsulfona-agarose (Pectinex Ultra SP-L e Celluclast® 1.5L). A imobilização em DVS-agarose também foi realizada em pH 5, 7, 9 e 10 para permitir diferentes orientações das moléculas da enzima na superfície do suporte. Este trabalho apresentou o primeiro relato na literatura, da imobilização de β -glicosidases em suportes de DVS-agarose. Após a imobilização, os melhores biocatalisadores imobilizados foram incubados em 2 diferentes soluções de bloqueio, a fim de estudar a sua influência no biocatalisador final, solução de EDA 1 M a pH 10,0 ou glicina 1 M a pH 8,0. As estabilidades térmicas, tolerância à glicose e estabilidade operacional dos diferentes biocatalisadores imobilizados em reações de hidrólise de celobiose também foram testadas. Através dos resultados obtidos foi possível verificar que o pH de imobilização foi muito importante para o rendimento da imobilização em DVS-agarose, pois o rendimento de imobilização dos dois biocatalisadores testados aumentou com o aumento do pH. Conforme demonstrado por dos Santos et al. (2015b) o aumento do pH aumenta a reatividade dos aminoácidos presentes na superfície da enzima, principalmente Lys, Cys e His com os grupos DVS, o que explica o maior rendimento de imobilização em pH 10.

Em relação à estabilidade térmica, o biocatalisador de Celluclast® 1,5L foi aproximadamente 14 vezes mais estável que a enzima livre, quando imobilizado em pH 10, e bloqueado com EDA. Para esta enzima, o agente bloqueador parece ter mais efeito na estabilidade térmica do que o pH de imobilização, pois quando imobilizado em glicina, tanto em pH 9 quanto em 10, foi aproximadamente 7 vezes mais estável que a enzima livre. Para a β -glicosidase de Celluclast® 1,5L o efeito do agente bloqueador na estabilidade da enzima não foi observado, porque a estabilidade dos derivados imobilizados em pH 10 e então bloqueados com EDA ou glicina eram semelhantes. As três enzimas imobilizadas em pH 10 (duas em DVS-agarose e a

glioxil-agarose) apresentaram estabilidades menores do que os derivados imobilizados em pH 9. Além disso, ambas as β -glicosidases foram reutilizadas por pelo menos 10 lotes para hidrólise da celobiose, mantendo em torno de 70% de suas atividades iniciais.

A presente pesquisa foi contemplada com um período sanduíche no *Laboratorio de Ingeniería de Biocatalizadores y Biotransformaciones*, do *Instituto de Catálisis y Petroleoquímica* do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, em Madrid, Espanha, sob a coordenação do Prof. Roberto Fernandez-Lafuente. Infelizmente, o trabalho foi severamente afetado pela pandemia de COVID-19, acometido pelo maior período de confinamento da Pandemia na cidade de Madrid, Espanha. O acesso aos laboratórios ficou restrito, e posteriormente ocorrendo em turnos. Este fato impossibilitou a realização dos experimentos previamente determinados pelo cronograma, principalmente por grande parte deles necessitarem de colaborações com outros laboratórios da universidade. Em contrapartida, outros importantes estudos que agregam a formação científica na área da Biocatálise foram realizados em colaboração com os membros do grupo de pesquisa do Prof^o Roberto, uma das referências mundiais na área de imobilização de enzimas. Dentre estes experimentos podemos citar: o efeito de diferentes compostos alifáticos contendo um grupo amina na imobilização de enzimas, o efeito do glicerol e do tampão TRIS na intensidade da ligação covalente multipontual em diferentes enzimas, dentre elas, a β -glicosidase. Os resultados destes estudos propiciaram a publicação de quatro artigos científicos, em periódicos internacionais, que se encontram registrados no apêndice desta tese.

Por fim, avaliando todas as metodologias de imobilização testadas, bem como as características dos biocatalisadores obtidos, as β -glicosidases imobilizadas foram aplicadas na hidrólise de antocianinas do suco de uva e suco de uva diluído (1:1), e do vinho tinto e vinho tinto diluído (1:1) por determinação do nível de descoloração destas bebidas. Os resultados demonstraram que, abundantes, e sobretudo diversas, possibilidades foram encontradas para a aplicação das enzimas estudadas neste trabalho.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que os objetivos propostos de desenvolver biocatalisadores imobilizados com atividade de β -glicosidase capazes de serem aplicados em bebidas à base de uva, foram atingidos. Os resultados contribuem para uma escolha mais econômica e eficiente da melhor enzima ou preparo comercial para aplicações específicas. As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

- De maneira geral, as preparações comerciais estudadas podem ser fontes alternativas de atividade da β -glicosidase apresentando diferentes concentrações da enzima e tolerância à glicose. A modificação do pH do meio reacional afetou consideravelmente a inibição da atividade enzimática e sua termoestabilidade, dependendo das características estruturais da enzima e de suas particularidades.
- Foi possível demonstrar a versatilidade do reagente bifuncional glutaraldeído para imobilização de enzimas, e perceber que o protocolo “ótimo” para imobilização das enzimas depende fortemente de suas propriedades. Uma vez que, os biocatalisadores apresentaram as melhores estabilidades em protocolos diferentes.
- Obteve-se o primeiro relato na literatura, da imobilização de β -glicosidases em suportes de DVS. Os valores de pH mais altos aumentaram a reatividade dos aminoácidos da superfície das enzimas testadas neste suporte de imobilização.
- A mudança no pH de imobilização também afetou a estabilidade da enzima e a tolerância à glicose, provavelmente por alterar a orientação da enzima na superfície do suporte.
- Os biocatalisadores que apresentaram a maior remoção de cor foram observados com a β -glicosidase de Pectinex Ultra SP-L imobilizada em MANAE-glutaraldeído e MANAE com posterior reticulação com glutaraldeído. Em contrapartida, a β -glicosidase de Pectinex Ultra Clear imobilizada em MANAE-agarose e a β -glicosidase de Celluclast® 1.5L imobilizada em glioxil-agarose obtiveram baixa descoloração, e, portanto, são promissores na aplicação em bebidas à base de uvas tintas.

8. REFERÊNCIAS

- Agrawal R., Verma A. K., Satlewal A. 2016. Application of nanoparticle-immobilized thermostable β -glucosidase for improving the sugarcane juice properties. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33: 472–482.
- Ahmed A., Nasim F., Batool K., Bibi A. 2017. Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 5: 31–46.
- de Araújo Padilha C. E., da Costa Nogueira C., de Santana Souza D. F., de Oliveira J. A., dos Santos E. S. 2020. Organosolv lignin/ Fe_3O_4 nanoparticles applied as a β -glucosidase immobilization support and adsorbent for textile dye removal. *Ind. Crops Prod.* 146: 112167.
- Asgher M., Shahid M., Kamal S., Iqbal H. M. N. 2014. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101: 56–66.
- Badieyan S., Bevan D. R., Zhang C. 2012. Probing the Active Site Chemistry of β -Glucosidases along the Hydrolysis Reaction Pathway. *Biochemistry* 51: 8907–8918.
- Baffi M. A., Tobal T., Lago J. H. G., Boscolo M., Gomes E., Da-Silva R. 2013. Wine Aroma Improvement Using a β -Glucosidase Preparation from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 493–501.
- Barbagallo R. N., Palmeri R., Fabiano S., Rapisarda P., Spagna G. 2007. Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 570–575.
- Barbagallo R. N., Spagna G., Palmeri R., Restuccia C., Giudici P. 2004. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 58–66.
- Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R. 2015. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol. Adv.* 33: 435–456.
- Barbosa O., Torres R., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R. 2012. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochem.* 47: 1220–1227.
- Baron M., Prusova B., Tomaskova L., Kumsta M., Sochor J. 2017. Terpene content of

- wine from the aromatic grape variety 'Irsai Oliver' (*Vitis vinifera* L.) depends on maceration time. *Open Life Sci.* 12: 42–50.
- Basso A., Serban S. 2019. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Mol. Catal.* 479: 110607.
- Behrens C. J., Krahe N. K., Linke D., Berger R. G. 2018. BadGluc, a β -glucosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41: 1391–1401.
- Belancic A., Gunata Z., Vallier M.-J., Agosin E. 2003. β -Glucosidase from the Grape Native Yeast *Debaryomyces vanriijiae*: Purification, Characterization, and Its Effect on Monoterpene Content of a Muscat Grape Juice. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1453–1459.
- Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18: 355–383.
- Bhatia Y., Mishra S., Bisaria V. S. 2002. Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 375–407.
- Bilal M., Zhao Y., Rasheed T., Iqbal H. M. N. 2018. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 120: 2530–2544.
- Biver S., Stroobants A., Portetelle D., Vandenberg M. 2014. Two promising alkaline β -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 479–488.
- Bolivar J. M., Mateo C., Rocha-Martin J., Cava F., Berenguer J., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. 2009. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: Stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 139–144.
- Borges D. G., Baraldo Junior A., Farinas C. S., de Lima Camargo Giordano R., Tardioli P. W. 2014. Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized β -glucosidase. *Bioresour. Technol.* 167: 206–213.
- Brady D., Jordaan J. 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.* 31: 1639–1650.
- Cabaroglu T., Selli S., Canbas A., Lepoutre J.-P., Günata Z. 2003. Wine flavor

enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 581–587.

Cairns J. R. K., Esen A. 2010. β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 3389–3405.

Califano V., Sannino F., Costantini A., Avossa J., Cimino S., Aronne A. 2018. Wrinkled Silica Nanoparticles: Efficient Matrix for β -Glucosidase Immobilization. *J. Phys. Chem. C* 122: 8373–8379.

Cantarel B. I., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37: 233–238.

Cao L.-. C., Wang Z.-. J., Ren G.-. H., Kong W., Li L., Xie W., Liu Y.-. H. 2015. Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnol Biofuels* 8.

Cao L. 2005. Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 217–226.

Carli S., Carneiro L. A. B. de C., Ward R. J., Meleiro L. P. 2019. Immobilization of a β -glucosidase and an endoglucanase in ferromagnetic nanoparticles: A study of synergistic effects. *Protein Expr. Purif.* 160: 28–35.

Caruso F., Fiedler H., Haage K. 2000. Assembly of β -glucosidase multilayers on spherical colloidal particles and their use as active catalysts. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 169: 287–293.

de Cassia Pereira J., Leite R. S. R., do Prado H. F. A., Bocchini Martins D. A., Gomes E., da Silva R. 2015. Production and Characterization of β -glucosidase Obtained by the Solid-State Cultivation of the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175: 723–732.

Çelik A., Dinçer A., Aydemir T. 2016. Characterization of β -glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. *Int. J. Biol. Macromol.* 89: 406–414.

Chamoli S., Kumar P., Navani N. K., Verma A. K. 2016. Secretory expression, characterization and docking study of glucose-tolerant β -glucosidase from *B. subtilis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 85: 425–433.

Chamoli S., Yadav E., . H., Saini J. K., Verma A. K., Navani N. K., Kumar P. 2020. Magnetically recyclable catalytic nanoparticles grafted with *Bacillus subtilis* β -glucosidase for efficient cellobiose hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 164: 1729–

1736.

- Chandel A. K., Garlapati V. K., Singh A. K., Antunes F. A. F., da Silva S. S. 2018. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresour. Technol.* 264: 370–381.
- Chang F., Xue S., Xie X., Fang W., Fang Z., Xiao Y. 2018. Carbohydrate-binding module assisted purification and immobilization of β -glucosidase onto cellulose and application in hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *J. Biosci. Bioeng.* 125: 185–191.
- Chaubey A., Parshad R., Taneja S. C., Qazi G. N. 2009. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process Biochem.* 44: 154–160.
- Chauve M., Mathis H., Huc D., Casanave D., Monot F., Lopes Ferreira N. 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 3: 3.
- Chen T., Yang W., Guo Y., Yuan R., Xu L., Yan Y. 2014. Enhancing catalytic performance of β -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. *Enzyme Microb. Technol.* 63: 50–57.
- Chiba S. 1997. Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1233–1239.
- Cowan D. A., Fernandez-Lafuente R. 2011. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* 49: 326–346.
- Cui C., Jeon B.-M., Fu Y., Im W.-T., Kim S.-C. 2019. High-density immobilization of a ginsenoside-transforming β -glucosidase for enhanced food-grade production of minor ginsenosides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103: 7003–7015.
- Dal Magro L., Dalagnol L. M. G., Manfroi V., Hertz P. F., Klein M. P., Rodrigues R. C. 2016a. Synergistic effects of Pectinex Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 72: 157–165.
- Dal Magro L., Goetze D., Ribeiro C. T., Paludo N., Rodrigues E., Hertz P. F., Klein M. P., Rodrigues R. C. 2016b. Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. *Food Bioprocess Technol.* 9: 365–377.
- Dal Magro L., de Moura K. S., Backes B. E., de Menezes E. W., Benvenuti E. V.,

- Nicolodi S., Klein M. P., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C. 2019. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnol. reports (Amsterdam, Netherlands)* 24: e00373–e00373.
- Dashtban M., Qin W. 2012. Overexpression of an exotic thermotolerant β -glucosidase in *Trichoderma reesei* and its significant increase in cellulolytic activity and saccharification of barley straw. *Microb. Cell Fact.* 11: 63.
- Divakar S. 2013. Glycosidases BT - Enzymatic Transformation. In: Divakar S. (ed). Springer India, pp. 5–21.
- Doi R. H., Kosugi A. 2004. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 541–551.
- Elliston A., Collins S. R. A., Faulds C. B., Roberts I. N., Waldron K. W. 2014. Biorefining of Waste Paper Biomass: Increasing the Concentration of Glucose by Optimising Enzymatic Hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 3621–3634.
- Fernandes M., Marquetotti A., Vieira S., Maria G., Waldir P., Mateo C., Manuel J. 2011. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic B-Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 69: 47–53.
- Fernández-Fernández M., Sanromán M. Á., Moldes D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* 31: 1808–1825.
- Fernández-Pacheco P., García-Béjar B., Briones Pérez A., Arévalo-Villena M. 2021. Free and Immobilised β -Glucosidases in Oenology: Biotechnological Characterisation and Its Effect on Enhancement of Wine Aroma. *Front. Microbiol.* 12: 2327.
- Ferner M. J., Müller G., Schumann C., Kampeis P., Ulber R. 2016. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Immobilisation of glycosidases from commercial preparation on magnetic beads. Part 1. Characterisation of immobilised glycosidases with a particular emphasis on β -glucosidase. 123: 23–28.
- Ferreira R. da G., Azzoni A. R., Freitas S. 2018. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. *Biotechnol. Biofuels* 11: 81.
- Filice M., Marciello M., Betancor L., Carrascosa A. V, Guisan J. M., Fernandez-Lorente G. 2011. Hydrolysis of fish oil by hyperactivated *Rhizomucor miehei* lipase immobilized by multipoint anion exchange. *Biotechnol. Prog.* 27: 961–968.

- Fusco F. A., Fiorentino G., Pedone E., Contursi P., Bartolucci S., Limauro D. 2018. Biochemical characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 113: 783–791.
- Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C. 2011. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.* 353: 2885–2904.
- Gargouri M., Smaali I., Maugard T., Dominique M., Marzouki N. 2004. Fungus β -glucosidases: immobilization and use in alkyl- β -glycoside synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 29: 89–94.
- Gómez J. M., Romero M. D., Fernández T. M., García S. 2010. Immobilization and enzymatic activity of β -glucosidase on mesoporous SBA-15 silica. *J. Porous Mater.* 17: 657–662.
- Gonzalez Pombo P., Fariña L., Carrau F., Batista-viera F., Brena B. M., González-pombo P., Fari L. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochem.* 46: 385–389.
- Goswami S., Gupta N., Datta S. 2016. Using the β -glucosidase catalyzed reaction product glucose to improve the ionic liquid tolerance of β -glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 9: 72.
- Graebin N. G., Schöffner J. da N., Andrades D. de, Hertz P. F., Ayub M. A. Z., Rodrigues R. C. 2016. Immobilization of Glycoside Hydrolase Families GH1, GH13, and GH70: State of the Art and Perspectives. *Molecules* 21: 1074.
- Gueguen Y., Chemardin P., Pien S., Arnaud A., Galzy P. 1997. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. 55: 151–156.
- Guisán J. 2006. *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press.
- Gunata Z., Bitteur S., Brillouet J.-M., Bayonove C., Cordonnier R. 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 184: 139–149.
- Guo Y., Chen X., Zhang X., Pu S., Zhang X., Yang C., Li D. 2018. Comparative studies on ZIF-8 and SiO₂ nanoparticles as carrier for immobilized β -glucosidase. *Mol. Catal.* 459: 1–7.
- Hati S., Vij S., Singh B. P., Mandal S. 2015. β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. *J. Sci. Food Agric.* 95: 216–220.

- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309–316.
- Henrissat B., Davies G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 637–644.
- Hernandez K., Fernandez-Lafuente R. 2011. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb. Technol.* 48: 107–122.
- Illanes A., Cauerrhff A., Wilson L., Castro G. R. 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.* 115: 48–57.
- Javed M. R., Buthe A., Rashid M. H., Wang P. 2016. Cost-efficient entrapment of β -glucosidase in nanoscale latex and silicone polymeric thin films for use as stable biocatalysts. *Food Chem.* 190: 1078–1085.
- Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B. 2014. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* 20: 801–821.
- Juturu V., Wu J. C. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 33: 188–203.
- Karami F., Ghorbani M., Sadeghi Mahoonak A., Khodarahmi R. 2020. Fast, inexpensive purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: Possible broad prospects for industrial applications. *LWT* 118: 108770.
- Kempton J. B., Withers S. G. 1992. Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic studies. *Biochemistry* 31: 9961–9969.
- Khan S., Lindahl S., Turner C., Karlsson E. N. 2012a. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 80: 28–38.
- Khan S., Lindahl S., Turner C., Nordberg E. 2012b. Enzymatic Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 80: 28–38.
- Khoo H. E., Azlan A., Tang S. T., Lim S. M. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutr. Res.* 61.
- Kumar P., Ryan B., Henehan G. T. M. 2017. β -Glucosidase from *Streptomyces griseus*: Nanoparticle immobilisation and application to alkyl glucoside synthesis. *Protein Expr. Purif.* 132: 164–170.

- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lee C. K., Ibrahim D., Che Omar I. 2013a. Enzymatic deinking of various types of waste paper: Efficiency and characteristics. *Process Biochem.* 48: 299–305.
- Lee W.-H., Nan H., Kim H. J., Jin Y.-S. 2013b. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular β -glucosidase. *J. Biotechnol.* 167: 316–322.
- Li Y., Liu N., Yang H., Zhao F., Yu Y., Tian Y., Lu X. 2014. Cloning and characterization of a new β -Glucosidase from a metagenomic library of Rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. *BMC Biotechnol.* 14: 85.
- López-Gallego F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R. 2005. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* 119: 70–75.
- López-Gallego F., Fernandez-Lorente G., Rocha-Martín J., Bolívar J. M., Mateo C., Guisán J. M. 2020. Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: Stabilization of Industrial Enzymes. *Methods Mol. Biol.* 2100: 93–107.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Macario A., Moliner M., Corma A., Giordano G. 2009. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. *Microporous Mesoporous Mater.* 118: 334–340.
- Maicas S., Mateo J. J. 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 322–335.
- Marszałek K., Woźniak Ł., Kruszewski B., Skąpska S. 2017. The Effect of High Pressure Techniques on the Stability of Anthocyanins in Fruit and Vegetables. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 277.
- Mateo C., Abian O., Fernández-Lorente G., Pedroche J., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. 2002. Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. *Biotechnol. Prog.* 18: 629–634.
- Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisán J. M. 2000. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by

favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 509–515.

Mateo C., Grazu V., Palomo J. M., Lopez-Gallego F., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. 2007a. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat. Protoc.* 2: 1022–1033.

Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R. 2007b. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1451–1463.

Mateo C., Palomo J. M., Fuentes M., Betancor L., Grazu V., López-Gallego F., Pessela B., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Fernández-Lafuente R., Guisan J. 2006a. *Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins.* Vol. 39.

Mateo C., Pessela B. C. C., Fuentes M., Torres R., Ortiz C., López-Gallego F., Betancor L., Alonso-Morales N., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R. 2006b. Very Strong But Reversible Immobilization of Enzymes on Supports Coated With Ionic Polymers BT - Immobilization of Enzymes and Cells. In: Guisan J. M. (ed). Humana Press, pp. 205–216.

Mateo J. J., Jiménez M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* 881: 557–567.

Medina K., Martin V., Boido E., Carrau F. 2019. Chapter 5 - Yeast Biotechnology for Red Winemaking. In: Morata A. B. T.-R. W. T. (ed). Academic Press, pp. 69–83.

Mendes A. A., de Castro H. F., de S. Rodrigues D., Adriano W. S., Tardioli P. W., Mammarella E. J., de C. Giordano R., de L. C. Giordano R. 2011a. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 1055–1066.

Mendes A. A., Giordano R. C., Giordano R. de L. C., de Castro H. F. 2011b. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 68: 109–115.

Miletić N., Nastasović A., Loos K. 2012. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresour. Technol.* 115: 126–135.

Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A. 2015. An

- overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29: 205–220.
- Monteiro L. M. O., Pereira M. G., Vici A. C., Heinen P. R., Buckeridge M. S., Polizeli M. de L. T. de M. 2019. Efficient hydrolysis of wine and grape juice anthocyanins by *Malbranchea pulchella* β -glucosidase immobilized on MANAE-agarose and ConA-Sepharose supports. *Int. J. Biol. Macromol.* 136: 1133–1141.
- Moradi S., Khodaiyan F., Hadi Razavi S. 2020. Green construction of recyclable amino-tannic acid modified magnetic nanoparticles: Application for β -glucosidase immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 154: 1366–1374.
- Morais Junior W. G., Pacheco T. F., Gao S., Martins P. A., Guisán J. M., Caetano N. S. 2021. Sugarcane Bagasse Saccharification by Enzymatic Hydrolysis Using Endocellulase and β -glucosidase Immobilized on Different Supports. *Catal.* 11.
- Morant A. V., Jørgensen K., Jørgensen C., Paquette S. M., Sánchez-Pérez R., Møller B. L., Bak S. 2008. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69: 1795–1813.
- Nguyen H. H., Kim M. 2017. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Converg. Technol.* 26: 157–163.
- Palmeri R., Spagna G. 2007. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 382–389.
- Park H. J., Driscoll A. J., Johnson P. A. 2018. The development and evaluation of β -glucosidase immobilized magnetic nanoparticles as recoverable biocatalysts. *Biochem. Eng. J.* 133: 66–73.
- Pedroche J., Yust M., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Girón-Calle J., Alaiz M., Vioque J., Guisan J., Millán F. 2007. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1160–1166.
- Phadungcharoen N., Winotapun W., Khomniyawanit A., Krataichan F., Rojanarata T. 2019. Facile and green fabrication of biocatalytic chitosan beads by one-step genipin-mediated β -glucosidase immobilization for production of bioactive genistein. *Sustain. Chem. Pharm.* 14: 100187.
- Pinotti L. M., Tardioli P. W., Farinas C. S., Fernández-Lorente G., Orrego A. H., Guisan J. M., Pessela B. C. 2020. Stabilization of Glycosylated β -Glucosidase by Intramolecular Crosslinking Between Oxidized Glycosidic Chains and Lysine

Residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 192: 325–337.

Pogorzelski E., Wilkowska A. 2007. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour Fragr. J.* 22: 251–254.

Puhl A. C. 2008. *Obtenção de um biocatalisador da protease TEV para a remoção de caudas de histidinas de proteínas recombinantes*. Universidade Federal de Santa Catarina, .

Rani V., M. S., Tiwari R., Nain L., Arora A. 2014. Beta-Glucosidase: Key Enzyme in Determining Efficiency of Cellulase and Biomass Hydrolysis. *J Bioprocess Biotech* 5.

Reis C. L. B., Sousa E. Y. A. de, Serpa J. de F., Oliveira R. C., Santos J. C. S. dos. 2019. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. *Quim. Nova* 42: 768–783.

Ribeiro J. S., Veloso C. M. 2021. Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocoll.* 112: 106374.

Rodrigues R. C., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Fernández-Lafuente R. 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* 42: 6290–6307.

Rueda N., dos Santos J. C. S., Ortiz C., Torres R., Barbosa O., Rodrigues R. C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R. 2016. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Chem. Rec.* 16: 1436–1455.

Salgado J. C. S., Meleiro L. P., Carli S., Ward R. J. 2018. Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases – A review. *Bioresour. Technol.* 267: 704–713.

Sannino F., Costantini A., Ruffo F., Aronne A., Venezia V., Califano V. 2020. Covalent Immobilization of β -Glucosidase into Mesoporous Silica Nanoparticles from Anhydrous Acetone Enhances Its Catalytic Performance. *Nanomater.* (Basel, Switzerland) 10.

Santos-Buelga C., González-Paramás A. M. 2019. Anthocyanins. In: Melton L., Shahidi F., Varelis P. B. T.-E. of F. C. (eds). Academic Press, pp. 10–21.

dos Santos J. C. S., Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R. 2015a. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem* 7: 2413–2432.

dos Santos J. C. S., Rueda N., Barbosa O., Fernández-Sánchez J. F., Medina-Castillo

- A. L., Ramón-Márquez T., Arias-Martos M. C., Millán-Linares M. C., Pedroche J., Yust M. del M., Gonçalves L. R. B., Fernandez-Lafuente R. 2015b. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. *RSC Adv.* 5: 20639–20649.
- Sarry J.-E., Günata Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* 87: 509–521.
- Serra Colomer M., Funch B., Forster J. 2019. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 56: 30–35.
- Shah, S R. 2014. Chemistry and Applications of Cellulase in Textile Wet Processing. *Res. J. Eng. Sci.* 2: 1–5.
- Sheldon R. A. 2007. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* 349: 1289–1307.
- Sheldon R. A. 2011. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 467–477.
- Sheldon R. A., van Pelt S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* 42: 6223–6235.
- Sheldon R. A., Woodley J. M. 2018. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* 118: 801–838.
- Shi X., Xu J., Lu C., Wang Z., Xiao W., Zhao L. 2019. Immobilization of high temperature-resistant GH3 β -glucosidase on a magnetic particle $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Cellu-ZIF8}$ /zeolitic imidazolate framework. *Enzyme Microb. Technol.* 129: 109347.
- da Silva R. M., Paiva Souza P. M., Fernandes F. A. N., Gonçalves L. R. B., Rodrigues S. 2019. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in epoxy-agarose-tailoring oligosaccharides synthesis. *Process Biochem.* 78: 71–81.
- da Silva T. M., Pessela B. C., da Silva J. C. R., Lima M. S., Jorge J. A., Guisan J. M., Polizeli M. de L. T. M. 2014. Immobilization and high stability of an extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 104: 95–100.
- Singh G., Verma A. K., Kumar V. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech* 6: 3.
- Singh R. K., Zhang Y.-W., Nguyen N.-P.-T., Jeya M., Lee J.-K. 2011. Covalent immobilization of β -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 337–344.

- Singhania R. R., Patel A. K., Pandey A., Ganansounou E. 2017. Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresour. Technol.* 245: 1352–1361.
- Singhania R. R., Patel A. K., Sukumaran R. K., Larroche C., Pandey A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 127: 500–507.
- Sørensen A., Lübeck M., Lübeck P. S., Ahring B. K. 2013. Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials. *Biomolecules* 3: 612–631.
- Souza F. H. M., Meleiro L. P., Machado C. B., Zimbardi A. L. R. L., Maldonado R. F., Souza T. A. C. B., Masui D. C., Murakami M. T., Jorge J. A., Ward R. J., Furriel R. P. M. 2014. Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. *J Mol Catal B Enz.* 106.
- Spagna G., Barbagallo R. N., Giorgio P., Maria R., Guisan M. 2000. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. 63–69.
- Srivastava N., Rathour R., Jha S., Pandey K., Srivastava M., Thakur V. K., Sengar R. S., Gupta V. K., Mazumder P. B., Khan A. F., Mishra P. K. 2019. Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversation for Biofuels Application. *Biomolecules* 9: 220.
- Sun J., Ma Y., Xu X., Liu Z., Zou L. 2020a. Molecular cloning and bioinformatics analyses of a GH3 beta-glucosidase from *Auricularia heimuer*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 34: 850–859.
- Sun J., Wang W., Ying Y., Hao J. 2020b. A Novel Glucose-Tolerant GH1 β -Glucosidase and Improvement of Its Glucose Tolerance Using Site-Directed Mutation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 192: 999–1015.
- Tallapragada P., Dikshit R. 2017. Chapter 11 - Microbial Production of Secondary Metabolites as Food Ingredients. In: Holban A. M., Grumezescu A. M. B. T.-M. P. of F. I. and A. (eds). *Handbook of Food Bioengineering*. Academic Press, pp. 317–345.
- Tang C., Saquing C. D., Sarin P. K., Kelly R. M., Khan S. A. 2014. Nano fibrous membranes for single-step immobilization of hyperthermophilic enzymes. *J. Memb. Sci.* 472: 251–260.
- Teugjas H., Väljamäe P. 2013. Selecting β -glucosidases to support cellulases in

- cellulose saccharification. *Biotechnol. Biofuels* 6: 1–13.
- Tischer W., Kasche V. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17: 326–335.
- Tiwari R., Singh P. K., Singh S., Nain P. K. S., Nain L., Shukla P. 2017. Bioprospecting of novel thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* RA10 and its application in biomass hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels* 10: 246.
- Le Traon-Masson M.-P., Pellerin P. 1998. Purification and Characterization of Two β -d-Glucosidases from an *Aspergillus Niger* Enzyme Preparation: Affinity and Specificity Toward Glucosylated Compounds Characteristic of the Processing of Fruits. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 374–382.
- Tsukada T., Igarashi K., Yoshida M., Samejima M. 2006. Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 807–814.
- Tu M., Zhang X., Kurabi A., Gilkes N., Mabee W., Saddler J. 2006. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 28: 151–156.
- Tyagi R., Gupta M. N. 1994. Noncovalent and reversible immobilization of chemically modified amyloglucosidase and beta-glucosidase on DEAE-cellulose. *Process Biochem.* 29: 443–448.
- Vazquez-Ortega P. G., Alcaraz-Fructuoso M. T., Rojas-Contreras J. A., López-Miranda J., Fernandez-Lafuente R. 2018. Stabilization of dimeric β -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 110: 38–45.
- Venardos D., Klei H. E., Sundstrom D. W. 1980. Conversion of cellobiose to glucose using immobilized β -glucosidase reactors. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 112–116.
- Venezia V., Sannino F., Costantini A., Silvestri B., Cimino S., Califano V. 2020. Mesoporous silica nanoparticles for β -glucosidase immobilization by templating with a green material: Tannic acid. *Microporous Mesoporous Mater.* 302: 110203.
- Verma M. L., Chaudhary R., Tsuzuki T., Barrow C. J., Puri M. 2013a. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 135: 2–6.
- Verma M. L., Rajkhowa R., Wang X., Barrow C. J., Puri M. 2013b. Exploring novel ultrafine Eri silk bioscaffold for enzyme stabilisation in cellobiose hydrolysis.

- Bioresour. Technol. 145: 302–306.
- Vernocchi P., Ndagijimana M., Serrazanetti D. I., López C. C., Fabiani A., Gardini F., Elisabetta Guerzoni M., Lanciotti R. 2011. Use of *Saccharomyces cerevisiae* strains endowed with β -glucosidase activity for the production of Sangiovese wine. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 1423–1433.
- Vernocchi P., Patrignani F., Ndagijimana M., Lopez C. C., Suzzi G., Gardini F., Lanciotti R. 2015. Trebbiano wine produced by using *Saccharomyces cerevisiae* strains endowed with β -glucosidase activity. Ann. Microbiol. 65: 1565–1571.
- Vieira M. F., Vieira A. M. S., Zanin G. M., Tardioli P. W., Mateo C., Guisán J. M. 2011. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. J. Mol. Catal. B Enzym. 69: 47–53.
- Villena M. A., Iranzo J. F. Ú., Pérez A. I. B. 2007. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. Enzyme Microb. Technol. 40: 420–425.
- Virgen-Ortíz J. J., dos Santos J. C. S., Berenguer-Murcia Á., Barbosa O., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R. 2017. Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. J. Mater. Chem. B 5: 7461–7490.
- Wang Y., Zhang C., Li J., Xu Y. 2013. Different influences of β -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. Food Chem. 140: 245–254.
- Woodley J. M. 2008. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. Trends Biotechnol. 26: 321–327.
- Yang J., Wang Q., Zhou Y., Li J., Gao R., Guo Z. 2017. Engineering *T. naphthophila* β -glucosidase for enhanced synthesis of galactooligosaccharides by site-directed mutagenesis. Biochem. Eng. J. 127: 1–8.
- Yang P., Yuan C., Wang H., Han F., Liu Y., Wang L., Liu Y. 2018. Stability of Anthocyanins and Their Degradation Products from Cabernet Sauvignon Red Wine under Gastrointestinal pH and Temperature Conditions. Molecules 23.
- Yang X., Ma Y., Li L. 2019. β -Glucosidase from tartary buckwheat immobilization on bifunctionalized nano-magnetic iron oxide and its application in tea soup for aroma and flavonoid aglycone enhancement. Food Funct. 10: 5461–5472.
- Yeoman C. J., Han Y., Dodd D., Schroeder C. M., Mackie R. I., Cann I. K. O. B. T.-A. in A. M. 2010. Chapter 1 - Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. Advances in Applied Microbiology. Academic Press, pp. 1–55.

- Zaak H., Kornecki J. F., Siar E.-H., Fernandez-Lopez L., Corberán V. C., Sassi M., Fernandez-Lafuente R. 2017. Coimmobilization of enzymes in bilayers using pei as a glue to reuse the most stable enzyme: Preventing pei release during inactivated enzyme desorption. *Process Biochem.* 61: 95–101.
- Zhang T., Fang K., Ni H., Li T., Li L. J., Li Q. B., Chen F. 2020. Aroma enhancement of instant green tea infusion using β -glucosidase and β -xylosidase. *Food Chem.* 315: 126287.
- Zhou Y., Yuan S., Liu Q., Yan D., Wang Y., Gao L., Han J., Shi H. 2017. Synchronized purification and immobilization of his-tagged β -glucosidase via Fe_3O_4 /PMG core/shell magnetic nanoparticles. *Sci. Rep.* 7: 1–11.
- Zhu F.-M., Du B., Li J. 2014. Aroma enhancement and enzymolysis regulation of grape wine using β -glycosidase. *Food Sci. Nutr.* 2: 139–145.

9. APÊNDICES

9.1. Artigo publicado no periódico *Journal of Biotechnology*

Roberto Morellon-Sterling, El-Hocine Siar, Sabrina Ait Braham, **Diandra de Andrades**, Justo Pedroche, M^a del Carmen Millán, Roberto Fernandez-Lafuente. Effect of amine length in the interference of the multipoint covalent immobilization of enzymes on glyoxyl agarose beads. *Journal of Biotechnology*, v 329, pg 128-142, 2021.

Abstract: Trypsin, chymotrypsin, penicillin G acylase and ficin extract have been stabilized by immobilization on glyoxyl agarose, adding different aliphatic compounds bearing a primary amine group during the immobilization: ethyl amine, butyl amine, hexyl amine (at concentrations ranging from 0 to 20 mM) and octyl amine (from 0 to 10 mM) to analyze their effects on the immobilized enzyme stability. As expected, the presence of amines reduced the intensity of the enzyme-support multipoint covalent attachment, and therefore the enzyme stability. However, it is clear that this effect is higher using octyl amine for all enzymes (in some cases the enzyme immobilized in the presence of 10 mM octyl amine was almost inactivated while the reference kept over 50 % of the initial activity). This way, it seems that the most important effect of the presence of aminated compounds came from the generation of steric hindrances to the enzyme/support multi-reaction promoted by the amines that are interacting with the aldehyde groups. In some instances, just 1 mM of aminated compounds is enough to greatly decrease enzyme stability. The results suggested that, if the composition of the enzyme extract is unknown, to eliminate small aminated compounds may be necessary to maximize the enzyme-support reaction.

9.2. Artigo publicado no periódico *Applied Biochemistry and Biotechnology*

Sabrina Ait Braham, Roberto Morellon-Sterling, **Diandra de Andrades**, Rafael C Rodrigues, El-Hocine Siar, Ali Aksas, Justo Pedroche, Maria del Carmen Millán, Roberto Fernandez-Lafuente. Effect of Tris Buffer in the Intensity of the Multipoint Covalent Immobilization of Enzymes in Glyoxyl-Agarose Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v 193, pg 2843–2857, 2021.

Abstract: Tris is an extensively used buffer that presents a primary amine group on its structure. In the present work trypsin, chymotrypsin and penicillin G acylase (PGA) were immobilized/stabilized on glyoxyl agarose in presence of different concentrations of Tris (from 0 to 20 mM). The effects of the presence of Tris during immobilization were studied analyzing the thermal stability of the obtained immobilized biocatalysts. The results indicate a reduction of the enzyme stability when immobilized in the presence of Tris. This effect can be observed in inactivations carried out at pH 5, 7, and 9 with all the enzymes assayed. The reduction of enzyme stability increased with the Tris concentration. Another interesting result is that the stability reduction was more noticeable for immobilized PGA than in the other immobilized enzymes, the biocatalysts prepared in presence of 20 mM Tris lost totally the activity at pH 7 just after 1 h of inactivation, while the reference at this time still kept around 61 % of the residual activity. These differences are most likely due to the homogeneous distribution of the Lys groups in PGA compared to trypsin and chymotrypsin (where almost 50% of Lys group are in a small percentage of the protein surface). The results suggest that Tris could be affecting the multipoint covalent immobilization in two different ways, on one hand, reducing the number of available glyoxyl groups of the support during immobilization, and on the other hand, generating some steric hindrances that difficult the formation of covalent bonds.

9.3. Artigo publicado no periódico *Process Biochemistry*

Sabrina Ait Braham; El-Hocine Siar; Sara Arana Peña; Hossein Bavandi; Diego Carballares; Roberto Morellón; **Diandra de Andrades**; Jakub F. Kornecki. Positive effect of glycerol on the stability of immobilized enzymes: is it a universal fact? *Process Biochemistry*. V 102, Pg 108-121, 2021.

Abstract: In this paper, the effect of glycerol at different concentrations and pH values on the stabilities of 13 immobilized enzymes has been analyzed. Among the enzymes, we have selected 5 lipases (immobilized on octyl or amino-glutaraldehyde supports), 3 proteases (immobilized on glyoxyl or amino-glutaraldehyde supports), 2 glycosidases, 1 laccase, 1 catalase (immobilized on glutaraldehyde matrix) and one penicillin acylase (immobilized on glyoxyl supports). The effect was completely enzyme-dependent. The results indicate that the stabilizing effect of glycerol is not universal, as in certain cases it produced even some destabilization of the immobilized enzyme (e.g., in the case of ficin extract, a protease). The glycerol effect was strongly concentration dependent (but not always the most significant results were observed at the highest glycerol concentrations), and it also strongly depends on the inactivation pH (at pH 9.0 this agent showed the strongest destabilization effects). Very interestingly, the effect of glycerol on enzyme stability was much dependent on the used immobilization protocol, which determines not only the intensity but even the sense of this effect. Thus, before using glycerol as enzyme stabilizer agent, it is necessary to confirm that the effect is positive for a specific preparation under the specific used conditions.

9.4. Artigo publicado no periódico *Molecules*

Sabrina Ait Braham, El-Hocine Siar, Sara Arana-Peña, Diego Carballares, Roberto Morellon-Sterling, Hossein Bavandi, **Diandra de Andrades**, Jakub F Kornecki, Roberto Fernandez-Lafuente. Effect of Concentrated Salts Solutions on the Stability of Immobilized Enzymes: Influence of Inactivation Conditions and Immobilization Protocol. *Molecules*, v 26(4), pg 968, 2021.

Abstract: This paper aims to investigate the effects of some salts (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Na_2SO_4) at pH 5.0, 7.0 and 9.0 on the stability of 13 different immobilized enzymes: five lipases, three proteases, two glycosidases, and one laccase, penicillin G acylase and catalase. The enzymes were immobilized to prevent their aggregation. Lipases were immobilized via interfacial activation on octyl agarose or on glutaraldehyde-amino agarose beads, proteases on glyoxyl agarose or glutaraldehyde-amino agarose beads. The use of high concentrations of salts usually has some effects on enzyme stability, but the intensity and nature of these effects depends on the inactivation pH, nature and concentration of the salt, enzyme and immobilization protocol. The same salt can be a stabilizing or a destabilizing agent for a specific enzyme depending on its concentration, inactivation pH and immobilization protocol. Using lipases, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ generally permits the highest stabilities (although this is not a universal rule) but using the other enzymes this salt is in many instances a destabilizing agent. At pH 9.0, it is more likely to find a salt destabilizing effect than at pH 7.0. Results confirm the difficulty of foreseeing the effect of high concentrations of salts in a specific immobilized enzyme