



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**THIAGO MARTINS DA CUNHA**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO  
RETICULADO (CLEA) DE  $\beta$ -GLICOSIDASE PRODUZIDO POR  
*ASPERGILLUS NIGER***

**Alfenas /MG**

**2021**

THIAGO MARTINS DA CUNHA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO  
RETICULADO (CLEA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biomoléculas

Orientadora: Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Cunha, Thiago Martins da  
C972p Preparação e caracterização de um agregado enzimático (CLEA) de  
 $\beta$ -glicosidase produzido por *Aspergillus niger*. / Thiago Martins da Cunha  
– Alfenas, MG, 2021.  
76 f.: il. –

Orientadora: Joelise de Alencar Figueira Angelotti.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de  
Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Lipase. 4. Imobilização. 5. CLEA.  
I. Angelotti, Joelise de Alencar Figueira. II. Título.

CDD-660.6

THIAGO MARTINS DA CUNHA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO RETICULADO (CLEA) DE  $\beta$ -GLICOSIDASE  
PRODUZIDO POR ASPERGILLUS NIGER**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 28 de setembro de 2021

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Paula de Paula Menezes Barbosa  
Instituição: Cotuca - Colégio técnico de Campinas

Prof. Dr. André Aguiar Mendes  
Instituição: Universidade Federal de Itajubá



Documento assinado eletronicamente por **Joelise de Alencar Figueira Angelotti, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2021, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula de Paula Menezes Barbosa, Usuário Externo**, em 28/09/2021, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Aguiar Mendes, Usuário Externo**, em 28/09/2021, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0600979** e o código CRC **A23644BE**.

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por colocar pessoas tão especiais no meu caminho, que sempre me apoiaram e me ajudaram a acreditar que posso tornar meus sonhos realidade.

Aos meus chefes, Prof. Dr. Marcio Alves de Oliveira e Prof. Dr. André Mauricio de Oliveira pelo incentivo e compreensão e aos colegas Departamento de Controle Ambiental e Química no CEFET-MG Unidade Contagem pelo suporte nos experimentos.

Agradeço as minhas orientadoras Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti e Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata por todo apoio, sugestões, discussões, competência e profissionalismo, me abrindo as portas para a vida acadêmica.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Biotecnológica pelo conhecimento, auxílio na minha formação acadêmica, pelo carinho e amizade nesses dois anos de convivência. Aos técnicos Gustavo e Alessandra pela presteza, disponibilidade e suporte laboratorial.

Agradeço de todo o coração aos meus pais José e Maiza, aos meus irmãos Fernanda e Luiz e a meu companheiro Ruan por todo amor e afeto, acreditando sempre em mim e dando todo apoio necessário.

Agradeço aos meus colegas da nossa humilde república Lady Murply, Luiz, Marcus, Melissa, Ana e Jéssyka por terem me acolhido em Alfenas e por toda ajuda, apoio, conversas e momentos de descontração.

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento deste trabalho.

Ao CNPq e o Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais pela bolsa de mestrado. Agradeço também a todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A imobilização de enzimas é uma técnica que dentre algumas vantagens traz como destaque a viabilidade da reutilização das mesmas e redução da contaminação residual no produto final, tornando os processos biocatalíticos economicamente viáveis. Dos vários protocolos de imobilização, a imobilização enzimática sem o uso de suporte pela técnica CLEAs (do inglês, CLEA – cross-linked enzyme aggregation) é bastante relevante por combinar purificação e imobilização enzimática em um único estágio, resultando em uma enzima imobilizada com uma alta atividade e sem um suporte volumoso. A enzima  $\beta$ -glicosidase pertence à classe das hidrolases, e possui ampla utilização industrial, sendo aplicada desde a bioconversão de biomassa em glicose para produção de biocombustíveis até na hidrólise de precursores de aroma na indústria de alimentos e bebidas. Até o momento, poucos trabalhos foram relatados na literatura sobre a imobilização de  $\beta$ -glicosidases microbianas por CLEAs. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as condições de produção de agregados enzimáticos reticulados (CLEAS) de  $\beta$ -glicosidase produzida por *A. niger* e a determinação de algumas características bioquímicas e morfológicas do derivado. Para isso as variáveis concentração de agente reticulante e agente espaçador na imobilização por CLEAs de  $\beta$ -glicosidase fúngicas foram estudados por meio da metodologia de Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup>, com 11 ensaios (3 pontos centrais). Foram determinados o pH e temperaturas ótimos de atividade, pH e temperatura de estabilidade e o efeito da concentração de substrato e de íons na atividade da enzima livre e imobilizada. A caracterização morfológica dos derivados foi investigada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada e Fourier (FTIR) e por Termogravimetria Analítica (TG/TGA). Os resultados foram divulgados em artigos e demonstram uma maior termo estabilidade dos derivados e alterações dos pH (4,5 para 4,0) para e temperatura (55 para 60°C) ótimos dos derivados em comparação com a enzima livre. Os testes morfológicos mostram que os derivados foram mais estáveis a temperatura pela temperatura de decomposição de 200°C para enzima livre e de 208°C para os derivados, além das absorvâncias nas bandas 3000 cm<sup>-1</sup> a 2700 cm<sup>-1</sup>, que comprovam as ligações cruzadas efetivas.

Palavras-chave:  $\beta$ -glicosidase; imobilização de enzimas; CLEAs; cross-linked.

## ABSTRACT

The enzyme immobilization is a technique that, among some advantages, highlights the feasibility of reusing them and reducing residual contamination in the final product, making biocatalytic processes economically viable. Of the various immobilization protocols, enzymatic immobilization without the use of support by the CLEAs technique (CLEA - cross-linked enzyme aggregation) is very relevant for combining purification and enzymatic immobilization in a single stage, resulting in an immobilized enzyme with a high activity and without bulky support. The enzyme  $\beta$ -glycosidase belongs to the hydrolases class, and has wide industrial use, being applied since the bio-conversion of biomass into glucose for the production of biofuels to the hydrolysis of aroma precursors in the food and beverage industry. To date, few studies have been reported in the literature on the immobilization of microbial  $\beta$ -glycosidases by CLEAs. The objective of the present work was to evaluate the conditions of production of cross-linked enzyme aggregates (CLEAS) of  $\beta$ -glycosidase produced by *A. niger* and the determination of some biochemical and morphological characteristics of the derivative. For this, the variables of crosslinking agent and spacer agent in immobilization by fungal  $\beta$ -glucosidase CLEAs were studied through the methodology of Complete Factorial Planning 2<sup>2</sup>, with 11 tests (3 central points). The optimal pH and temperatures of activity, pH and temperature of stability and the effect of the concentration of substrate and ions on the activity of the free and immobilized enzyme were determined. The morphological characterization of the derivatives was investigated by Transformed and Fourier Infrared Spectroscopy (FTIR) and by Analytical Thermogravimetry (TG / TGA). The results were published in articles and show a longer term stability of the derivatives and changes in the pH (4.5 to 4.0) and temperature (55 to 60 ° C) of the derivatives compared to the free enzyme. Morphological tests show that the derivatives were more stable at temperature due to the decomposition temperature of 200 ° C for free enzyme and 208 ° C.

Keywords:  $\beta$ -glucosidase; enzyme immobilization; CLEAs; cross-linked.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes protocolos de imobilização sem suporte .....	14
Figura 2 - Mecanismos de catálise das glicosil hidrolases incluindo as bgs. Adaptado de (mccarter & withers, 994.....	16
Figura 3 - Comparação do acesso ao sítio ativo de $\beta$ -glicosidases GH1 E GH3 ....	17
Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas. Fonte:furlani et al., 2020.....	18
Figura 5 - Atividade enzimática dos precipitados obtidos com os diferentes solventes .....	37
Figura 6 - Análise de proteínas nas amostras de precipitados e sobrenadantes obtidos com os diferentes solventes.....	38
Figura 7 - Fluxograma preparo dos cleas.....	51
Figura 8 - Atividade relativa de $\beta$ -glicosidase em função da concentração de glutaraldeído e da concentração de proteína espaçadora durante a etapa de imobilização: (a) superfície de resposta e (b) curva de contorno. ....	58
Figura 9 - Validação do modelo de otimização para imobilização de $\beta$ -glicosidase por cleas.....	58
Figura 10 - Efeito do tempo de reação na atividade de $\beta$ -glicosidase imobilizada por cleas.....	59
Figura 11 - Perfis de atividade de $\beta$ -glicosidade livre e imobilizada em função da temperatura ótima (a), ph ótimo (b).....	60
Figura 12 - Perfis de atividade de $\beta$ -glicosidade livre e imobilizada em função da temperatura de estabilidade (a), ph de estabilidade (b). ....	61
Figura 13 - Efeito da concentração de substrato na atividade hidrolítica da enzima nas formas livre e imobilizada pela técnica clea. Ajuste dos modelos cinéticos de michaelis-menten na ausência (a) e presença (b) de inibição aos dados experimentais para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes.....	63
Figura 14 - Curvas tga do derivado (a) e da enzima solúvel (b).....	65
Figura 15 - Espectros do ft-ir da enzima solúvel (a) e do derivado (b).....	65
Figura 16 - Estabilidade de estocagem da enzima livre e imobilizada por cleas em 150 dias a 4°C.....	66



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de enzimas imobilizadas por cleas.....	20
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados .....	52
Tabela 3 - Matriz do delineamento e respostas para otimização da imobilização de $\beta$ -glicosidase por cleas. ....	56
Tabela 4 - Coeficientes estimados significativos, erro padrão e p-valores para a atividade relativa, com $\alpha = 10\%$ . ....	57
Tabela 5 - Análise de variância (anova) para o modelo completo .....	57
Tabela 6 - Efeitos de sais sobre a atividade enzimática .....	62
Tabela 7 - Constantes cinéticas.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AE	Agente espaçador
AR	Agente reticulante
BGL	B-glicosidase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLECs	Cross-linked enzyme crystals
CLEA	Cross-Linked Enzyme Aggregate
CEFET-MG	Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
CaZyl	Base de dados de enzimas
DECAQ	Departamento de Controle Ambiental e Química
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GHS	Glicosil Hidrolases
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
pH	Potencial Hidrogenionico
PVA	Alcool Poli Vinilico
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
TGA	Análise Termogravimétrica

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	14
2.1	ENZIMA B-GLICOSIDASE .....	14
2.2	IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASES .....	17
2.3	CLEAS.....	19
3	OBJETIVOS .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
	REFERÊNCIAS.....	24
4	ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS.....	31
1	INTRODUÇÃO .....	33
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
2.1	MANUTENÇÃO DA CULTURA.....	34
2.2	PRÉ-INÓCULO E FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMISSÓLIDO .....	35
2.3	PRODUÇÃO DE B-GLICOSIDASE POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA ...	35
2.4	AVALIAÇÃO DOS AGENTES PRECIPITANTES .....	36
2.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE.....	36
2.6	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4	CONCLUSÃO.....	39
	AGRADECIMENTOS .....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
1	INTRODUÇÃO .....	48
2	METODOLOGIA.....	50
2.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA B-GLICOSIDASE ....	51
2.2	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	52
2.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	52
2.4	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE RETICULAÇÃO.....	52
2.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA .....	53
2.5.1	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE .....	53
2.5.2	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DE ATIVIDADE .....	53

2.5.3	DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA DE ESTABILIDADE .....	53
2.5.4	DETERMINAÇÃO DO EFEITO ATIVADOR E INIBIDOR DE ÍONS .....	53
2.5.5	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.....	54
2.5.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS DERIVADOS.....	55
2.6	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO .....	55
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
3	RESULTADOS.....	55
3.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	55
3.2	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE RETICULAÇÃO.....	59
3.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA .....	59
3.3.1	TEMPERATURA E PH ÓTIMO DE ATIVIDADE E ESTABILIDADE.....	59
3.3.2	DETERMINAÇÃO DO EFEITO ATIVADOR E INIBIDOR DE ÍONS.....	62
3.3.3	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	63
3.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS DERIVADOS .....	64
3.5	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO .....	66
4	CONCLUSÕES .....	67
	AGRADECIMENTOS .....	67
	REFERENCIAS.....	68
4	CONCLUSÃO GERAL.....	75
5	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da indústria é o desenvolvimento de produtos e processos menos agressivos ao meio ambiente, contribuindo para o desenvolvimento de um modo produtivo mais sustentável. Nesse sentido, a tecnologia enzimática pode ser apontada como uma alternativa a processos tradicionais, por oferecer processos tecnologicamente limpos. As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação e que, graças ao advento da biotecnologia, podem ser aplicadas industrialmente, em processos geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO, 2009; XU *et al.*, 2018a; XUE; WOODLEY, 2012a).

Existem milhares de preparações enzimáticas disponíveis no mercado, em diferentes graus de pureza, e sua exploração comercial abrange uma vasta gama de produtos, desde os de custo baixo, até as preparações altamente purificadas, de elevado custo, usadas com finalidade analítica, científica e médica. As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas. Estão presentes em vários processos industriais como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos, de papel e celulose, dentre outras (MONTEIRO, 2009; ORLANDELLI *et al.*, 2012; RAJAN, 2008; TEIXEIRA, 2020).

Dentre as enzimas comerciais, as  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo-glucohidrolase, EC 3.2.1.21) tem um papel de destaque em vários setores, desde a liberação de aromas na indústria de alimentos e bebidas até na conversão de biomassa celulósica em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol, onde vem ganhando mais atenção nos últimos anos. Essas enzimas catalisam a hidrólise de dissacarídeos e glicosídeos conjugados a partir da extremidade não redutora. São as enzimas responsáveis pela clivagem e transferência de grupos glicosídicos. Elas são denominadas, respectivamente, como glicosidases e glicosiltransferases. As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações  $\beta$ -glicosídicas em aril, amino ou alquil- $\beta$ -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, e oligo e dissacarídeos, liberando o terminal não redutor (CAIRNS; ESEN, 2010b)

Apesar das vantagens do uso de enzimas em processos industriais como

biocatalizadores, estes processos apresentam desvantagens que são entraves a sua aplicação em larga escala. O alto custo de produção e purificação, sensibilidade as condições de pH e temperatura, e as dificuldade de separação das enzimas do meio reacional, representando uma contaminação ao produto final, são exemplo dessa desvantagens. A fim de tornar os processos enzimáticos mais vantajosos do ponto de vista financeiro, diferentes métodos de mitigação dos custos vem sendo estudados. A imobilização ou retenção em um suporte que permita sua ação catalítica e que viabilize a reutilização das enzimas, possibilitam a utilização em processos contínuos, e vem se mostrando uma técnica promissora (ADLERCREUTZ, 2013; BARBOSA *et al.*, 2015; TALEKAR *et al.*, 2013b).

Existem várias técnicas disponíveis para imobilização de enzimas e a técnica mais adequada deve ser escolhida com cautela, pois a imobilização da enzima pode provocar alterações em sua estrutura espacial e conseqüente mudanças nas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas. A atividade enzimática é afetada pelo método de imobilização, pela quantidade e pela pureza da enzima utilizada (ABDEL-FATTAH *et al.*, 1997; MOHAMAD *et al.*, 2015a; SHELDON, 2007). Os métodos de imobilização exploram as propriedades físico-químicas das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que compõe a enzima, fazendo ligações permanentes ou interações reversíveis (SHELDON *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2012; VELASCO-LOZANO *et al.*, 2016).

Como alternativa aos métodos convencionais, foram desenvolvidos métodos por ligação cruzada empregando enzimas cristalinas CLECs - *cross-linked enzyme crystals* e agregados enzimáticos reticulados CLEAs - *cross-liked enzyme aggregates* (ARAUJO *et al.*, 2015a; SHELDON *et al.*, 2003; SHELDON, 2008, 2011b). Os metodos estão detalhados na figura 01.

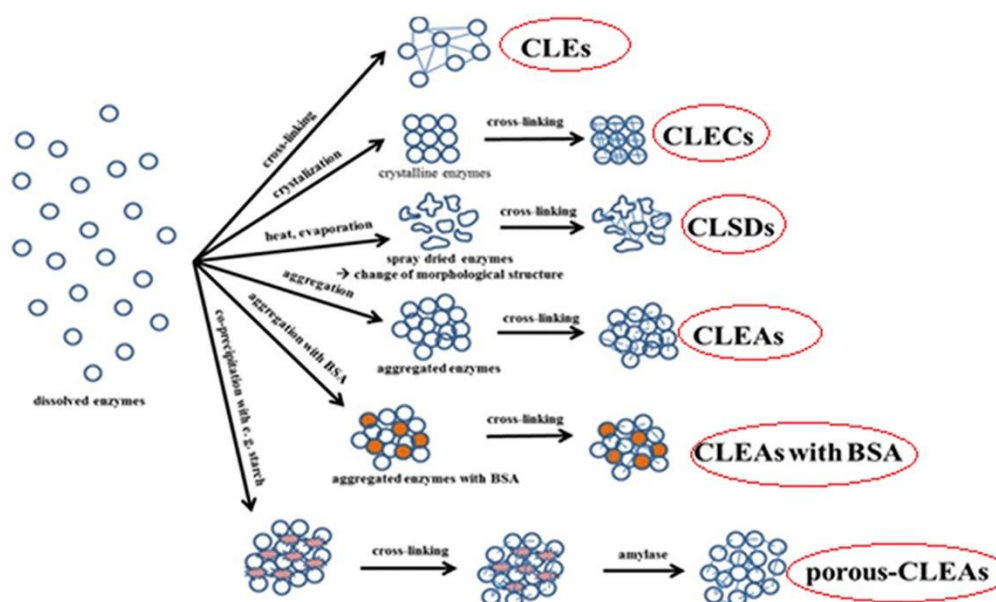


Figura 1: Diferentes protocolos de imobilização sem suporte  
 FONTE: Adaptado de Voběrková et al. (2018). Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates.

A imobilização por CLEA é um método simples e que dispensa a necessidade de suportes, podendo ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas. Ainda há a necessidade de estudos mais aprofundados com respeito a morfologia adquirida dos CLEAs após o processo de reticulação, dada a possível formação de grandes aglomerados que resultam, muitas vezes, em dificuldades difusionais do substrato e do produto no ambiente catalítico. (LIEW *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2019)

Neste contexto, tendo em vista as várias possibilidades de aplicação das  $\beta$ -glicosidases, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a preparação de CLEAs de  $\beta$ -glicosidases produzida por *Aspergillus niger*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Enzima $\beta$ -glicosidase

As  $\beta$ -glicosidases (BGL) são enzimas da família Glicosil Hidrolases (GHs) e catalisam diversas reações de interesse na indústria nos mais diversos segmentos, onde vem atraído atenção considerável nos últimos anos devido a

seus papéis importantes em vários processos biotecnológicos, como a hidrólise de glicolipídeos e glicosídeos exógenos em animais, a hidrólise de isoflavonóides glicosídeos, reações de lignificação, catabolismo da parede celular de celo-oligosacarídeos, mecanismos de defesa, ativação de fito-hormônios conjugados, liberação de compostos de aroma em plantas, a liberação de compostos aromáticos de precursores de aroma e sabor na indústria de bebidas, a produção de etanol combustível de segunda geração a partir de resíduos agrícolas, etc. As BGL são amplamente distribuídas no ecossistema, podendo ser encontrada em mamíferos, plantas e micro-organismos (ANGELOTTI, 2013; CAIRNS; ESEN, 2010; IGARASHI *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 1999; LIEW *et al.*, 2018; ANGELOTTI, 2013; CAIRNS; ESEN, 2010; CRESPIM *et al.*, 2016).

A BGL clivam ligações  $\beta$ -D-glicosídicas a partir do terminal não redutor, de uma variedade de compostos que liberam glicose como o produto final, diferindo muito em sua especificidade de substrato de acordo com o sistema biológico onde a enzima ocorre. Existem dois métodos amplamente aceitos para sua classificação, a metodologia tradicional, definida pela União Internacional de Bioquímica, baseado na especificidade do substrato ou a classificação pelas sequências nucleotídicas e na análise de agrupamento hidrofóbico (ANGELOTTI, 2013; CUNHA; FERREIRA; ANGELOTTI, 2020; LIEW *et al.*, 2018).

De acordo com a metodologia tradicional, as BGL são categorizadas em quatro classes, sendo glicosilceramidases ou glicocerebrosidases (E.C 3.2.1.45), esteril-  $\beta$  – glicosidase (E.C 3.2.1.104), amigdalina hidrolase (E.C 3.2.1.117) ou coniferina  $\beta$ -glicosidase (E.C 3.2.1.116). Com base na identidade de sequência e na análise de agrupamento hidrofóbico, as  $\beta$ -glicosidases são colocadas na família 1 das GHs e na família 3 como depositado na base de dados de enzimas ativas por Carbohidrato —CaZyl. As BGL pertencentes à família GH 1 são relatadas a partir de arqueobactérias, plantas e animais, enquanto as  $\beta$ -glicosidases pertencentes à família GH 3 são de bactérias, fungos e leveduras. Algumas BGL também podem ser encontrada na família 5, 9, 30 e 116 (ABDEL-FATTAH; OSMAN 1997).

As BGL realizam a hidrólise de ligações glicosídicas através de dois mecanismos típicos: retenção ou inversão da quiralidade do carbono anomérico, que dependem da mudança de configuração do oxigênio durante a



reação(MCCARTER; WITHERS, 1994), como mostrado na figura 02.

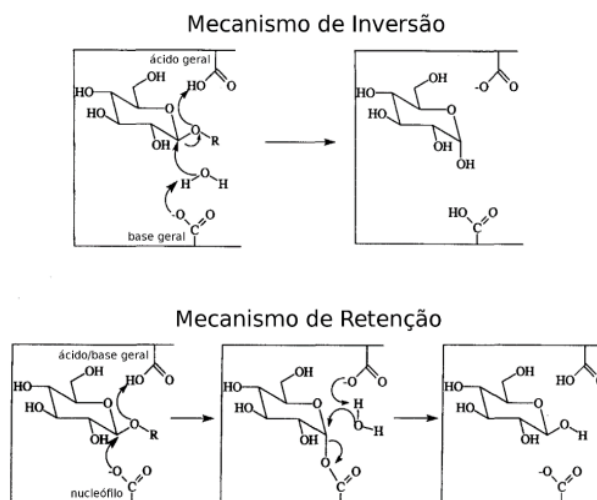


Figura 2: Mecanismos de catálise das Glicosil Hidrolases incluindo as BGs.

FONTE: Adaptado de (McCarter, Withers, 1994)

Na inversão, uma molécula de água ataca o grupo de saída enquanto, o mecanismo de retenção envolve um duplo deslocamento com um intermediário enzima-glicosil (MCCARTER; WITHERS, 1994). O produto da reação catalisada pelas BGL pode inibir a atividade de enzima, competindo com o substrato (celobiose) na interação com o sítio ativo. Portanto,  $\beta$ -glicosidases tolerantes à glicose podem aumentar a produção e reduzir custos (YANG *et al.*, 2015, 2016).

Segundo DE GIUSEPPE *et al.*, (2014), as  $\beta$ -glicosidases da família GH1 tolerantes a inibição por glicose têm um canal profundo e estreito que limita o acesso da glicose ao sítio ativo, enquanto BGL da família GH3 têm a concavidade que leva ao sítio ativo mais larga, o que facilita a entrada do substrato e levar a uma maior atividade catalítica. Entretanto, também facilita a retenção do produto, causando uma maior inibição, mesmo com baixas concentrações de glicose. A figura 03 ilustra a diferença entre os canais que levam ao sítio ativo da  $\beta$ -glicosidases GH1 e GH3.

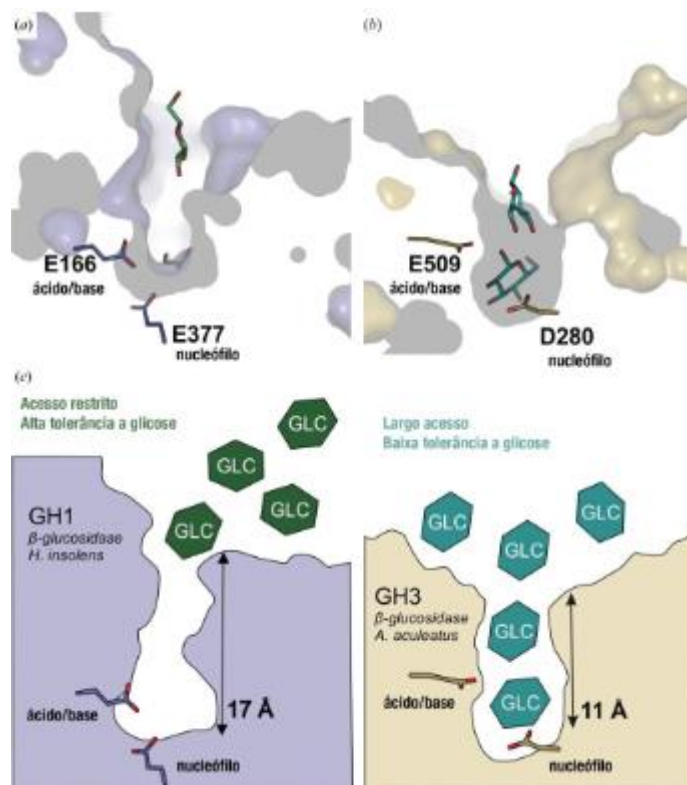


Figura 3: Comparação do acesso ao sítio ativo de  $\beta$ -glicosidases GH1 e GH3(a) Acesso de glicose ao sítio ativo da  $\beta$ -glicosidase glicose-tolerante GH1 de *H. insolens*. (b) Acesso de glicose ao sítio ativo da  $\beta$ -glicosidase GH3 de *A. aculeatus*. Comparação entre bolsões catalíticos de (c) GH1 e GH3: o canal das GH1 é mais profundo e estreito que o das GH3.

Fonte: adaptado de GIUSEPPE et al. (2014).

## 2.2 Imobilização de $\beta$ -glicosidases

Devido à sua natureza proteica, uma grande parcela das enzimas apresenta instabilidade em determinadas condições reacionais. Uma forma de estabilizá-las é o emprego de técnicas de imobilização (SHELDON, 2013). O aumento e a manutenção da estabilidade de enzimas, bem como a reutilização destas proteínas em vários processos é de grande interesse, uma vez que a sua produção ou extração e purificação são processos com alto valor agregado. Dessa forma, a imobilização utilizando técnicas e suportes diversos tem se tornado uma estratégia para garantir a estabilidade e o reuso desses

biocatalisadores (SHELDON *et al.*, 2003; SHELDON, 2011b, 2013).

Existem várias metodologias para se imobilizar enzimas (SHELDON, 2013), que baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte, podendo ser classificados em métodos físicos e químicos. A classificação dos métodos mais utilizados pode ser visualizada na Figura 04.

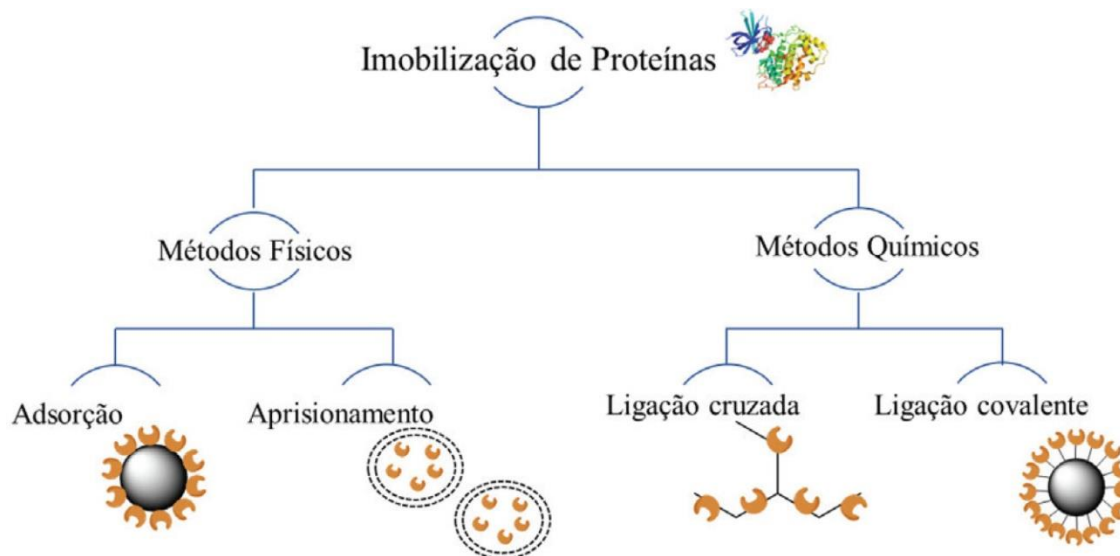


Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas.

FONTE: FURLANI *et al.*, 2020

Os métodos físicos são caracterizados por ligações mais reversíveis, como ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou ligação iônica entre a enzima e o suporte (CHANG *et al.*, 2014; FURLANI *et al.*, 2020). Os métodos químicos envolvem a formação de ligações irreversíveis entre a enzima e o suporte ou por meio de ligações cruzadas entre as moléculas da enzima nas imobilizações sem uso de suporte, obtidas pela ligação de éter, tio-éter, amida ou carbamato nos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais da proteína.

Diferentes técnicas de imobilização podem ser empregadas, no entanto, é importante destacar que com a imobilização a enzima pode sofrer mudanças nas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas. A atividade enzimática será afetada principalmente pelo método de imobilização selecionado, quantidade e pureza da enzima utilizada (SHELDON, 2007).

Vários métodos de imobilização de BGL já foram relatados utilizando diversos suportes sólidos, como a imobilização em quitosana e poliacrilamida,

(ABDEL-FATTAH; OSMAN; ABDEL-NABY, 1997), alginato de sódio (KUMAR *et al.*, 2014), sílica gel (SYNOWIECKI; WOŁOSOWSKA, 2006), alginato de cálcio (SHEN; XIA, 2004; YANG *et al.*, 2015), gel de gelatina (ANGELOTTI, 2013), em Eupergit C(ANGELOTTI, 2013; TU *et al.*, 2006), matrizes de álcool-polivinílico – PVA (SHEN; LARTER, 1994), argila e quitosana (ADLERCREUTZ, 2013), lentilhas de polivinil (ANGELOTTI, 2013) e agregação por ligações cruzadas (CHEN *et al.*, 2012; SHUDDHODANA *et al.*, 2018).

### 2.3 CLEAs

A imobilização em suportes sólidos, além de aumentar o custo do biocatalisador, dilui a atividade volumétrica e reduz a produtividade do biocatalisador(SHELDON, 2013). A imobilização enzimática sem o uso de suporte CLEA, é uma alternativa para contornar esses problemas (SHELDON, 2007). Esse método de imobilização consiste basicamente em duas etapas:

1. Agregação/precipitação das proteínas induzida por agentes precipitantes (sais, solventes orgânicos miscíveis em água, polímeros não iônicos etc.);
2. Reticulação dos agregados formados com um reagente bifuncional (por exemplo, glutaraldeído) via reação com os grupos aminos de resíduos de lisina presentes na superfície da enzima (TALEKAR *et al.*, 2013a).

Entretanto, se a enzima possuir baixa densidade superficial de grupos aminos, a co-precipitação da enzima e uma proteína inerte rica em resíduos de lisina, tal como albumina de soro bovino (BSA), pode contribuir para a formação de CLEAs com alta recuperação de atividade e excelente estabilidade operacional (LIEW *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2006; TALEKAR *et al.*, 2013b).

A técnica de ligação cruzada foi inicialmente descrita por Quioco e Richards em 1964, para promover cristais de proteínas a fim de se realizar estudos estruturais por raio-X. Os autores utilizaram um agente bifuncional, o glutaraldeído, e observaram a formação de cristais de enzima insolúveis com elevada atividade catalítica (cerca de 30% a 70% em comparação aos cristais de enzimas nativas) (TEREZA DE ANDRADE *et al.*, [s.d.]). As enzimas são ligadas umas às outras, formando uma estrutura tridimensional complexa, formada por ligações cruzadas intermoleculares entre a enzima e reagentes bi

ou multifuncionais, com finalidade de torná-las insolúvel ao meio reacional. Os agentes de reticulação são moléculas que possuem ao menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos da enzima (SHELDON, 2008, 2011b; TALEKAR *et al.*, 2013b).

Em busca de corrigir alguns problemas relacionados a técnica CLEAs, como estabilidade, resistência mecânica e recuperação dos cristais ou dificuldade de difusão e transferência de massa através dos cristais reticulados, o método de imobilização evoluiu ao longo dos anos com a inclusão de proteínas espaçadoras inertes, agentes de formação de poros e incorporação de nanopartículas magnéticas ou enzimas combinadas, melhorando a performance e atividade enzimática (SHELDON *et al.*, 2003; MAFRA *et al.*, [s.d.]; SHELDON, 2013).

Poucos trabalhos foram relatados utilizando a técnica CLEAs para imobilização de BGL. ZONG e colaboradores (2012) imobilizaram a BGL oriunda das sementes de ameixa utilizando uma mistura de etanol e isopropanol como agente precipitante e glutaraldeído como agente reticulante, com uma recuperação de 84% da atividade enzimática nos agregados reticulados.

Para promover a liberação de compostos aromáticos em vinhos, AHUMADA e colaboradores (2015), co-imobilizaram BGL e arabinosidase (ARA) por CLEAs avaliando o efeito de albumina de soro bovino como proteína espaçadora e a concentração de glutaraldeído no rendimento de imobilização da enzima e atividade recuperada. Os combi-CLEAs preparados foram mais estáveis do que as enzimas solúveis, o melhor resultado foi obtido em uma razão de massa entre enzima e proteína espaçadora de 0,33. As meias-vidas de BGL e ARA em combi-CLEAs foram 43,9 e 54,9 dias, respectivamente, enquanto no caso das enzimas solúveis foram apenas 1,3 e 6,2 dias, respectivamente. O rendimento de imobilização foi de 79,1 em termos de atividade recuperada para BGL. Alguns exemplos de enzimas já imobilizadas por CLEAS estão descritos na Tabela 1– Lista de enzimas imobilizadas por CLEAS.

Tabela 01 – Lista de enzimas imobilizadas por CLEAS

#	Enzima	Técnica	Origem	AP	AR	AE	Fonte
1	$\beta$ -glicosidase	CLEA	Sementes de ameixa	Etanol	Glutaraldeido	-	Chen et. al (2012)
2	$\beta$ -glicosidase $\alpha$ -L-arabinosidase	Multi-CLEAS	Preparação comercial	Etanol	Glutaraldeido	BSA	Ahumada et. Al (2015)
3	Naringinase	CLEAS	<i>Penicillium decumbens</i>	3-butanol	Glutaraldeido	-	Ribeiro (2011)
4	Invertase	CLEAS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3-butanol	Glutaraldeido	Proteína de soja	Beltrame et. al (2015)
5	$\beta$ -Amylase	CLEAS	Preparação comercial	Sulfato de amônio	Glutaraldeido	Proteína de soja	Silva et. al (2018)
6	Lipase	Multi-CLEAS	<i>Pancreas de porco</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Etanol	Glutaraldeido	Proteína de Soja e BSA	Ramos et. al (2019)
7	Lipase Protease	Multi-CLEA	<i>Viceras de Bagre</i>	Etanol	Glutaraldeido	-	Zang et. al (2015)
8	Lipase	Mag-CLEA	<i>Thermomyces lanuginosu</i>	Mistura de metanol e Isopropanol	Glutaraldeeido	Nanopartulas magneticas	Mohamed et. al (2015)
9	Lipase B	CLEA	<i>Candida antártica</i>	Etanol	Glutaraldeido	Nanoparticula magnética	Picó et. al (2018)
	Lipase	CLEA	<i>Burkholderia cepacia</i>	Acetona	Glutaraldeido	-	Alves et. al (2020)

1 0	Glucose Oxidase Catalase	Multi- CLEA	<i>Aspergillus niger</i> Fígado Bovino	3-butanol	Glutaraldeido	BSA	Mafra et. al (2019)
1 1	Glucose oxidase e peroxidase	Multi- CLEA	<i>Bjerkandera adusta</i>	Polietileno glicol	Glutaraldeido	BSA	Taboada-Puig et. al (2011)
1 2	Xylanase e mannanase	Multi- CLEA	Preparação comercial	Acetona	Glutaraldeido	-	Bhattacharya (2015)
1 3	Celulase	CLEA	Preparação comercial	Sulfato de amônio	Glutaraldeido	-	Perzon et al (2011)
1 4	Fenilalanina Amônia Liase	CLEA	<i>R. glutinis</i>	Sulfato de amônio	Glutaraldeido	Sílica gel	Cui et. al (2013)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho consistiu na preparação e caracterização de um agregado enzimático de  $\beta$ -glicosidase obtida por *A. niger*, a partir do extrato bruto enzimático utilizando glutaraldeído e proteína de soja.

Levando em consideração este aspecto, o objetivo geral do projeto foi alcançado mediante a execução dos seguintes objetivos específicos:

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Produzir a enzima  $\beta$ -glicosidase por fermentação semi-sólida utilizando o fungo *Aspergillus níger*;
- b. Selecionar o melhor solvente para precipitação seletiva da enzima  $\beta$ -glicosidase;
- c. Otimizar o processo de obtenção de compostos reticulados de  $\beta$ -glicosidases a partir do extrato bruto da enzima;
- d. Estudar a influência das variáveis concentração de glutaraldeído, tempo de reticulação e carga de proteína espaçadora na imobilização da enzima  $\beta$ -glicosidases por CLEAs;
- e. Caracterizar bioquimicamente os compostos reticulados quanto a termoestabilidade e efeitos do pH na atividade enzimática;
- f. Comparar as propriedades da  $\beta$ -glicosidase livre e imobilizada;
- g. Determinar algumas características dos CLEAs quanto a estrutura e morfologia do reticulado;
- h. Determinar o tempo de meia-vida do agregado enzimático e estabilidade operacional.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, Ahmed F.; OSMAN, Mona Y.; ABDEL-NABY, Mohamed A. **Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20** *Chemical Engineering Journal*. [s.l.: s.n.].
- ABIR B. MAJUMDER, KALYANI MONDAL, TEJ P. SINGH, Munishwar N. Gupta. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. **Biocatalysis and Biotransformation**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 235–242, 2008.
- ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35446f.
- AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 94, n. August, p. 555–560, 2015. a. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.08.003>.
- AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 94, p. 555–560, 2015. b. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003.
- ANGELOTTI, Joelise de Alencar Figueira. **ESTUDO DA PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA  $\beta$  - GLICOSIDASE DE ASPERGILLUS sp.** 2013. Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2013.
- ARAUJO SILVA, Rafael; MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; KOPP, Willian; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; TARDIOLI, Paulo Waldir. Imobilização De B-Amilase De Cevada Por Agregação/Reticulação (Clea). **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos**, [S. l.], v. XX, n. January 2016, 2015. a. DOI: 10.17648/sinaferm-2015-33594.
- ARAUJO SILVA, Rafael; MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; KOPP, Willian; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; TARDIOLI, Paulo Waldir. IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -AMILASE DE CEVADA POR AGREGAÇÃO/RETICULAÇÃO (CLEA). In: ANAIS DO SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS 2015b, **Anais** [...]. : Galoá, 2015. DOI: 10.17648/sinaferm-2015-33594.
- BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENQUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014. DOI: 10.1039/c3ra45991h.
- BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENQUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015. DOI:

10.1016/j.biotechadv.2015.03.006. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

BLANCH E CLARK. **Biochemical Engineering, Second Edition**. [s.l: s.n.].

BRAFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, [S. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

CAIRNS, James R. Ketuda.; ESEN, Asim.  $\beta$ -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010. a. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.

CAIRNS, James R. Ketuda.; ESEN, Asim.  **$\beta$ -Glucosidases** **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2010. b. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.

CAO, Linqiu; VAN LANGEN, Luuk; SHELDON, Roger A. **Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?** **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2003. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00096-X.

CHANG, Kyung Hoon; JO, Mi Na; KIM, Kee Tae; PAIK, Hyun Dong. Evaluation of glucosidases of *Aspergillus niger* strain comparing with other glucosidases in transformation of ginsenoside Rb1 to ginsenosides Rg3. **Journal of Ginseng Research**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 47–51, 2014. DOI: 10.1016/j.jgr.2013.11.008.

CHEN, Lei; HU, Ying Dan; LI, Ning; ZONG, Min Hua. Cross-linked enzyme aggregates of  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 1673–1678, 2012. DOI: 10.1007/s10529-012-0947-y.

CRESPIM, Elaine et al. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 82, p. 375–380, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.018.

CUNHA, Thiago Martins Da; FERREIRA, Caio Filipe Morais Lucindo; ANGELOTTI, Joelise de Alencar Figueira. Avaliação De Agentes Precipitantes Para Produção De Agregados De Ligação Cruzada (Cleas) Da Enzima B-Glicosidase Produzida Por *Aspergillus Niger* / Evaluation of Precipitating Agents for the Production of Cross-Linked Aggregates (Cleas) of the Enzyme B-Gly. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 80538–80545, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n10-465.

DE GIUSEPPE, Priscila Oliveira; SOUZA, Tatiana De Arruda Campos Brasil; SOUZA, Flavio Henrique Moreira; ZANPHORLIN, Leticia Maria; MACHADO, Carla Botelho; WARD, Richard John; JORGE, Joao Atilio; FURRIEL, Rosa Dos Prazeres Melo; MURAKAMI, Mario Tyago. Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 1631–1639, 2014. DOI: 10.1107/S1399004714006920.

DEL PILAR, María; TORRES, Guauque; FORESTI, María Laura; FERREIRA, María Luján. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.amb-express.com/content/3/1/25>.

DENG, Xu; HE, Tian; LI, Jun; DUAN, Hui Ling; ZHANG, Zhi Qi. Enhanced biochemical characteristics of  $\beta$ -glucosidase via adsorption and cross-linked enzyme aggregate for rapid cellobiose hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 43, n. 12, p. 2209–2217, 2020. DOI: 10.1007/s00449-020-02406-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02406-5>.

E PAINBENI, S VALLES, J POLAINA, A. Flors. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, [S. l.], v. 174, n. 9, p. 3087–91, 1992.

FABIANA FONSECA ZANOELO, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES POLIZELI, HÉCTOR FRANCISCO TRENZI, João Atílio Jorge.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], 2006.

FURLANI, Izadora L.; AMARAL, Bruno S.; OLIVEIRA, Regina V.; CASSA, Quezia B. **Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis** *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170525.

GUPTA, Munishwar N.; RAGHAVA, Smita. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 679, p. 133–145, 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-895-9\_11.

IGARASHI, Kiyohiko; TANI, Tomomi; KAWAI, Rie; SAMEJIMA, Masahiro. Family 3  $\beta$ glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 95, n. 6, p. 572–576, 2003. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80164-0.

KANG, S. W.; KO, E. H.; LEE, J. S.; KIM, S. W. Over-production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 647–650, 1999. DOI: 10.1023/A:1005556523241.

KUMAR, Vinod; YADAV, Sweta; JAHAN, Firdaus; SAXENA, Rajendra Kumar. Organic synthesis of maize starch-based polymer using *Rhizopus oryzae* lipase, scale up, and its characterization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 321–331, 2014. DOI: 10.1080/10826068.2013.803481.

LIEW, Kok Jun; LIM, Lily; WOO, Hui Ying; CHAN, Kok Gan; SHAMSIR, Mohd Shahir; GOH, Kian Mau. Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 115, p. 1094–1102, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.156.

MAFRA, A. C. O.; BELTRAME, M. B.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, M. P. A.; TARDIOLI, P. W. **PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO A PARTIR DE SACAROSE CATALISADA POR AGREGADOS RETICULADOS DE INVERTASE DE S. CEREVISIAE**. [s.l: s.n.].

MATSUURA, Masaru; SASAKI, Jun; MURAO, Sawao. Studies on  $\beta$ -Glucosidases from Soybeans that Hydrolyze Daidzin and Genistin: Isolation and Characterization of an Isozyme. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 1623–

1627, 1995. DOI: 10.1271/bbb.59.1623.

MCCARTER, John D.; WITHERS, Stephen G. **Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis** *Current Opinion in Structural Biology*. [s.l: s.n.].

MENEZES, Farley Souza Ribeiro; DA CRUZ, Gizelly Gomes; LOPES, Matheus de Oliveira; NELSON, David Lee; MARTINS, Tamira Quintiliana Gomes; DE LAIA, Marcelo Luiz. Evaluation of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase production by bacteria and yeasts isolated from a eucalyptus plantation in the cerrado of Minas Gerais. **Revista Ambiente e Agua**, [S. l.], v. 14, n. 4, 2019. DOI: 10.4136/ambi-agua.2324.

MIGUEZ, João P.; GAMA, Rafaela S.; BOLINA, Iara C. A.; DE MELO, Cristiane C.; CORDEIRO, Marcia R.; HIRATA, Daniela B.; MENDES, Adriano A. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 139, p. 296–308, 2018. DOI: 10.1016/j.cherd.2018.09.037.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes** *Biotechnology and Biotechnological Equipment* Diagnosis Press Limited., , 2015. a. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. b. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MONTEIRO, Valdirene N.; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Processos Químicos. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009. Disponível em: [https://static.sistemafieg.org.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista\\_Cientifica\\_Processos\\_Quimicos\\_/2010/processosquimicos\\_052009.pdf#page=9](https://static.sistemafieg.org.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista_Cientifica_Processos_Quimicos_/2010/processosquimicos_052009.pdf#page=9).

OKURA, Nicole S.; SABI, Guilherme J.; CRIVELLENTI, Marcela C.; GOMES, Raphael A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 163, p. 550–561, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021>.

ORLANDELLI, Ravely Casarotti; SPECIAN, Vânia; FELBER, Aretusa Cristina; PAMPHILE, João Alencar. **12-1346 - v.7, n.3, 2012SaBios: Rev. Saúde e Biol.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.revista.grupointegrado.br/sabios/>.

R LUCAS, A ROBLES, G ALVAREZ DE CIENFUEGOS, A. Gálvez.  $\beta$ -glucosidase from

Chalara paradoxa CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 48, p. 3698–3703, 2000.

RAJAN, Akhila; SUDHA, J. D.; ABRAHAM, T. Emilia. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 50–59, 2008. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.07.003.

RIBEIRO, Maria H. L.; RABAÇA, Marco. Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: Novel biocatalysts for naringin hydrolysis. **Enzyme Research**, [S. l.], v. 2011, n. 1, 2011. DOI: 10.4061/2011/851272.

ROCHA, Eveline Angélica Lira de Souza Sales; DE CARVALHO, Anne Virgynnia Oliveira Rolim; DE ANDRADE, Susana Régis Alves; DE MEDEIROS, Ana Cláudia Dantas; TROVÃO, Dilma Maria de Brito Melo; COSTA, Edja Maria Melo de Brito. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 351–355, 2013.

SHAH, Shweta; SHARMA, Aparna; GUPTA, Munishwar N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 351, n. 2, p. 207–213, 2006. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.028.

SHELDON, R. A. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEA R s): stable and recyclable biocatalysts**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.cleatechnologies.com>.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1583–1587, 2008. DOI: 10.1042/bst0351583.

SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 467–477, 2011. a. DOI: 10.1007/s00253-011-3554-2.

SHELDON, Roger A. **Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011. b. DOI: 10.1007/s00253-011-3554-2.

SHELDON, Roger a. Enzyme Immobilization: Why , What and How Why use enzymes ? **the Royal Society of Chemistry**, [S. l.], v. 349, n. 5, p. 273–289, 2013.

SHEN, P.; LARTER, R. Role of substrate inhibition kinetics in enzymatic chemical oscillations. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 1414–1428, 1994. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80615-0.

SHEN, Xueliang; XIA, Liming. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 1363–1367, 2004. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00264-4.

SHUDDHODANA; GUPTA, Munishwar N.; BISARIA, Virendra S. Effectiveness of cross-linked enzyme aggregates of cellulolytic enzymes in hydrolyzing wheat straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 445–450, 2018.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.04.007. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.007>.

SOARES, Aurileide M. B. F.; GONÇALVES, Lizia M. O.; FERREIRA, Ruanna D. S.; DE SOUZA, Jefferson M.; FANGUEIRO, Raul; ALVES, Michel M. M.; CARVALHO, Fernando A. A.; MENDES, Anderson N.; CANTANHÊDE, Welter. Immobilization of papain enzyme on a hybrid support containing zinc oxide nanoparticles and chitosan for clinical applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 243, n. February, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116498.

SYNOWIECKI, Józef; WOŁOSOWSKA, Sylwia. Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 1417–1422, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.028.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, [S. l.], v. 3, n. 31, p. 12485–12511, 2013. a. DOI: 10.1039/c3ra40818c.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. **Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs)** **RSC Advances**, 2013. b. DOI: 10.1039/c3ra40818c.

TEIXEIRAA, Iris S.; MILAGRE, Cintia D. F. **Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores** **Química Nova** Sociedade Brasileira de Química, , 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170538.

TEREZA DE ANDRADE, Lívia; LIZZY, Souza; ALCÂNTARA, Ayra; BENEVIDES, Veríssimo; PESSELA, Costa; MARCELO, João; SANTORO, Matos; RESENDE, Rodrigo R.; MENDES, Adriano A. **IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE**. [s.l: s.n.].

TU, Maobing; ZHANG, Xiao; KURABI, Arwa; GILKES, Neil; MABEE, Warren; SADDLER, Jack. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 151–156, 2006. DOI: 10.1007/s10529-005-5328-3.

VELASCO-LOZANO, Susana; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; MATEOS-DÍAZ, Juan C.; FAVELA-TORRES, Ernesto. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. **Biocatalysis**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2016. DOI: 10.1515/boca-2015-0012. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/boca.2014.1.issue-1/boca-2015-0012/boca-2015-0012.xml>.

VERMA, Ritika; KUMAR, Ashok; KUMAR, Sudhir. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 80, p. 72–79, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.019. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.019>.

WANG, Xudong; CHEN, Zhangjun; LI, Ke; WEI, Xiaodong; CHEN, Zhenbin; RUSO,

Juan M.; TANG, Zhenghua; LIU, Zhen. The study of titanium dioxide modification by glutaraldehyde and its application of immobilized penicillin acylase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 560, p. 298–305, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.10.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.10.001>.

XU, Meng-Qiu; WANG, Shuang-Shuang; LI, Li-Na; GAO, Jian; ZHANG, Ye-Wang. Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates as Biocatalysts. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 460, 2018. a. DOI: 10.3390/catal8100460.

XU, Meng Qiu; WANG, Shuang Shuang; LI, Li Na; GAO, Jian; ZHANG, Ye Wang. **Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts** *Catalysts* MDPI AG, , 2018. b. DOI: 10.3390/catal8100460.

XUE, Rui; WOODLEY, John M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 115, p. 183–195, 2012. a. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.033>.

XUE, Rui; WOODLEY, John M. **Process technology for multi-enzymatic reaction systems** *Bioresource Technology*, 2012. b. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.033.

XUN LI 1, JIANJUN PEI, GUOGAN WU, Weilan Shao. Expression, purification and characterization of a recombinant beta-glucosidase from *Volvarella Volvacea*. **Biotechnol Lett**, [S. l.], v. 18, p. 1369–73, 2005.

YANG, Fang; YANG, Xiaofeng; LI, Zhe; DU, Chenyu; WANG, Jufang; LI, Shuang. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 99, n. 21, p. 8903–8915, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6619-9.

YANG, Jie; XU, Xinqi; YANG, Xiaodan; YE, Xiuyun; LIN, Juan. Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena laccase*: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S. l.], v. 65, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1016/j.jtice.2016.04.025.

### 3. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS

As atividades desenvolvidas no mestrado foram publicadas no periódico indexado *Brazilian Journal of Development* (DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-465>) e um trabalho que será submetido ao *International Journal of Biological Macromolecules*. Essas atividades consistiram na produção da enzima por fermentação em fase sólida e triagem de agentes de precipitação enzimática para a preparação dos CLEAs e na caracterização bioquímica e estrutural dos agregados enzimáticos reticulados.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível preparar um biocatalisador eficiente e estável, devido à sua alta capacidade catalítica e elevado tempo de armazenamento, em comparação a enzima livre.



## **AVALIAÇÃO DE AGENTES PRECIPITANTES PARA PRODUÇÃO DE AGREGADOS DE LIGAÇÃO CRUZADA (CLEAS) DA ENZIMA B-GLICOSIDASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS NIGER***

Thiago Martins da Cunha<sup>1</sup>, Caio Filipe Morais Lucindo Ferreira<sup>2</sup>, Joelise de Alencar Figueira Angelotti<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestrando em Biotecnologia, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas

<sup>2</sup> Graduando em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas

<sup>3</sup> Professora Dra. em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001

joelise.angelotti@unifal-mg.edu.br

### **Resumo**

As enzimas já se apresentam como uma realidade em muitos processos industriais, tornando-os menos nocivos ao meio-ambiente através de sua especificidade, reduzindo produção de sub-produtos e etapas de purificação. Entretanto, para muitas aplicações a perda da estabilidade, assim como o custo se apresentam como entraves para novas aplicações. A técnica de imobilização de enzimas é uma das tecnologias que podem minimizar estes entraves, permitindo a reutilização das mesmas e aumentando sua rigidez e estabilidade operacional. Dentre as técnicas de imobilização, a técnica de Cleas que consiste na reticulação da enzima sem a necessidade de um suporte sólido, através de ligações cruzadas utilizando um agente bifuncional vem chamando atenção devido a combinação de purificação e imobilização em um único estágio. O objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes solventes na precipitação da enzima  $\beta$ -glicosidase para posterior produção de Cleas, os solventes avaliados foram etanol, propanona, metanol, 2-propanol, n-butanol e éter-etílico. Após a precipitação foi realizada a determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas nos sobrenadantes e precipitados. Os autores concluíram que o solvente que apresentou resultados mais promissores para a produção de Cleas de  $\beta$ -glicosidase, foi o solvente 2-propanol que propiciou um maior teor de proteínas em conjunto com maior atividade catalítica no precipitado, permanecendo com 94,4% da atividade residual.

**Palavras-chaves:** Cleas; enzimas fúngicas; imobilização.

## Abstract

Enzymes already present themselves as a reality in many industrial processes, making them less harmful to the environment through their specificity, reducing production of sub-products and purification steps. However, for many applications the loss of stability, as well as the cost present themselves as obstacles to new applications. The enzyme immobilization technique is one of the technologies that can minimize these obstacles, allowing their reuse and increasing their rigidity and operational stability. Among the immobilization techniques, cleas' technique consists of the reticulation of the enzyme without the need for a solid support, through cross-linking using a bifunctional agent has been attracting attention due to the combination of purification and immobilization in a single stage. The objective of this work was to evaluate different solvents in the precipitation of the enzyme  $\beta$ -glycosidase for subsequent production of Cleas, the solvents evaluated were ethanol, propane, methanol, 2-propanol, n-butanol and ether-ethyl. After precipitation, the enzymatic activity and protein concentration were determined in the sobrenadants and precipitates. The authors concluded that the solvent that presented the most promising results for the production of Cleas  $\beta$ -glycosidase was the 2-propanol solvent that provided a higher protein content together with higher catalytic activity in the precipitate, remaining with 94.4% of residual activity.

Key-words: Cleas; fungi enzyme; immobilization.

## 1 INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21) é a enzima responsável pela hidrólise de ligações  $\beta$  1,4 glicosídicas presentes em aril, amino, alquil- $\beta$ -D-glicosídeos e glicosídeos cianogênicos, e oligo e dissacarídeos. Nos mamíferos esta enzima está relacionada ao metabolismo de glicolipídeos para não se acumularem nas células, nas plantas estão relacionadas a mecanismos de defesa e na indústria podem ser utilizadas em um amplo segmento como ração animal, sucos e bebidas, têxtil, farmacêutico e biocombustíveis (Cairns e Essen, 2010)

O recente apelo por técnicas mais sustentáveis minimizando a utilização de processos químicos e agressivos ao meio ambiente, permite o protagonismo da

utilização dos biocatalisadores. As enzimas já são empregadas em muitos processos industriais devido a sua grande especificidade, geração de poucos subprodutos, condições operacionais mais brandas. Todavia, o custo de produção e estabilidade delas continua sendo um entrave para a expansão de sua aplicação em mais segmentos (Hernandez e Fernandez-Lafuente, 2011).

Várias técnicas podem ser utilizadas para mitigar estas desvantagens, dentre elas a imobilização de enzimas oferece a possibilidade de redução de custos através da reutilização do biocatalisador e aumento da estabilidade operacional devido a proteção oferecida pelo suporte ou ligações ao mesmo. Existem diversos métodos de imobilização como encapsulação, adsorção, ligação covalente e ligação cruzada. A escolha do método mais adequado depende de fatores como tipo de enzima, custo, suporte, condições operacionais (Chiou, 2004).

A técnica de Cleas (do inglês cross linkage enzyme aggregates) é um método de imobilização que é conhecida por ser livre de suporte, desta forma permite uma redução de custos, além de não diluir a atividade do biocatalisador em um suporte sólido (Sheldon, 2007). Outra vantagem conhecida é unificar a purificação e imobilização da enzima em um único passo. A técnica consiste na utilização de um agente bi-funcional (geralmente glutaraldéido) para formação de ligações cruzadas com as moléculas de enzima. O primeiro passo da técnica de Cleas é a agregação das proteínas, geralmente são utilizados como agentes precipitantes sais como sulfato de amônio, solventes como acetona, etanol, dentre outros (Hanefield, Gardossi, Magner, 2008).

Diante da grande variedade de solventes disponíveis, e a escassez de trabalhos na literatura sobre imobilização de  $\beta$ -glicosidase pela técnica de Cleas, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes agentes precipitantes e obtenção de um precipitado com elevada atividade catalítica de  $\beta$ -glicosidase para auxiliar utilização desses resultados para posterior obtenção de Cleas de  $\beta$ -glicosidase.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Manutenção da cultura**

A linhagem do fungo *Aspergillus niger* LBA 02 da coleção de culturas do

Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas foi utilizada para a produção de enzimas. O fungo foi cultivado em tubos de meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (PDA) inclinado, durante 3 a 4 dias, a 30°C. Após incubação foi adicionada vaselina estéril aos tubos de ensaio e as culturas serão mantidas a 5°C.

## 2.2 Pré-inóculo e fermentação em meio semissólido de farelo de trigo

Foi realizado um repique, da cultura da linhagem de *Aspergillus niger* LBA 02 cultivada em meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (PDA) inclinado. O fungo foi estriado em outro tubo inclinado contendo PDA com auxílio da alça de platina esterilizada para sua reativação, e os tubos foram incubados durante 3 dias a 30°C.

Ao segundo repique foram adicionados 10 mL de solução estéril de Tween 20 a 0,3% e os esporos liberados com o auxílio da alça de platina. Em seguida foi pipetado 1 mL da solução de esporos e adicionados assepticamente em meio de esporulação contendo 10g de farelo de trigo e 4 mL de solução salina (1,7% p/v de NaPO<sub>4</sub> e 2% p/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O meio de esporulação foi incubado por 3 a 4 dias a 30°C. Após este período foram adicionados 50 mL de solução Tween 20 (0.3% v/v) ao Erlenmeyer contendo o meio de esporulação. O meio foi homogeneizado com o auxílio de bastão de vidro e a suspensão foi filtrada em gaze estéril. A suspensão de esporos foi submetida a contagem em câmara de Neubauer e o volume inoculado determinado pela equação (1).

Equação 1 – Taxa de Inoculo

$$V(\text{mL}) = \frac{\text{massa do meio de cultivo} \times \text{contagem a ser inoculada}}{\text{contagem verificada na câmara de Neubauer}}$$

## 2.3 Produção de β-glicosidase por fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida foi realizada inoculando o volume correspondente a 10<sup>5</sup> de esporos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de meio de cultivo composto por farelo de trigo, previamente esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121°C. Os frascos foram incubados a 30°C durante 5 dias. O meio de cultivo fermentado foi utilizado para produção da β-glicosidase extracelular.

O extrato enzimático foi preparado adicionando-se 50 mL de tampão acetato de sódio pH4,5 0,01 mol.L<sup>-1</sup> aos frascos Erlenmeyers contendo meio de cultivo

fermentado. Os frascos foram agitados a 150 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida as amostras, foram filtradas em gaze estéril. O filtrado foi utilizado como extrato enzimático bruto.

#### **2.4 Avaliação dos agentes precipitantes**

Os seguintes solventes foram avaliados na precipitação da enzima  $\beta$ -glicosidase: acetona, metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, n-butanol, e t-butanol. Para a análise foi adicionando uma alíquota de extrato enzimático bruto e agente precipitante refrigerado em um microtubo de centrifugação (1:4), a mistura foi mantida em um agitador a 150 rpm, a 4 ° C por 30 min, para precipitação das proteínas. Após este intervalo a mistura foi centrifugada a 8.000 RPM a 4 ° C por 5 min. O precipitado foi separado do sobrenadante e resuspendido em solução tampão acetato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4.5. Foi realizada a determinação da atividade enzimática e do teor de proteínas no sobrenadante e o precipitado. O agente precipitante que apresentou a menor atividade enzimática para  $\beta$ -glicosidase no sobrenadante e a melhor atividade enzimática para o sólido ressuspendido foi utilizado para a preparação do CLEAs de  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger*.

#### **2. 5 Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase**

A atividade de  $\beta$  -glicosidase foi determinada como descrito por Matsuura et al. (1995) com modificações. Brevemente o substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -glicosídeo (*p*-NPG) em tampão acetato 0,05M pH 5,0 foi incubado a 50°C com a solução enzimática, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução 0,5 M de carbonato de sódio. E a absorbância das amostras foi determinada a 410 nm (Espectrofotômetro Beckman Coulter DU-640). Foi realizada uma curva de calibração de *p*-nitrofenol na faixa de 5 a 300  $\mu$ mol, nas condições de ensaio. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio por grama de meio de cultivo semissólido.

#### **2.6 Determinação de proteínas**

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de Cleas apresenta como uma grande vantagem de unificar as etapas de purificação e imobilização em um único passo, pois como a primeira etapa consiste na precipitação utilizando diferentes agentes, a escolha do agente adequado para cada sistema enzimático incrementa a purificação do extrato enzimático (Ribeiro e Rabaça, 2011).

Os agentes precipitantes mais utilizados são sais ou mistura de solventes, pelo mecanismo de salting out (Wilson et al., 2009), e já foram relatados na literatura trabalhos utilizando sulfato de amônio, polietileno glicol de diferentes massas moleculares (Cao, Rantwijk, Sheldon, 2007) metanol, propanol, etanol, dentre outros (Gupta e Raghava, 2011).

No presente trabalho foram utilizados os solventes propanona, metanol, etanol, 2-propanol, n-butanol e éter etílico para precipitação da  $\beta$ -glicosidase contida no extrato enzimático. Após a determinação da atividade enzimática determinada utilizando o substrato sintético p-NPG e da determinação de proteínas pelo método de Bradford (1976) os solventes que promoveram a maior precipitação de proteínas aliada a atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase, foi o 2-propanol (94,5% atividade relativa) seguido pelo etanol (92,71% atividade relativa), o que pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

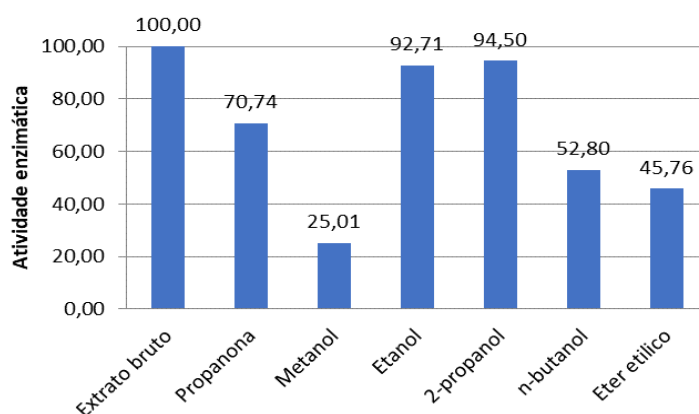


Figura 5 - Atividade enzimática dos precipitados obtidos com os diferentes solventes

Esses agentes precipitantes ao serem adicionados ao extrato causam podem causar a agregação física e subsequente precipitação das moléculas de proteína, os

mecanismos que levam a precipitação podem ser através da alteração das moléculas de água responsáveis de solvatação das moléculas de enzima ou pela alteração da constante dielétrica da solução (Jian e Shi, 2015).

A escolha do solvente inadequado pode levar a desnaturação das proteínas, por exemplos solventes orgânicos podem interagir com resíduos hidrofóbicos no interior da proteína. Essas reações de precipitações de proteínas devem ser conduzidas a baixas temperaturas para minimizar a perda de atividade (FIDO et al., [s.d.]).

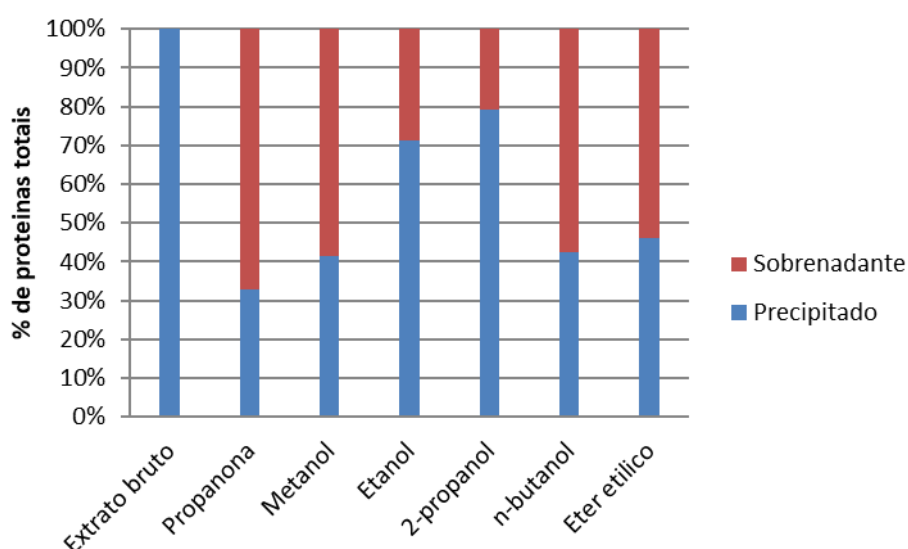


Figura 6 - Análise de proteínas nas amostras de precipitados e sobrenadantes obtidos com os diferentes solventes

De acordo com FIDO et al., [s.d.], solventes bipolares que são miscíveis tanto em substâncias polares com apolares, promovem a remoção da água de solvatação das proteínas causando sua precipitação a baixas temperaturas. O que pode ser observado na Figura 2 e explica o desempenho do etanol e n-propanol que foram os solventes mais eficientes na precipitação das proteínas, precipitando 72,3 e 79,3% das proteínas presentes no extrato, respectivamente. Segundo o autor, a solubilidade das proteínas é um assunto muito complexo e pode ser influenciada por muitos fatores, já que a superfície das mesmas é carregada de cargas devido as cadeias laterais contendo resíduos de aminoácidos e com isso existem regiões polares e hidrofóbicas, que reagem de maneiras diferentes a cada tipo de solvente, sendo necessários ensaios empíricos de cada sistema.

## 4 CONCLUSÃO

Dentre os 6 solventes testados, o etanol e n-propanol se apresentaram adequados, pois precipitaram o maior teor de proteínas preservando a atividade catalítica da enzima. Desta forma, o etanol e n-propanol podem ser utilizados para produção de Cleas de  $\beta$ -glicosidase.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil Capes – Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Ahmed F.; OSMAN, Mona Y.; ABDEL-NABY, Mohamed A. **Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20** *Chemical Engineering Journal*. [s.l: s.n.].

ABIR B. MAJUMDER, KALYANI MONDAL, TEJ P. SINGH, Munishwar N. Gupta. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. **Biocatalysis and Biotransformation**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 235–242, 2008. Disponível em: [https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10242420701685601?casa\\_token=KECQBDnSTkoAAAAA%3ADSjeJOJ1VRCmaLIWuqDEZDUK0Ug9WzZHB8NMSCsiX31OqPHsd6C4BgbX86v-8HwuQIMWuhm2PWIHP8](https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10242420701685601?casa_token=KECQBDnSTkoAAAAA%3ADSjeJOJ1VRCmaLIWuqDEZDUK0Ug9WzZHB8NMSCsiX31OqPHsd6C4BgbX86v-8HwuQIMWuhm2PWIHP8).

ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35446f.

AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 94, n. August, p. 555–560, 2015. a. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.08.003>.

AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 94, p. 555–560, 2015. b. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003.

ANGELOTTI, Joelise de Alencar Figueira. **ESTUDO DA PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA  $\beta$  - GLICOSIDASE DE ASPERGILLUS sp.** 2013. Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2013.

ARAUJO SILVA, Rafael; MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; KOPP, Willian; GIORDANO,



Raquel de Lima Camargo; TARDIOLI, Paulo Waldir. Imobilização De B-Amilase De Cevada Por Agregação/Reticulação (Clea). **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos**, [S. l.], v. XX, n. January 2016, 2015. a. DOI: 10.17648/sinaferm-2015-33594.

ARAUJO SILVA, Rafael; MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; KOPP, Willian; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; TARDIOLI, Paulo Waldir. IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -AMILASE DE CEVADA POR AGREGAÇÃO/RETICULAÇÃO (CLEA). *In*: ANAIS DO SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS 2015b, **Anais** [...]. : Galoá, 2015. DOI: 10.17648/sinaferm-2015-33594.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENQUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014. DOI: 10.1039/c3ra45991h.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENQUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

BLANCH E CLARK. **Biochemical Engineering, Second Edition**. [s.l: s.n.].

BRAFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, [S. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

CAIRNS, James R. Ketuda.; ESEN, Asim.  $\beta$ -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010. a. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.

CAIRNS, James R. Ketuda.; ESEN, Asim.  **$\beta$ -Glucosidases** **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2010. b. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.

CAO, Linqiu; VAN LANGEN, Luuk; SHELDON, Roger A. **Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?** **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2003. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00096-X.

CHANG, Kyung Hoon; JO, Mi Na; KIM, Kee Tae; PAIK, Hyun Dong. Evaluation of glucosidases of *Aspergillus niger* strain comparing with other glucosidases in transformation of ginsenoside Rb1 to ginsenosides Rg3. **Journal of Ginseng Research**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 47–51, 2014. DOI: 10.1016/j.jgr.2013.11.008.

CHEN, Lei; HU, Ying Dan; LI, Ning; ZONG, Min Hua. Cross-linked enzyme aggregates of  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 1673–1678, 2012. DOI: 10.1007/s10529-012-0947-y.

CRESPIM, Elaine et al. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. **International Journal of Biological**

**Macromolecules**, [S. I.], v. 82, p. 375–380, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.018.

CUNHA, Thiago Martins Da; FERREIRA, Caio Filipe Morais Lucindo; ANGELOTTI, Joelise de Alencar Figueira. Avaliação De Agentes Precipitantes Para Produção De Agregados De Ligação Cruzada (Cleas) Da Enzima B-Glicosidase Produzida Por *Aspergillus Niger* / Evaluation of Precipitating Agents for the Production of Cross-Linked Aggregates (Cleas) of the Enzyme B-Gly. **Brazilian Journal of Development**, [S. I.], v. 6, n. 10, p. 80538–80545, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n10-465.

DE GIUSEPPE, Priscila Oliveira; SOUZA, Tatiana De Arruda Campos Brasil; SOUZA, Flavio Henrique Moreira; ZANPHORLIN, Leticia Maria; MACHADO, Carla Botelho; WARD, Richard John; JORGE, Joao Atilio; FURRIEL, Rosa Dos Prazeres Melo; MURAKAMI, Mario Tyago. Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. I.], v. 70, n. 6, p. 1631–1639, 2014. DOI: 10.1107/S1399004714006920.

DEL PILAR, María; TORRES, Guaque; FORESTI, María Laura; FERREIRA, María Luján. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.amb-express.com/content/3/1/25>.

DENG, Xu; HE, Tian; LI, Jun; DUAN, Hui Ling; ZHANG, Zhi Qi. Enhanced biochemical characteristics of  $\beta$ -glucosidase via adsorption and cross-linked enzyme aggregate for rapid cellobiose hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. I.], v. 43, n. 12, p. 2209–2217, 2020. DOI: 10.1007/s00449-020-02406-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02406-5>.

E PAINBENI, S VALLES, J POLAINA, A. Flors. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, [S. I.], v. 174, n. 9, p. 3087–91, 1992.

FABIANA FONSECA ZANOELO, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES POLIZELI, HÉCTOR FRANCISCO TERENCE, João Atilio Jorge.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, [S. I.], 2006.

FURLANI, Izadora L.; AMARAL, Bruno S.; OLIVEIRA, Regina V.; CASSA, Quezia B. **Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis** *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170525.

GUPTA, Munishwar N.; RAGHAVA, Smita. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. I.], v. 679, p. 133–145, 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-895-9\_11.

IGARASHI, Kiyohiko; TANI, Tomomi; KAWAI, Rie; SAMEJIMA, Masahiro. Family 3  $\beta$ glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. I.], v. 95, n. 6, p. 572–576, 2003. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80164-0.

KANG, S. W.; KO, E. H.; LEE, J. S.; KIM, S. W. Over-production of  $\beta$ -glucosidase by

*Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 647–650, 1999. DOI: 10.1023/A:1005556523241.

KUMAR, Vinod; YADAV, Sweta; JAHAN, Firdaus; SAXENA, Rajendra Kumar. Organic synthesis of maize starch-based polymer using *Rhizopus oryzae* lipase, scale up, and its characterization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 321–331, 2014. DOI: 10.1080/10826068.2013.803481.

LIEW, Kok Jun; LIM, Lily; WOO, Hui Ying; CHAN, Kok Gan; SHAMSIR, Mohd Shahir; GOH, Kian Mau. Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 115, p. 1094–1102, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.156.

MAFRA, A. C. O.; BELTRAME, M. B.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, M. P. A.; TARDIOLI, P. W. **PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO A PARTIR DE SACAROSE CATALISADA POR AGREGADOS RETICULADOS DE INVERTASE DE S. CEREVISIAE**. [s.l: s.n.].

MATSUURA, Masaru; SASAKI, Jun; MURAO, Sawao. Studies on  $\beta$ -Glucosidases from Soybeans that Hydrolyze Daidzin and Genistin: Isolation and Characterization of an Isozyme. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 1623–1627, 1995. DOI: 10.1271/bbb.59.1623.

MCCARTER, John D.; WITHERS, Stephen G. **Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis** *Current Opinion in Structural Biology*. [s.l: s.n.].

MENEZES, Farley Souza Ribeiro; DA CRUZ, Gizelly Gomes; LOPES, Matheus de Oliveira; NELSON, David Lee; MARTINS, Tamira Quintiliana Gomes; DE LAIA, Marcelo Luiz. Evaluation of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase production by bacteria and yeasts isolated from a eucalyptus plantation in the cerrado of Minas Gerais. **Revista Ambiente e Agua**, [S. l.], v. 14, n. 4, 2019. DOI: 10.4136/ambi-agua.2324.

MIGUEZ, João P.; GAMA, Rafaela S.; BOLINA, Iara C. A.; DE MELO, Cristiane C.; CORDEIRO, Marcia R.; HIRATA, Daniela B.; MENDES, Adriano A. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 139, p. 296–308, 2018. DOI: 10.1016/j.cherd.2018.09.037.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes** *Biotechnology and Biotechnological Equipment* Diagnosis Press Limited., , 2015. a. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. b. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MONTEIRO, Valdirene N.; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Processos Químicos. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009. Disponível em: [https://static.sistemafieg.org.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista\\_Cientifica\\_Processos\\_Quimicos\\_/2010/processosquimicos\\_052009.pdf#page=9](https://static.sistemafieg.org.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista_Cientifica_Processos_Quimicos_/2010/processosquimicos_052009.pdf#page=9).

OKURA, Nicole S.; SABI, Guilherme J.; CRIVELLENTI, Marcela C.; GOMES, Raphael A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 163, p. 550–561, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021>.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti; SPECIAN, Vânia; FELBER, Aretusa Cristina; PAMPHILE, João Alencar. **12-1346 - v.7, n.3, 2012SaBios: Rev. Saúde e Biol.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.revista.grupointegrado.br/sabios/>.

R LUCAS, A ROBLES, G ALVAREZ DE CIENFUEGOS, A. Gálvez.  $\beta$ -glucosidase from *Chalara paradoxa* CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 48, p. 3698–3703, 2000.

RAJAN, Akhila; SUDHA, J. D.; ABRAHAM, T. Emilia. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 50–59, 2008. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.07.003.

RIBEIRO, Maria H. L.; RABAÇA, Marco. Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: Novel biocatalysts for naringin hydrolysis. **Enzyme Research**, [S. l.], v. 2011, n. 1, 2011. DOI: 10.4061/2011/851272.

ROCHA, Eveline Angélica Lira de Souza Sales; DE CARVALHO, Anne Virgynnia Oliveira Rolim; DE ANDRADE, Susana Régis Alves; DE MEDEIROS, Ana Cláudia Dantas; TROVÃO, Dilma Maria de Brito Melo; COSTA, Edja Maria Melo de Brito. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 351–355, 2013.

SHAH, Shweta; SHARMA, Aparna; GUPTA, Munishwar N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 351, n. 2, p. 207–213, 2006. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.028.

SHELDON, R. A. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.cleatechnologies.com>.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1583–1587, 2008. DOI: 10.1042/bst0351583.

SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of

cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 467–477, 2011. a. DOI: 10.1007/s00253-011-3554-2.

SHELDON, Roger A. **Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011. b. DOI: 10.1007/s00253-011-3554-2.

SHELDON, Roger a. Enzyme Immobilization: Why, What and How Why use enzymes? **the Royal Society of Chemistry**, [S. l.], v. 349, n. 5, p. 273–289, 2013.

SHEN, P.; LARTER, R. Role of substrate inhibition kinetics in enzymatic chemical oscillations. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 1414–1428, 1994. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80615-0.

SHEN, Xueliang; XIA, Liming. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 1363–1367, 2004. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00264-4.

SHUDDHODANA; GUPTA, Munishwar N.; BISARIA, Virendra S. Effectiveness of cross-linked enzyme aggregates of cellulolytic enzymes in hydrolyzing wheat straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 445–450, 2018. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.04.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.007>.

SOARES, Aurileide M. B. F.; GONÇALVES, Lizia M. O.; FERREIRA, Ruanna D. S.; DE SOUZA, Jefferson M.; FANGUEIRO, Raul; ALVES, Michel M. M.; CARVALHO, Fernando A. A.; MENDES, Anderson N.; CANTANHÊDE, Welter. Immobilization of papain enzyme on a hybrid support containing zinc oxide nanoparticles and chitosan for clinical applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 243, n. February, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116498.

SYNOWIECKI, Józef; WOŁOSOWSKA, Sylwia. Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 1417–1422, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.028.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, [S. l.], v. 3, n. 31, p. 12485–12511, 2013. a. DOI: 10.1039/c3ra40818c.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. **Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs)** **RSC Advances**, 2013. b. DOI: 10.1039/c3ra40818c.

TEIXEIRAA, Iris S.; MILAGRE, Cintia D. F. **Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores** **Quimica Nova** Sociedade Brasileira de Química, , 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170538.

TEREZA DE ANDRADE, Livia; LIZZY, Souza; ALCÂNTARA, Ayra; BENEVIDES,

Veríssimo; PESSELA, Costa; MARCELO, João; SANTORO, Matos; RESENDE, Rodrigo R.; MENDES, Adriano A. **IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE**. [s.l.: s.n.].

TU, Maobing; ZHANG, Xiao; KURABI, Arwa; GILKES, Neil; MABEE, Warren; SADDLER, Jack. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 151–156, 2006. DOI: 10.1007/s10529-005-5328-3.

VELASCO-LOZANO, Susana; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; MATEOS-DÍAZ, Juan C.; FAVELA-TORRES, Ernesto. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. **Biocatalysis**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2016. DOI: 10.1515/boca-2015-0012. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/boca.2014.1.issue-1/boca-2015-0012/boca-2015-0012.xml>.

VERMA, Ritika; KUMAR, Ashok; KUMAR, Sudhir. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 80, p. 72–79, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.019>.

WANG, Xudong; CHEN, Zhangjun; LI, Ke; WEI, Xiaodong; CHEN, Zhenbin; RUSO, Juan M.; TANG, Zhenghua; LIU, Zhen. The study of titanium dioxide modification by glutaraldehyde and its application of immobilized penicillin acylase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 560, p. 298–305, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.10.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.10.001>.

XU, Meng-Qiu; WANG, Shuang-Shuang; LI, Li-Na; GAO, Jian; ZHANG, Ye-Wang. Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates as Biocatalysts. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 460, 2018. a. DOI: 10.3390/catal8100460.

XU, Meng Qiu; WANG, Shuang Shuang; LI, Li Na; GAO, Jian; ZHANG, Ye Wang. **Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts** Catalysts MDPI AG, , 2018. b. DOI: 10.3390/catal8100460.

XUE, Rui; WOODLEY, John M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 115, p. 183–195, 2012. a. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.033>.

XUE, Rui; WOODLEY, John M. **Process technology for multi-enzymatic reaction systems** **Bioresource Technology**, 2012. b. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.033.

XUN LI 1, JIANJUN PEI, GUOGAN WU, Weilan Shao. Expression, purification and characterization of a recombinant beta-glucosidase from *Volvariella Volvacea*. **Biotechnol Lett**, [S. l.], v. 18, p. 1369–73, 2005.

YANG, Fang; YANG, Xiaofeng; LI, Zhe; DU, Chenyu; WANG, Jufang; LI, Shuang. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 99, n. 21, p. 8903–8915, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-

6619-9.

YANG, Jie; XU, Xinqi; YANG, Xiaodan; YE, Xiuyun; LIN, Juan. Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena laccase*: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S. l.], v. 65, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1016/j.jtice.2016.04.025.

## Sequential strategy to prepare cross-linked $\beta$ -glucosidase aggregates: Biochemical and morphological characterization

Thiago Martins da Cunha<sup>1</sup>, Adriano Aguiar Mendes<sup>2</sup>, Daniela Bataglia Hirata<sup>2</sup>,  
Joelise de Alencar Figueira Angelotti<sup>2</sup>

1 Mestrando em Biotecnologia, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas

2 Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001  
joelise.angelotti@unifal-mg.edu.br

### Resumo

Dentre os vários protocolos de imobilização de enzimas, a técnica CLEA – cross-linked enzyme aggregation, se destaca por combinar purificação e imobilização enzimática em um único estágio. Apesar de ser uma técnica relevante nesse campo de estudo, poucos trabalhos foram relatados sobre a imobilização de  $\beta$ -glicosidases microbianas por CLEAs. Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar a concentração de um agente reticulante (X1) e um agente espaçador (X2), na imobilização de  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* por CLEAs, através da metodologia planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, sendo 11 ensaios (3 pontos centrais) e caracterizar as propriedades bioquímicas dos derivados. Após a análise dos dados do planejamento experimental, com um nível de 90% de confiança, as duas variáveis foram significativas. A análise da variância (ANOVA) demonstrou que o modelo usando todos os coeficientes pode ser utilizado para gerar a superfície de resposta para análise dos efeitos das variáveis na produção de CLEAs de  $\beta$ -glicosidase com 82% das respostas explicadas para o modelo. Foi observada a alteração das condições ótimas de temperatura e pH de atividade de 60°C para 50 – 65°C e de pH 4,5 para pH 3,5 – 4,0 nos derivados. Os mesmos ainda foram menos suscetíveis as condições de temperatura e pH do meio reacional e sofrerem menos inibição pelo substrato que a enzima livre. Após comparação das características bioquímicas e morfológicas dos derivados com a enzima livre há indícios que os derivados são mais robustos em condições operacionais há variações do meio reacional.

Palavras chave: CLEAs; reticulação; hidrolases; glutaraldeído.



## 1 Introdução

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas e que, graças ao advento da biotecnologia, podem ser aplicadas industrialmente em processos geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis que os processos tradicionais. Diferentes técnicas têm sido propostas para imobilização enzimática, uma vez que a imobilização adequada pode melhorar a estabilidade térmica e operacional do biocatalisador resultante, deixando os bioprocessos menos onerosos e mais atrativos do ponto de vista ambiental e econômico (ARAUJO SILVA *et al.*, 2015b; MONTEIRO; NASCIMENTO SILVA, 2009; XU *et al.*, 2018b; XUE; WOODLEY, 2012b).

A técnica de imobilização enzimática CLEAs – Cross linked enzyme aggregation, é uma tecnologia de imobilização de enzimas simples e barata, que dispensa o uso de suportes físicos, concentrando o poder catalítico enzimático em um sólido poroso e com um pequeno volume. A metodologia de ligação cruzada foi inicialmente descrita por Quiocho e Richards em 1964, para promover a cristalização de proteínas, possibilitando a realização de estudos estruturais por raio-X. Essa técnica pode ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas, mas ainda há a necessidade de estudos mais aprofundados com respeito a morfologia adquirida após o processo de reticulação, dada a possível formação de grandes aglomerados que resultam, muitas vezes, em dificuldades difusionais do substrato e do produto no ambiente catalítico (ARAUJO *et al.*, 2015a; PILAR *et al.*, 2013; SHELDON, 2008).

Os CLEAs podem ser preparados basicamente em duas etapas. Primeiramente as enzimas passam por uma agregação/precipitação induzida por agentes precipitantes como sais, solventes orgânicos miscíveis em água, polímeros não iônicos etc. Após a precipitação, os agregados formados são entrecruzados/reticulados, geralmente via reação de Maillard, onde com os grupos aminos de resíduos de lisina, grupos sulfidril de cisteína, grupos OH fenólicos de tirosina ou grupo imidazol de histidina, presentes na superfície da enzima reagem com grupos carbonila na extremidade de um reagente bifuncional, como o glutaraldeído (MOHAMAD *et al.*, 2015b; SHELDON, 2008, 2011a).

O emprego de ligações cruzadas é um método de imobilização irreversível. As enzimas são ligadas umas às outras, formando uma estrutura tridimensional complexa, formada por ligações cruzadas intermoleculares entre a enzima e

reagentes bi ou multifuncionais, com finalidade de torná-las insolúvel ao meio reacional (CAO *et al.*, 2003 ; SHELDON, 2003; TALEKAR *et al.*, 2013a).

Quando a enzima possui baixa densidade superficial de grupos aminos, a co-precipitação da enzima e uma proteína inerte rica em resíduos de lisina, tal como albumina de soro bovino (BSA), pode contribuir para a formação de CLEAs com alta recuperação de atividade e estabilidade operacional. A proteína isolada de soja tem sido utilizada como alternativa de baixo custo a BSA (SHAH *et al.*, 2006; SHELDON, 2008).

Apesar de ser uma técnica muito explorada em diversos complexos enzimáticos, como  $\alpha$ -L-arabinosidase (AHUMADA *et al.*, 2015a), invertase (MAFRA *et al.*, [s.d.]), naringinase (RIBEIRO, 2011),  $\beta$ -amylase (SILVA *et al.*, 2015a), lipases (MOHAMAD *et al.*, 2015b; ROCHA *et al.*, 2013); lipase e protease (FURLANI *et al.*, 2020), glicose oxidase e catalase, (MAFRA *et al.*, [s.d.]), poucos trabalhos foram relatados utilizando a técnica CLEAs para imobilização de  $\beta$ -glicosidases.

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações  $\beta$  - 1,4 glicosídicas presentes em aril, amino, alquil- $\beta$ -D-glicosídeos e glicosídeos cianogênicos, e oligo e dissacarídeos. Essa classe de enzimas catalisam diversas reações de interesse na indústria, nos mais diferentes segmentos, onde vem atraindo atenção considerável nos últimos anos devido a seus papéis importantes em vários processos biotecnológicos, como a hidrólise de glicolipídeos e glicosídeos exógenos em animais, a hidrólise de isoflavonóides glicosídeos, reações de lignificação, catabolismo da parede celular de celo-oligossacarídeos, mecanismos de defesa, ativação de fito-hormônios conjugados, liberação de compostos de aroma em plantas, liberação de compostos aromáticos de precursores de aroma e sabor na indústria de bebidas, a produção de etanol combustível de segunda geração a partir de resíduos agrícolas, etc (ANGELOTTI, 2013; ARAUJO *et al.*, 2015b; CAIRNS *et al.*, 2010a; CHEN *et al.*, 2012; TU *et al.*, 2006).

Em um trabalho realizado por Zong e colaboradores (CHEN *et al.*, 2012), a enzima  $\beta$ -glicosidase de sementes de ameixa foi imobilizada pela técnica de CLEAs, utilizando uma mistura de etanol e isopropanol como agente precipitante e glutaraldeído (20 mM) como agente reticulante. Os autores obtiveram uma recuperação de 84% da atividade enzimática nos agregados reticulados. Para promover a liberação de compostos aromáticos em vinhos, Ahumada e colaboradores (AHUMADA *et al.*, 2015b), co-imobilizaram  $\beta$ -glicosidase e arabiosidase por CLEAs

avaliando o efeito de BSA como proteína espaçadora e a concentração de glutaraldeído no rendimento de imobilização da enzima e atividade recuperada. Os CLEAs preparados foram mais estáveis do que as enzimas solúveis e o melhor resultado foi obtido em uma razão de massa entre enzima e proteína espaçadora de 0,33. O rendimento de imobilização foi de 79,1% em termos de atividade recuperada para  $\beta$ -glicosidase.

Assim, considerando a escassez de dados para aplicação da técnica CLEAs em  $\beta$ -glicosidase microbianas, o objetivo deste trabalho foi promover o estudo da imobilização de  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21) de *A. niger* por CLEAs, otimização da obtenção dos CLEAS utilizando a ferramenta de planejamento experimental e caracterização bioquímica dos derivados e sua comparação com a enzima livre, com o intuito de contribuir para o avanço da tecnologia de imobilização de enzimas e consolidação de aplicação das  $\beta$ -glicosidase em bioprocessos.

#### **4 Metodologia**

A produção, extração e precipitação da  $\beta$ -glicosidase foram realizadas de acordo com Cunha (CUNHA; FERREIRA; ANGELOTTI, 2020). Os CLEAs foram preparados de acordo com Gupta e Raghava (GUPTA; RAGHAVA, 2011), com modificações, sendo utilizado glutaraldeído como Agente Reticulador - AR e Proteína Isolada de Soja como Agente Espaçador – AE após precipitação da enzima com n-propanol. O protocolo de preparação dos CLEAs está descrito na Figura 07.

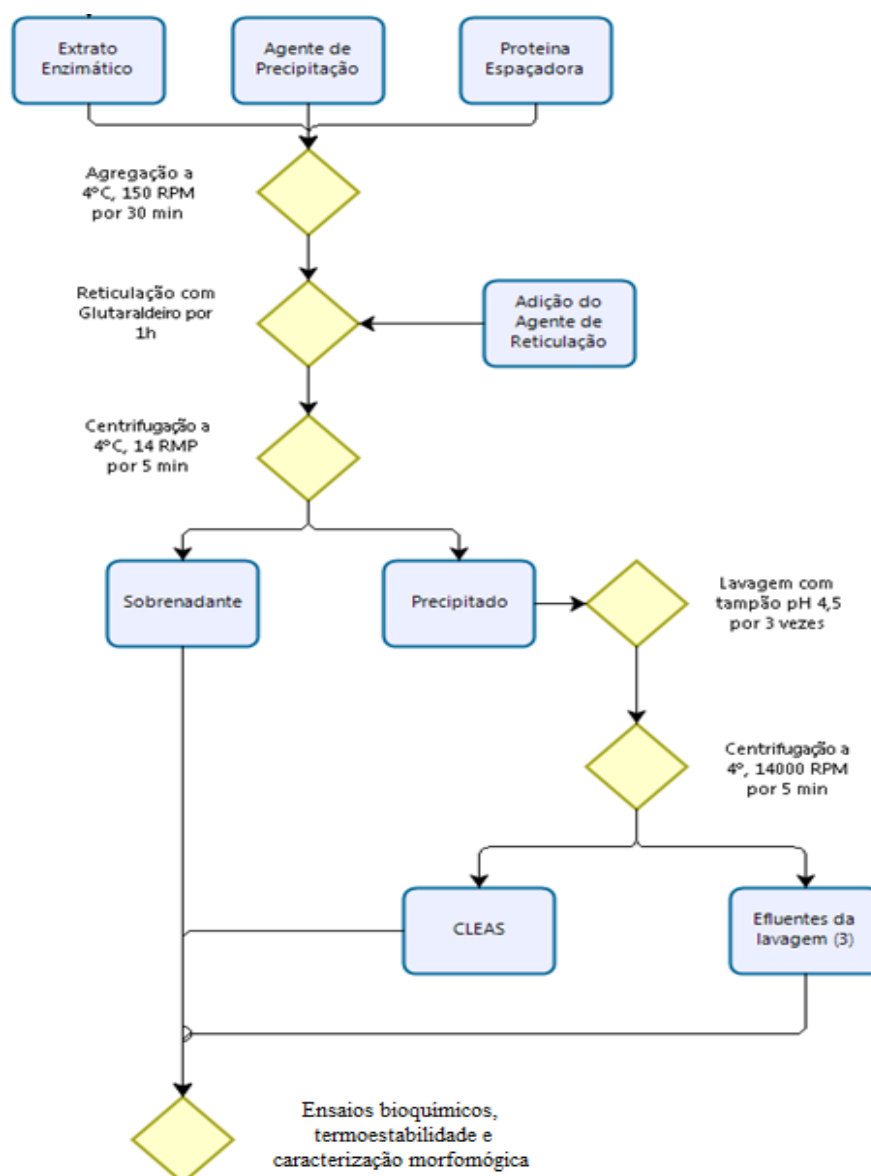


Figura 7 - Fluxograma preparo dos CLEAs

### 2.1 Determinação da atividade enzimática para $\beta$ -glicosidase

A atividade de  $\beta$  – glicosidase foi determinada como descrito por Matsuura et al. (1995) com modificações (MATSUURA; SASAKI; MURAO, 1995). Alíquotas de 300  $\mu$ L de solução 5mM de  $p$ - nitrofenil- $\beta$ -glicosídeo ( $p$ -NPG) em tampão acetato 0,05M pH 4,5 foram pré- incubadas a 50°C por 5 minutos, após este período foi realizada a adição de 300  $\mu$ L de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50°C por 15 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 300  $\mu$ L de solução 0,5 M e carbonato de sódio. A hidrólise do substrato sintético ( $p$ -NPG) foi estimada pela medida da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro UV/Vis em cubeta de quartzo. A quantidade de  $p$ -nitrofenol liberada foi determinada usando curva padrão

de p-nitrofenol na faixa de 5 a 300  $\mu\text{mol}$ . Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de p- nitrofenol por minuto.

## 2.2 Determinação de Proteínas totais.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

## 2.3 Planejamento experimental

Os parâmetros AE (razão 1–10), determinado em função do teor de proteínas totais adicionadas em relação ao teor de proteínas totais no extrato enzimático, e AR (na faixa de 1 – 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), com um tempo de reticulação de 60 min, foram estudados pela metodologia de planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  ( $2^2 = 11$  experimentos incluindo 11 ensaios, sendo 4 deles nas condições axiais e 3 repetições no ponto central), para avaliar a influência das variáveis independentes AE e AR na atividade dos CLEAs, expressa em  $\text{U.mL}^{-1}$ . As variáveis e os níveis estudados estão descritos na Tabela 02.

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X1 AE*	0,0	1,37	4,69	8,00	9,37
X2 AR** (mM)	1,0	8,12	25,50	42,88	50,0

\*Agente espaçador – proteína isolada de soja

\*\*Agente reticulante – Glutaraldeído.

## 2.4 Estudo da influência do tempo de reticulação

Após otimização dos parâmetros avaliados pelo planejamento experimental, foi realizado o estudo da influência do tempo de reticulação (15–120min)\* para preparação dos CLEAs de  $\beta$ -glicosidases. O rendimento global da imobilização foi calculado pela razão da atividade enzimática dos derivados e da enzima livre, nas

mesmas condições.

## **2.5 Caracterização bioquímica**

### **2.5.1 Determinação da temperatura ótima de atividade**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado para a enzima livre e imobilizada em temperaturas na faixa de 40°C a 80°C. A enzima na forma livre e imobilizada foi incubada por 15 min em solução 5 mM do substrato sintético p- NPG em tampão acetato 0,05M pH 4.5. A reação foi interrompida pela adição de carbonato de sódio 0,5M e a atividade enzimática determinada conforme o item 2.1.

### **2.5.2 Determinação do pH ótimo de atividade**

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi determinado na faixa de pHs entre 2.0 a 7.0 para as enzimas livre e imobilizada. As soluções do substrato p-NPG 5mmol.L<sup>-1</sup> foi preparada nos diferentes pH em tampão acetado e em seguida foi incubada - em em tampão na temperatura ótima de atividade durante um intervalo de 15 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 2.1.

### **2.5.3 Determinação do pH e temperatura de estabilidade**

Os ensaios de estabilidade à temperatura foram realizados no pH ótimo de atividade dos derivados. Na ausência de substrato, as enzimas foram incubadas na solução tampão durante o tempo de 1 a 5 horas nas temperaturas na faixa de 40 a 70°C. Após os intervalos de incubação de 1 hora, foi realizado o teste de atividade para avaliar a atividade residual da enzima.

Os ensaios de estabilidade ao pH foram realizados na temperatura ótima de atividade. Na ausência de substrato, a enzima livre e a imobilizada foram incubadas por 1 a 5 horas nas soluções na faixa de pHs 3,0 a 6,0. Após a incubação foi realizado o teste de atividade para avaliar a atividade residual da enzima.

### **2.5.4 Determinação do efeito ativador e inibidor de íons**

O efeito de íons ou moléculas que possam inibir ou ativar as β-glicosidases também foi avaliado. Os testes foram realizados nas condições ótimas de pH e

temperatura encontrados para a enzima imobilizada e livre. O efeito da concentração de íons foi determinado sobre a atividade enzimática dos CLEAs, a enzima livre e imobilizada foi adicionada a um tubo de ensaio contendo soluções de 5 mM do substrato p-NPG adicionados de 5 mM de íons (AlCl<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, EDTA, HgCl<sub>2</sub>, KCl, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, NaCl e ZnCl<sub>2</sub>) em tampão nas condições do ensaio por 15 min. A atividade enzimática foi determinada de acordo com item 2.1.

### 2.5.5 Determinação do efeito da concentração do substrato

A influência da concentração de substrato na atividade da enzima livre e imobilizada foi avaliada no intervalo de 1 a 100 mM de p- nitrofenil-β-glicosídeo (p-NPG). Alíquotas de 300 μL de solução de p-NPG em tampão acetato 5 mM pH 4,5 foram mantidas a 50°C por 5 minutos. A reação de hidrólise foi realizada após a adição de 300 μL de solução enzimática e a mistura foi mantida por 15 min nas condições de ensaio. A reação foi interrompida pela adição de carbonato de sódio 0,5M e a atividade enzimática aferida de acordo com item 2.1.

Neste estudo, os modelos cinéticos de Michaelis-Menten na ausência (1) e presença de inibição pelo substrato (2) foram ajustados aos dados experimentais para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes da enzima (SHEN; LARTER, 1994).

Equação 2 – Modelo cinético na ausência de inibição pelo substrato

$$v = \frac{v_{\max} \times S}{k_m + S}$$

Equação 3 - Modelo cinético na presença de inibição pelo substrato

$$v = \frac{v_{\max} \times S}{k_m + S + \frac{S}{K_i^2}}$$

Em que:  $v$  é a atividade hidrolítica (U/mL),  $v_{m\acute{a}x}$  é a máxima atividade hidrolítica (U/mL),  $S$  é a concentração de substrato (mM),  $k_m$  é a constante de Michaelis-Menten (mM) e  $K_i$  é a constante de inibição (mM).

Os dados experimentais são representados pela média  $\pm$  desvio padrão de três replicações. O ajuste foi realizado usando o software OriginPro versão 5.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

### **2.5.6 Caracterização físico-química dos derivados**

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) foram obtidas para o derivado e para a enzima livre precipitada utilizando o equipamento SII TG/DTA7300 Exstar, na faixa de 25 - 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °Cmin<sup>-1</sup>, sob atmosfera inerte, utilizando nitrogênio a uma vazão constante de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Os derivados foram ainda submetidos à análise de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR, com equipamento Shimadzu, modelo Affinity-1, acoplado à um acessório de amostragem por refletância total atenuada Pike Miracle com cristais de ZnSe, no intervalo de comprimento de onda de 400 - 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4cm<sup>-1</sup>.

### **2.6 Determinação do tempo de armazenamento**

Os ensaios de estabilidade dos derivados foram conduzidos através de determinações da atividade enzimática conforme item 2.1 do derivado e da enzima livre a cada 15 dias, por um período de 5 meses. As amostras de enzima livre e enzima imobilizada foram estocadas a 4 °C.

### **2.7 Análise estatística**

Para o planejamento experimental, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATISTICA 8.0.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Planejamento Experimental**



Os níveis utilizados bem como os valores codificados e reais, e a resposta experimental e predita pelo modelo estão apresentados na Tabela 3. Nas condições estudadas, os valores de resposta variaram entre 8,1 e 32,8% de atividade relativa de  $\beta$ -glicosidase. A normalidade dos dados foi checada com os testes de Shapiro-Wilk para aplicação dos testes estatísticos.

*Tabela 3 – Matriz do delineamento e respostas para otimização da imobilização de  $\beta$ -glicosidase por CLEAs.*

Ensaio	Variáveis Codificadas		Resposta	
	Proteína espaçadora	Glutaraldeído (mM)	Atividade Relativa (%)	Atividade Predita
1	-1 (1,37)	-1 (8,12)	8,1	21,3
2	1 (8,00)	-1 (8,12)	9,1	12,2
3	-1 (1,37)	1 (42,88)	21,5	36,2
4	1 (8,00)	1 (42,88)	21,7	27,2
5	-1,41 (0,00)	0 (25,50)	27,7	38,3
6	1,41 (9,37)	0 (25,50)	27,2	25,5
7	0 (4,69)	-1,41 (1,00)	9,1	6,0
8	0 (4,69)	1,41 (1,00)	33,1	27,2
9	0 (4,69)	0 (25,50)	32,2	31,9
10	0 (4,69)	0 (25,50)	30,8	31,9
11	0	0	32,8	31,9

Os pontos centrais apresentaram baixa variação, o que indica uma boa reprodutibilidade do processo. Na Tabela 4 observou-se que os efeitos estudados foram significativos para o termo quadrático da variável X1, e o termo linear e quadrático da variável (X2), a um nível de significância de 90%. Assim, a Equação 3 pode descrever o processo.

*Tabela 4 - Coeficientes estimados significativos, erro padrão e p-valores para a atividade relativa, com  $\alpha = 10\%$ .*

Variáveis	Coeficientes	Erro padrão	p-valores
Média	31,93	2,92	0,000012
$x_1^2$	-4,54	2,13	0,070529
$x_2$	7,49	1,79	0,004081
$x_2^2$	-7,71	2,13	0,008472

$$\text{Atividade relativa (\%)} = 31,93 - 4,54x_1^2 + 7,49x_2 - 7,71x_2^2 \quad (3)$$

Onde:

X1 = Proteína espaçadora

X2 = Concentração de glutaraldeído

Atividade Relativa = U.mL<sup>-1</sup> nos derivados em relação a enzima livre

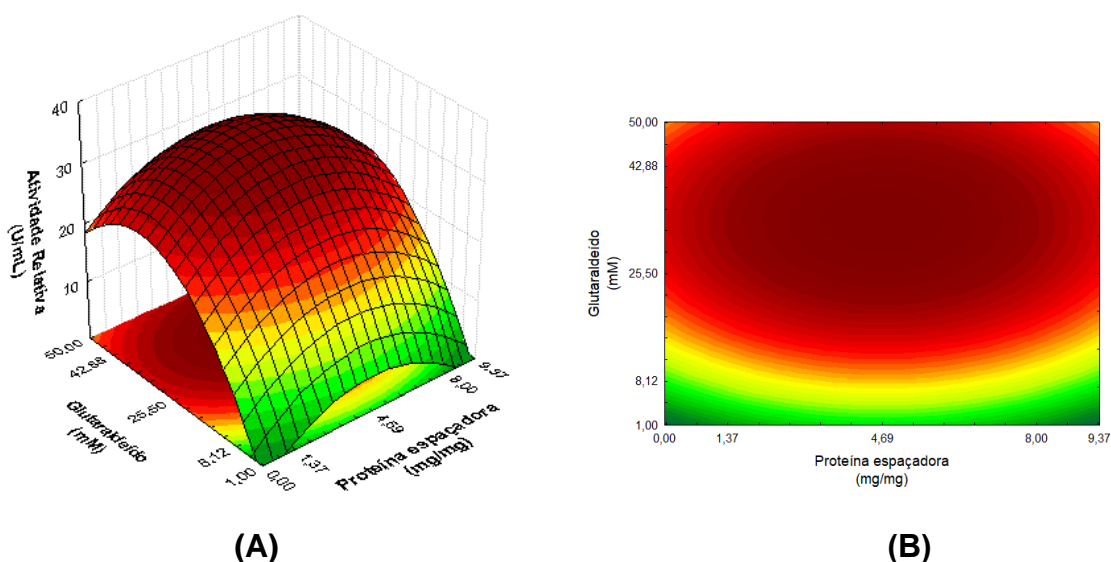
O ajuste do modelo (ANOVA) foi avaliado por meio do coeficiente de determinação de erro ( $R^2$ ). Cerca de 82,02 % da variabilidade das respostas observadas pode ser explicada pelo modelo apresentado na Equação (I), valor este muito satisfatório para a natureza o processo. Os dados do ajuste estão apresentados na Tabela 5.

*Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo completo*

Fonte de Variação	Coeficientes	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
Regressão	816,62	3	272,207	10,645	0,005319
Residual	179	7	25,5714		
Falta de Ajuste	176,89				
Erro puro	2,11				
Total	995,62	10			

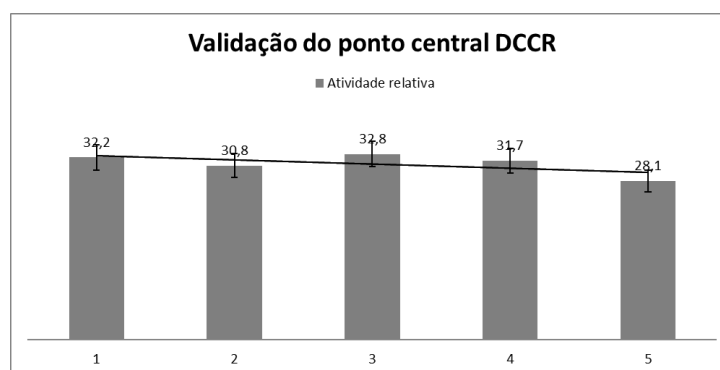
Coeficiente de determinação:  $R^2 = 82,02\%$   
Ftab: 3,07

Desta forma, o modelo pode ser utilizado para gerar a superfície de resposta (Figura 8-A) e a curva de contorno (Figura 8-B). Observou-se a formação de uma região ótima em que foram obtidos os maiores valores para a atividade relativa de  $\beta$ -glicosidase, entre as regiões de razão de proteína espaçadora 4,59 e concentração de 25 mM de Glutaraldeído.



**Figura 8 - Atividade relativa de  $\beta$ -glicosidase em função da concentração de glutaraldeído e da concentração de proteína espaçadora durante a etapa de imobilização: (A) superfície de resposta e (B) curva de contorno.**

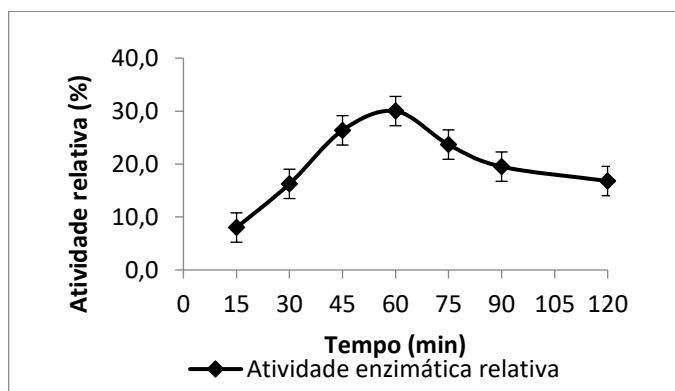
O modelo foi ainda validado com a realização de experimentos nas condições ótimas, sendo os resultados previstos pelo modelo foram encontrados com uma variação de 1,85%, expresso em porcentagem de atividade recuperada no processo de imobilização, como pode ser visto na figura 9.



**Figura 9 - Validação do modelo de otimização para imobilização de  $\beta$ -glicosidase por CLEAs**

### 3.2 Estudo da influência do tempo de reticulação

Após a otimização dos parâmetros concentração de agente reticulante e da concentração de proteínas espaçadoras, o tempo de reação para entrecruzamento e imobilização enzimática foi estudado nas condições ótimas para a imobilização. Os efeitos do tempo de reação podem ser observados na figura 10.



*Figura 10 - Efeito do tempo de reação na atividade de  $\beta$ -glicosidase imobilizada por CLEAs*

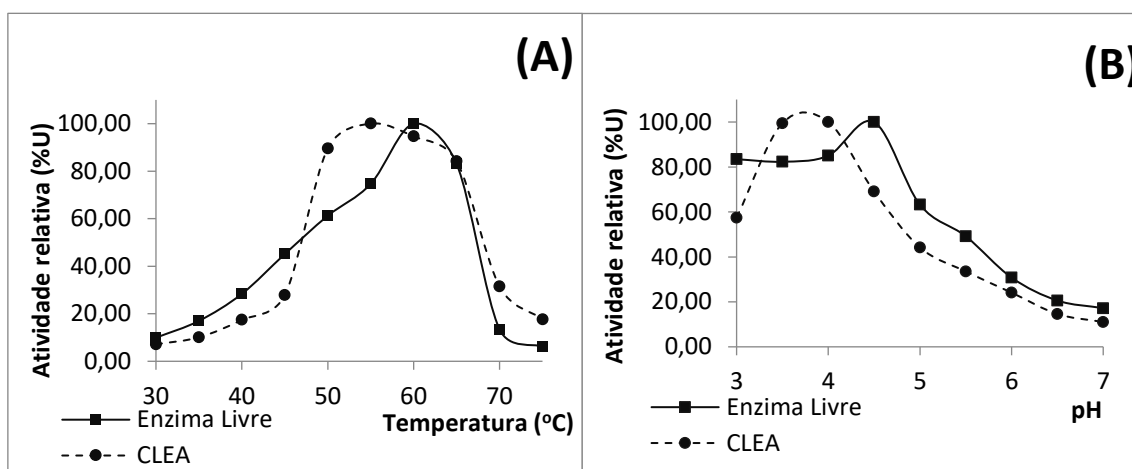
Muitos fatores influenciam na eficácia da preparação de CLEAs, como a natureza da enzima, natureza e quantidade de agente precipitante e agente reticulante (TALEKAR et al., 2013a), bem como o tempo de entrecruzamento e as etapas finais de lavagem e separação. Em reações curtas, não há formação de ligações cruzadas suficientes para obtenção de um CLEA estável, que é lixiviado nas etapas de lavagem e recuperação dos CLEAs, enquanto para tempos longos, há a formação de muitas ligações resultando num CLEA rígido e com baixa porosidade (ABIR B. MAJUMDER, KALYANI MONDAL, TEJ P. SINGH, 2008). Ambos os efeitos podem ser observados nos resultados, sendo as condições ótimas observadas o tempo de 60 min para o processo de imobilização de  $\beta$ -glicosidase imobilizada por CLEAs.

### 3.3 Caracterização bioquímica

#### 3.3.1 Temperatura e pH ótimo de atividade e estabilidade

Os pontos de máxima atividade catalítica, com temperatura e pH ótimos de atividade,

foram de 60°C pH 4,5 para a  $\beta$ -glicosidase livre, uma faixa de 50 a 65°C pH 3,5 a 4,0 para os CLEAs (Fig 11-A e 11-B).



*Figura 112 - Perfis de atividade de  $\beta$ -glicosidase livre e immobilizada em função da temperatura (A), pH (B)*

Em experimentos realizados por Deng et. al (DENG et al., 2020), com uma  $\beta$ -glicosidase comercial, immobilizada por CLEAs houve um incremento de 0,5 no pH ótimo de atividade da enzima, com deslocamento para a faixa menos ácida, de 5,0 para 5,5. Ahumada e colaboradores (AHUMADA et al., 2015a), estudaram a co-immobilização por CLEAs de  $\beta$ -glicosidase e arabinosidase e não foram relatadas alterações no perfil bioquímico da enzima, assim como a temperatura ótima para a atividade de 50°C em pH 4,5, utilizando albumina de soro bovino como agente espaçador.

As diferentes técnicas de imobilização de enzimas podem modificar ou não as características bioquímicas das enzimas, por isso é necessário o estudo e caracterização dos sistemas. Outros autores também encontraram alterações significativas no perfil bioquímico para a  $\beta$ -glicosidase immobilizada em diversos suportes sólidos, como quitosana e poliácridamida (ABDEL-FATTAH; OSMAN; ABDEL-NABY, 1997), alginato de sódio (KUMAR et al., 2014), sílica gel e sol gel (ANGELOTTI, 2013).

O deslocamento do pH ótimo de atividade do CLEA (Fig 11B) provavelmente ocorreu devido a um microambiente carregado negativamente, com a heterogeneidade de tamanho das proteínas de soja (BLANCH E CLARK, 1997), fazendo com o micro ambiente interno no CLEA tenha cargas elétricas diferentes.

Já o deslocamento da temperatura ótima (Fig 11A), pode ser atribuído a uma menor flexibilidade da estrutura molecular da enzima na estrutura do CLEA, promovida pela reticulação com glutaraldeído (ABDEL-FATTAH; OSMAN; ABDEL-NABY, 1997; DENG et al., 2020), o que também pode explicar a termoestabilidade dos CLEAs em comparação com a enzima livre (Fig 12-A e 12-B).

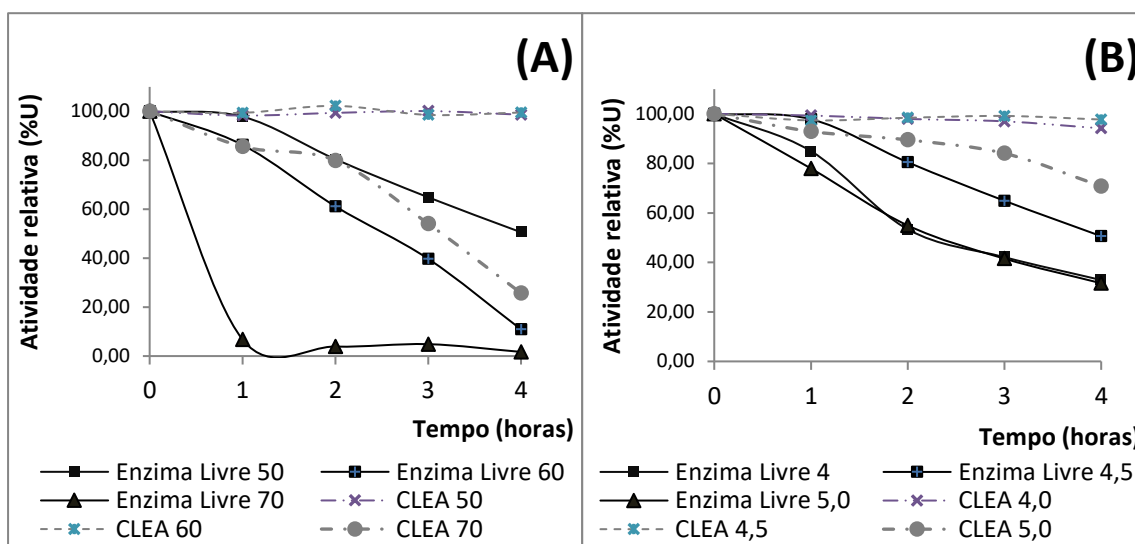


Figura 12 - Perfis de atividade de  $\beta$ -glicosidase livre e imobilizada em função da temperatura de estabilidade (A), pH de estabilidade (B).

Para todas as temperaturas estudadas a enzima imobilizada apresentou estabilidade superior a enzima livre. Para a temperatura de 50°C a enzima livre se mostrou estável a, com uma atividade residual de 50% após o período de quatro horas de incubação. A temperatura de 60°C, após 4 horas de incubação a enzima livre permaneceu com 10% de atividade residual e a temperatura de 70°C foi completamente inativada após uma hora de experimento. Já os CLEAs foram estáveis durante todo o período testado para as temperaturas de 50 e 60°C permanecendo com 100% da atividade residual. E à temperatura de 70°C apresentou uma atividade residual de 54% após três horas de incubação como pode ser observado na Fig 6A.

A verificação de um efeito protetor térmico após a imobilização de enzimas é algo esperado, devido ao aumento da rigidez e alteração da flexibilidade estrutural da enzima (ABDEL-FATTAH; OSMAN; ABDEL-NABY, 1997).

Os CLEAs também foram mais estáveis quanto a pH diversos comparado a enzima livre (Fig 6B). No pH 4,0 após 4 horas de incubação a enzima livre permaneceu com 50% de atividade enquanto os CLEAs apresentavam 70,8% de atividade residual.

Para o pH 4,5 e 5,0 a enzima livre apresentou atividade residual de 30% enquanto os CLEAs apresentaram uma atividade residual de 97% e 94% respectivamente.

O perfil dos CLEAs resultantes se mostra mais robusto do ponto de vista de aplicação em processos industriais, pois mesmo com pequenas alterações do pH e oscilações de temperatura, a efetividade da hidrólise enzimática não sofreria alterações de rendimento.

### 3.3.2 Determinação do efeito ativador e inibidor de íons

Na Tabela 06 estão os resultados do efeito de inibição ou ativação dos sais testados ( $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ , EDTA,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ , e  $\text{AgNO}_3$ ), na concentração de 5 mM.

*Tabela 6 – Efeitos de sais sobre a atividade enzimática*

Sal (5mM)	Enzima livre (U%)	CLEA (U%)
$\text{AlCl}_3$	101,2	98,7
$\text{AgNO}_3$	98,1	99,7
$\text{CaCl}_2$	99,7	98,4
$\text{CuSO}_4$	100,8	101,2
EDTA	101,7	101,7
$\text{FeCl}_3$	101,6	101,5
$\text{HgCl}_2$	33,5	44,2
$\text{KCl}$	99,5	102,2
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	54,8	58,9
$\text{K}_2\text{CrO}_4$	81,4	87,6
$\text{MgSO}_4$	100,3	102,1
$\text{MnSO}_4$	98,9	102,0
$\text{NaCl}$	101,5	102,3
$\text{ZnCl}_2$	102,3	104,3

Como podemos observar os sais  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  inibiram a atividade enzimática para a  $\beta$ -glicosidade tanto na forma livre como imobilizada, sendo o  $\text{HgCl}_2$ , o sal de maior inibição.

Esse efeito inibitório pelo mercúrio e cromo é geralmente observado em outras  $\beta$ -glicosidade (ZANOELO et al., (2006); XUN et al., (2005). Os íons  $Hg^{2+}$  e  $Cr^{3+}$  são agentes oxidantes do grupo sulfidril, carboxil e resíduos de triptofano, provocando alterações em suas estruturas e atividades, o que indica a presença desses grupos no sítio ativo da enzima(E PAINBENI , S VALLES, J POLAINA, 1992). Os demais sais não apresentaram efeitos de ativação ou inibição sobre a atividade enzimática.

### 3.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  da enzima  $\beta$ -glicosidase livre e imobilizada foram obtidos experimentalmente, em função da concentração do substrato, e podem ser visualizados na Figura 13, sendo o modelo sem inibição pelo substrato (13-A) e com inibição pelo substrato(13-B).

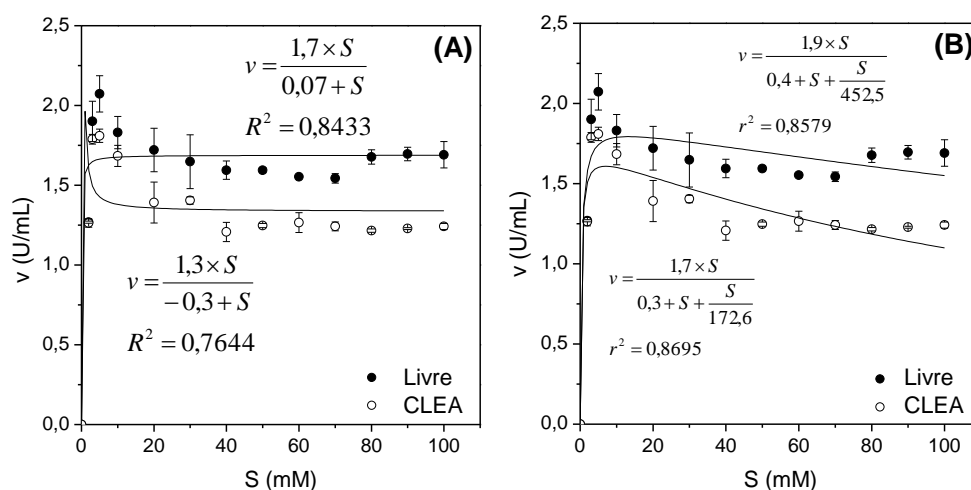


Figura 13 - Efeito da concentração de substrato na atividade hidrolítica da enzima nas formas livre e imobilizada pela técnica CLEA. Ajuste dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten na ausência (A) e presença (B) de inibição aos dados experimentais para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes.

O modelo na presença de inibição pelo substrato apresentou melhor ajuste aos dados experimentais com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de aproximadamente 0,86 para a enzima livre e imobilizada. Na Tabela 7 se encontram os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  determinados pelo modelo.



<b>Matriz</b>	<b>Km</b>	<b>Vmax</b>	<b>Constante de Inibição</b>
Enzima livre	0,3	1,9	452,5
CLEAs	0,4	1,7	172,6

*Tabela 7 – Constantes cinéticas*

As alterações promovidas pelo processo de imobilização nas constantes cinéticas foram pouco significativas, apresentando um Km de 0,3 mmol.L<sup>-1</sup> e Vmax de 1,9 mmol.Lmin<sup>-1</sup> para a enzima livre e Km de 0,4 mmol.L<sup>-1</sup> e Vmax 1,7 mmol.Lmin<sup>-1</sup> para os CLEAs, indicando que o processo não diminuiu a afinidade da enzima ao substrato. Pode ser observado uma diminuição da constante de inibição pelo substrato de 452,5 na enzima livre para 175,6 nos CLEAs, devido a um microambiente carregado negativamente (BLANCH E CLARK, 1997) e pelo acesso dificultado da enzima ao substrato pela porosidade do sólido reticulado.

Deng e colaboradores (2020) observaram alterações nas constantes de uma  $\beta$ -glicosidade comercial imobilizada por ad-CLEAs. Para a enzima livre, o Km encontrado foi de 11,97 mmol.L<sup>-1</sup> e um Vmax de 314,22 mmol.Lmin<sup>-1</sup>, enquanto os CLEAs apresentaram um Km de 7,67 mmol.L<sup>-1</sup> e Vmax de 639,63 mmol.Lmin<sup>-1</sup>, apresentando uma melhora considerável na atividade enzimática e da afinidade ao substrato e velocidade de reação, por otimização do processo de imobilização, com a adsorção da enzima em micropartículas de poli-(glicidil-metacrilato-co-etilenodimetacrilato), antes do processo de precipitação.

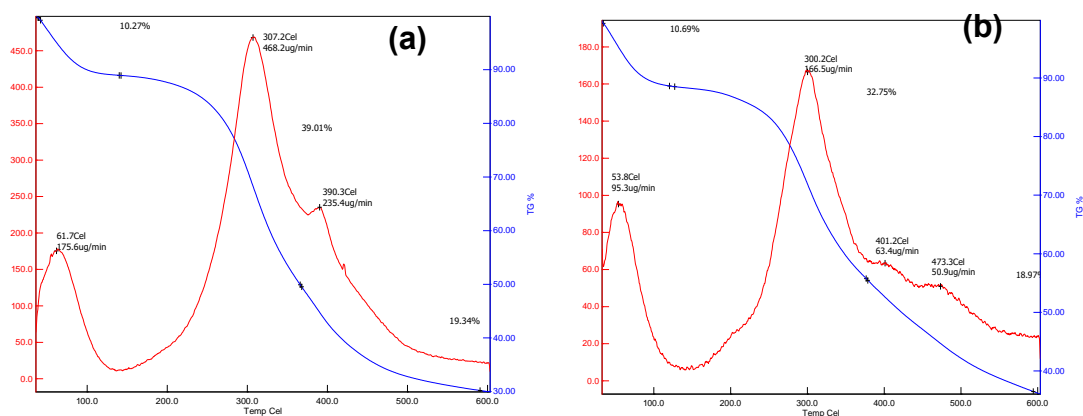
### **3.4 Caracterização dos biocatalisadores**

As análises de espectroscopia no infravermelho e termogravimetria (ATG) foram realizadas para a enzima solúvel e imobilizada com o intuito de confirmar as modificações estruturais que ocorreram após o entrecruzamento com o glutaraldeído. O ATG foi realizado para avaliar se as modificações conferiram maior estabilidade térmica ao biocatalisador heterogêneo preparado pela técnica CLEA.

Ao observar a Figura 13 verifica-se que as curvas de perda de massa são bem similares, com 2 eventos principais ocorrendo nas duas amostras, caracterizando se pela perda de água adsorvida fisicamente na estrutura das proteínas entre a temperatura inicial de análise e 100 graus e decomposição térmica do material (MIGUEZ et al., 2018). Entretanto foi constatada maior perda de massa nos CLEAS

(39%) ao redor de 300°C em comparação à enzima solúvel (32%). Estes resultados podem ser devido à alta compactação de cadeias na enzima livre que possibilitou uma maior compactação que confere maior estabilidade térmica.

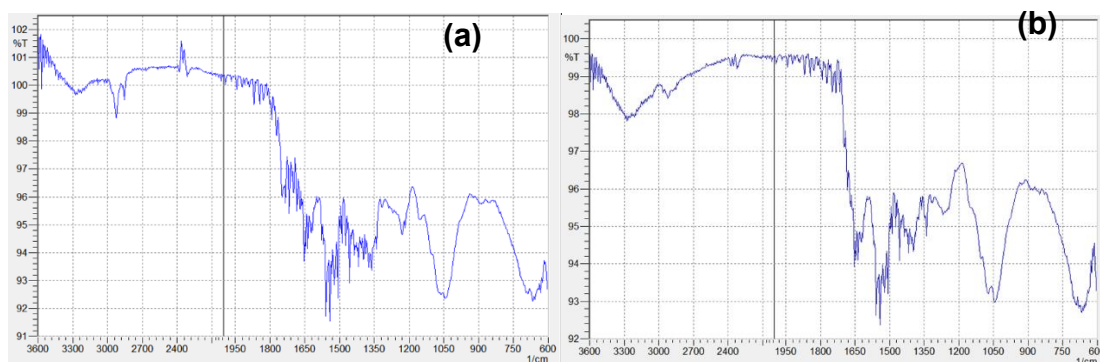
A inserção de cadeias carbônicas na ativação com glutaraldeído impediu esta compactação e resultou na formação de agregados com maior porosidade e, conseqüentemente, menor estabilidade nesta faixa de temperatura (OKURA et al., 2020).



*Figura 4: Análise de termogravimetria da lipase imobilizada pela técnica CLEA (a) e da enzima solúvel (b)*

A adição de grupos funcionais pode reduzir a compactação efetiva destas macromoléculas, reduzindo assim sua estabilidade térmica nessa faixa de temperatura, por se tratar de estruturas mais porosas (SANCHEZ et al., 2015), o que explica os resultados obtidos no presente trabalho.

Os espectros no infravermelho também foi bastante similar entre as amostras de enzima solúvel e CLEAS.

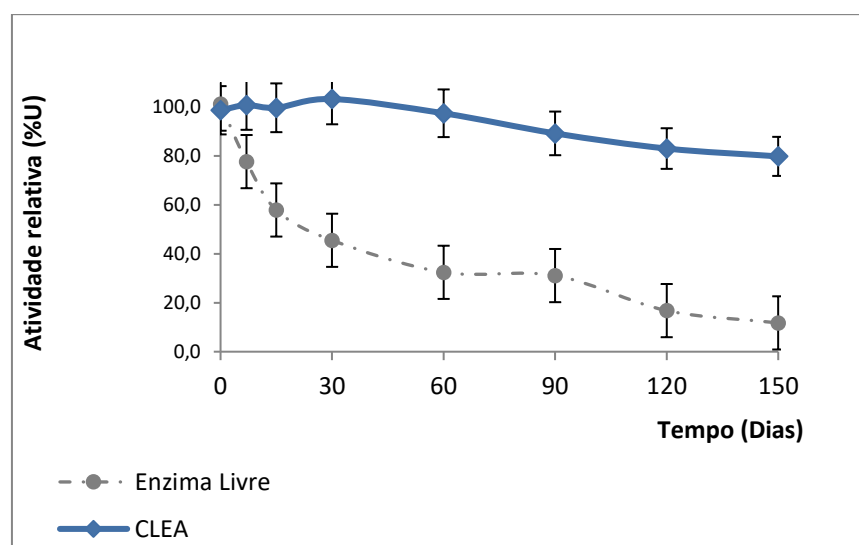


*Figura 15 - Espectros do FT-IR da enzima solúvel (a) e do derivado (b)*

Conforme pode ser observado na Fig. 14-A, a intensa banda de absorção na faixa de  $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento de O–H e N–H existente na estrutura das enzimas (SOARES et al., 2020; VERMA; KUMAR; KUMAR, 2019). Após o processo de reticulação da enzima com glutaraldeído é observada uma redução na intensidade destas bandas, pois este agente bifuncional interage com diferentes grupos nucleofílicos da enzima como O–H e N–H (BARBOSA et al., 2014). Por outro lado, a banda referente ao estiramento de C–H (assimétrico) em  $\text{–CH}_2$  (grupos metílicos), entre  $2923\text{--}2946\text{ cm}^{-1}$ , é intensificada após a preparação do biocatalisador devido à reticulação dos grupos nucleofílicos descritos acima que confirmam a modificação química na superfície da enzima com moléculas de glutaraldeído (OKURA et al., 2020; WANG et al., 2019). Nas amostras reticuladas, uma banda relacionada ao C–H (simétrico) aparece entre  $2870\text{--}2892\text{ cm}^{-1}$ , que também se intensifica com a introdução de cadeias carbônicas via entrecruzamento com glutaraldeído (WANG et al., 2019).

### 3.5 Determinação do tempo de armazenamento

A imobilização da  $\beta$ -glicosidade pela técnica CLEA conferiu estabilidade de estocagem ao derivado em comparação com a enzima livre, como pode ser visto na figura 16.



*Figura 16 - Estabilidade de estocagem da enzima livre e imobilizada por CLEAs em 150 dias a 4°C*

Após 15 dias de estocagem sob refrigeração, a enzima livre perdeu 40% de

sua atividade enquanto os CLEAs ainda mantinham 100% da atividade inicial. Após 150 dias de estocagem, a enzima livre reteve apenas 10% da atividade inicial, enquanto os CLEAs ainda mantiveram cerca de 80% de sua atividade.

As ligações cruzadas conferidas a enzima durante o processo de imobilização, deixam a enzima mais rígida e confinada no interior de um sólido poroso, protegida do ataque de outras enzimas proteolíticas presente do extrato fermentado, impedindo sua degradação ou decomposição (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; SHELDON, 2008, 2013), melhorando a estabilidade de estocagem.

## **6 CONCLUSÕES**

Com base na análise do planejamento experimental, foi possível observar que o modelo apresentou ajuste ao processo de imobilização de  $\beta$ -glicosidase por CLEAs, sendo estatisticamente significativo. As variáveis concentração do agente reticulante e de proteína espaçadora foram significativas nos níveis estudados. A melhor condição para produção dos CLEAs foi no ponto central do estudo, onde a concentração da proteína espaçadora era 4,69 e agente reticulante era 25,5 mM. Como modelo gerado foi possível traçar a superfície de resposta do modelo gerado, que explica 82% dos resultados.

Os derivados se mostram mais robustos que a enzima livre, com atividade ótima em uma faixa de temperatura mais ampla que a enzima livre ( de 60° C para 50 – 65°C) e em uma faixa de pH ligeiramente mais ácido (de pH 4,5 para pH 3,5 – 4,0). Apresentando maior estabilidade em condições adversas de temperatura e pH pelo período de 4 horas.

Os derivados ainda apresentaram menor inibição pelo substrato e apresentaram um shelflife maior que a enzima livre, com atividade residual de 80% após 150 dias de armazenamento a 4°C, frente a 12% de atividade residual da enzima livre nas mesmas condições.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e pelo Centro Federal de Educação Tecnológica pelo programa de incentivo ao aperfeiçoamento de pessoal.

## REFERENCIAS

ABDEL-FATTAH, Ahmed F.; OSMAN, Mona Y.; ABDEL-NABY, Mohamed A. **Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20** *Chemical Engineering Journal*. [s.l: s.n.].

ABIR B. MAJUMDER, KALYANI MONDAL, TEJ P. SINGH, Munishwar N. Gupta. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. **Biocatalysis and Biotransformation**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 235–242, 2008..

ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35446f.

AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 94, n. August, p. 555–560, 2015. a. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003..

AHUMADA, Katherine; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 94, p. 555–560, 2015. b. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003.

ANGELOTTI, Joelise de Alencar Figueira. **ESTUDO DA PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA  $\beta$  - GLICOSIDASE DE ASPERGILLUS sp.** 2013. Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2013.

ARAUJO SILVA, Rafael; MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; KOPP, Willian; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; TARDIOLI, Paulo Waldir. Imobilização De B-Amilase De Cevada Por Agregação/Reticulação (Clea). **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos**, [S. l.], v. XX, n. January 2016, 2015. a. DOI: 10.17648/sinaferm-2015-33594.

ARAUJO SILVA, Rafael; MAFRA, Agnes Cristina Oliveira; KOPP, Willian; GIORDANO, Raquel de Lima Camargo; TARDIOLI, Paulo Waldir. IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -AMILASE DE CEVADA POR AGREGAÇÃO/RETICULAÇÃO (CLEA). *In: ANAIS DO SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS 2015b*, **Anais** [...]. : Galoá, 2015. DOI: 10.17648/sinaferm-2015-33594.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014. DOI: 10.1039/c3ra45991h.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

BLANCH E CLARK. **Biochemical Engineering, Second Edition**. [s.l: s.n.].

BRAFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, [S. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

CAIRNS, James R. Ketuda.; ESEN, Asim.  $\beta$ -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010. a. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.

CAIRNS, James R. Ketuda.; ESEN, Asim.  **$\beta$ -Glucosidases** Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. b. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2.

CAO, Linqiu; VAN LANGEN, Luuk; SHELDON, Roger A. **Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?** **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2003. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00096-X.

CHANG, Kyung Hoon; JO, Mi Na; KIM, Kee Tae; PAIK, Hyun Dong. Evaluation of glucosidases of *Aspergillus niger* strain comparing with other glucosidases in transformation of ginsenoside Rb1 to ginsenosides Rg3. **Journal of Ginseng Research**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 47–51, 2014. DOI: 10.1016/j.jgr.2013.11.008.

CHEN, Lei; HU, Ying Dan; LI, Ning; ZONG, Min Hua. Cross-linked enzyme aggregates of  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 1673–1678, 2012. DOI: 10.1007/s10529-012-0947-y.

CRESPIM, Elaine et al. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 82, p. 375–380, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.018.

CUNHA, Thiago Martins Da; FERREIRA, Caio Filipe Morais Lucindo; ANGELOTTI, Joeline de Alencar Figueira. Avaliação De Agentes Precipitantes Para Produção De Agregados De Ligação Cruzada (Cleas) Da Enzima B-Glicosidase Produzida Por *Aspergillus Niger* / Evaluation of Precipitating Agents for the Production of Cross-Linked Aggregates (Cleas) of the Enzyme B-Gly. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 80538–80545, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n10-465.

DE GIUSEPPE, Priscila Oliveira; SOUZA, Tatiana De Arruda Campos Brasil; SOUZA, Flavio Henrique Moreira; ZANPHORLIN, Leticia Maria; MACHADO, Carla Botelho; WARD, Richard John; JORGE, Joao Atilio; FURRIEL, Rosa Dos Prazeres Melo; MURAKAMI, Mario Tyago. Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 1631–1639, 2014. DOI: 10.1107/S1399004714006920.

DEL PILAR, María; TORRES, Guauque; FORESTI, María Laura; FERREIRA, María Luján. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.amb-express.com/content/3/1/25>.

DENG, Xu; HE, Tian; LI, Jun; DUAN, Hui Ling; ZHANG, Zhi Qi. Enhanced biochemical characteristics of  $\beta$ -glucosidase via adsorption and cross-linked enzyme aggregate for rapid cellobiose hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 43, n. 12, p. 2209–2217, 2020. DOI: 10.1007/s00449-020-02406-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02406-5>.

E PAINBENI, S VALLES, J POLAINA, A. Flors. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, [S. l.], v. 174, n. 9, p. 3087–91, 1992.

FABIANA FONSECA ZANOELO, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES POLIZELI, HÉCTOR FRANCISCO TERENCE, João Atílio Jorge.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], 2006.

FURLANI, Izadora L.; AMARAL, Bruno S.; OLIVEIRA, Regina V.; CASSA, Quezia B. **Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis** *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170525.

GUPTA, Munishwar N.; RAGHAVA, Smita. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 679, p. 133–145, 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-895-9\_11.

IGARASHI, Kiyohiko; TANI, Tomomi; KAWAI, Rie; SAMEJIMA, Masahiro. Family 3  $\beta$ glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 95, n. 6, p. 572–576, 2003. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80164-0.

KANG, S. W.; KO, E. H.; LEE, J. S.; KIM, S. W. Over-production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 647–650, 1999. DOI: 10.1023/A:1005556523241.

KUMAR, Vinod; YADAV, Sweta; JAHAN, Firdaus; SAXENA, Rajendra Kumar. Organic synthesis of maize starch-based polymer using *Rhizopus oryzae* lipase, scale up, and its characterization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 321–331, 2014. DOI: 10.1080/10826068.2013.803481.

LIEW, Kok Jun; LIM, Lily; WOO, Hui Ying; CHAN, Kok Gan; SHAMSIR, Mohd Shahir; GOH, Kian Mau. Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 115, p. 1094–1102, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.156.

MAFRA, A. C. O.; BELTRAME, M. B.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, M. P. A.; TARDIOLI, P. W. **PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO A PARTIR DE SACAROSE CATALISADA POR AGREGADOS RETICULADOS DE INVERTASE DE S. CEREVISIAE**. [s.l: s.n.].

MATSUURA, Masaru; SASAKI, Jun; MURAO, Sawao. Studies on  $\beta$ -Glucosidases from Soybeans that Hydrolyze Daidzin and Genistin: Isolation and Characterization of an Isozyme. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 1623–

1627, 1995. DOI: 10.1271/bbb.59.1623.

MCCARTER, John D.; WITHERS, Stephen G. **Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis***Current Opinion in Structural Biology*. [s.l: s.n.].

MENEZES, Farley Souza Ribeiro; DA CRUZ, Gizelly Gomes; LOPES, Matheus de Oliveira; NELSON, David Lee; MARTINS, Tamira Quintiliana Gomes; DE LAIA, Marcelo Luiz. Evaluation of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase production by bacteria and yeasts isolated from a eucalyptus plantation in the cerrado of Minas Gerais. **Revista Ambiente e Agua**, [S. l.], v. 14, n. 4, 2019. DOI: 10.4136/ambi-agua.2324.

MIGUEZ, João P.; GAMA, Rafaela S.; BOLINA, Iara C. A.; DE MELO, Cristiane C.; CORDEIRO, Marcia R.; HIRATA, Daniela B.; MENDES, Adriano A. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 139, p. 296–308, 2018. DOI: 10.1016/j.cherd.2018.09.037.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes***Biotechnology and Biotechnological Equipment* Diagnosis Press Limited., , 2015. a. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. b. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MONTEIRO, Valdirene N.; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Processos Químicos. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009. Disponível em: [https://static.sistemafieg.org.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista\\_Cientifica\\_Processos\\_Quimicos\\_/2010/processosquimicos\\_052009.pdf#page=9](https://static.sistemafieg.org.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista_Cientifica_Processos_Quimicos_/2010/processosquimicos_052009.pdf#page=9).

OKURA, Nicole S.; SABI, Guilherme J.; CRIVELLENTI, Marcela C.; GOMES, Raphael A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 163, p. 550–561, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021>.

ORLANDELLI, Ravely Casarotti; SPECIAN, Vânia; FELBER, Aretusa Cristina; PAMPHILE, João Alencar. **12-1346 - v.7, n.3, 2012SaBios: Rev. Saúde e Biol.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.revista.grupointegrado.br/sabios/>.

R LUCAS, A ROBLES, G ALVAREZ DE CIENFUEGOS, A. Gálvez.  $\beta$ -glucosidase from



Chalara paradoxa CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 48, p. 3698–3703, 2000.

RAJAN, Akhila; SUDHA, J. D.; ABRAHAM, T. Emilia. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 50–59, 2008. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.07.003.

RIBEIRO, Maria H. L.; RABAÇA, Marco. Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: Novel biocatalysts for naringin hydrolysis. **Enzyme Research**, [S. l.], v. 2011, n. 1, 2011. DOI: 10.4061/2011/851272.

ROCHA, Eveline Angélica Lira de Souza Sales; DE CARVALHO, Anne Virgynnia Oliveira Rolim; DE ANDRADE, Susana Régis Alves; DE MEDEIROS, Ana Cláudia Dantas; TROVÃO, Dilma Maria de Brito Melo; COSTA, Edja Maria Melo de Brito. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 351–355, 2013.

SHAH, Shweta; SHARMA, Aparna; GUPTA, Munishwar N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 351, n. 2, p. 207–213, 2006. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.028.

SHELDON, R. A. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEA R s): stable and recyclable biocatalysts**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.cleatechnologies.com>.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1583–1587, 2008. DOI: 10.1042/bst0351583.

SHELDON, Roger A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 467–477, 2011. a. DOI: 10.1007/s00253-011-3554-2.

SHELDON, Roger A. **Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011. b. DOI: 10.1007/s00253-011-3554-2.

SHELDON, Roger a. Enzyme Immobilization: Why , What and How Why use enzymes ? **the Royal Society of Chemistry**, [S. l.], v. 349, n. 5, p. 273–289, 2013.

SHEN, P.; LARTER, R. Role of substrate inhibition kinetics in enzymatic chemical oscillations. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 1414–1428, 1994. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80615-0.

SHEN, Xueliang; XIA, Liming. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 1363–1367, 2004. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00264-4.

SHUDDHODANA; GUPTA, Munishwar N.; BISARIA, Virendra S. Effectiveness of cross-linked enzyme aggregates of cellulolytic enzymes in hydrolyzing wheat straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 445–450, 2018.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.04.007. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.007>.

SOARES, Aurileide M. B. F.; GONÇALVES, Lizia M. O.; FERREIRA, Ruanna D. S.; DE SOUZA, Jefferson M.; FANGUEIRO, Raul; ALVES, Michel M. M.; CARVALHO, Fernando A. A.; MENDES, Anderson N.; CANTANHÊDE, Welter. Immobilization of papain enzyme on a hybrid support containing zinc oxide nanoparticles and chitosan for clinical applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 243, n. February, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116498.

SYNOWIECKI, Józef; WOŁOSOWSKA, Sylwia. Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 1417–1422, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.028.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, [S. l.], v. 3, n. 31, p. 12485–12511, 2013. a. DOI: 10.1039/c3ra40818c.

TALEKAR, Sachin; JOSHI, Asavari; JOSHI, Gandhali; KAMAT, Priyanka; HARIPURKAR, Rutumbara; KAMBALE, Shashikant. **Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs)** **RSC Advances**, 2013. b. DOI: 10.1039/c3ra40818c.

TEIXEIRAA, Iris S.; MILAGRE, Cintia D. F. **Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores** **Química Nova** Sociedade Brasileira de Química, , 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170538.

TEREZA DE ANDRADE, Lívia; LIZZY, Souza; ALCÂNTARA, Ayra; BENEVIDES, Veríssimo; PESSELA, Costa; MARCELO, João; SANTORO, Matos; RESENDE, Rodrigo R.; MENDES, Adriano A. **IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE**. [s.l: s.n.].

TU, Maobing; ZHANG, Xiao; KURABI, Arwa; GILKES, Neil; MABEE, Warren; SADDLER, Jack. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 151–156, 2006. DOI: 10.1007/s10529-005-5328-3.

VELASCO-LOZANO, Susana; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; MATEOS-DÍAZ, Juan C.; FAVELA-TORRES, Ernesto. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. **Biocatalysis**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2016. DOI: 10.1515/boca-2015-0012. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/boca.2014.1.issue-1/boca-2015-0012/boca-2015-0012.xml>.

VERMA, Ritika; KUMAR, Ashok; KUMAR, Sudhir. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 80, p. 72–79, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.019. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.019>.

WANG, Xudong; CHEN, Zhangjun; LI, Ke; WEI, Xiaodong; CHEN, Zhenbin; RUSO,

Juan M.; TANG, Zhenghua; LIU, Zhen. The study of titanium dioxide modification by glutaraldehyde and its application of immobilized penicillin acylase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 560, p. 298–305, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.10.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.10.001>.

XU, Meng-Qiu; WANG, Shuang-Shuang; LI, Li-Na; GAO, Jian; ZHANG, Ye-Wang. Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates as Biocatalysts. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 460, 2018. a. DOI: 10.3390/catal8100460.

XU, Meng Qiu; WANG, Shuang Shuang; LI, Li Na; GAO, Jian; ZHANG, Ye Wang. **Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts** *Catalysts* MDPI AG, , 2018. b. DOI: 10.3390/catal8100460.

XUE, Rui; WOODLEY, John M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 115, p. 183–195, 2012. a. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.033>.

XUE, Rui; WOODLEY, John M. **Process technology for multi-enzymatic reaction systems** *Bioresource Technology*, 2012. b. DOI:10.1016/j.biortech.2012.03.033.

XUN LI 1, JIANJUN PEI, GUOGAN WU, Weilan Shao. Expression, purification and characterization of a recombinant beta-glucosidase from *Volvarella Volvacea*. **Biotechnol Lett**, [S. l.], v. 18, p. 1369–73, 2005.

YANG, Fang; YANG, Xiaofeng; LI, Zhe; DU, Chenyu; WANG, Jufang; LI, Shuang. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 99, n. 21, p. 8903–8915, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6619-9.

YANG, Jie; XU, Xinqi; YANG, Xiaodan; YE, Xiuyun; LIN, Juan. Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena laccase*: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S. l.], v. 65, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1016/j.jtice.2016.04.025.

#### 4 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no desenvolvimento das atividades propostas nesta dissertação de mestrado mostraram que o emprego de um processo de imobilização adequado pode garantir melhor desempenho de enzimas em processos industriais. Foi demonstrado que a aplicação da imobilização enzimática sem suporte, pela aplicação da técnica cross-linked enzyme aggregates, sem purificação prévia do extrato enzimático, possibilitou melhorar a estabilidade de uma  $\beta$ -glicosidase produzida pelo *A. niger* por fermentação em estado sólido.

Os testes de estabilidade térmica em diferentes valores de pH e temperatura mostraram que a enzima imobilizada por CLEAs possui maior estabilidade que a enzima livre e a análise cinética determinou que houve mudanças conformacionais resultantes do processo de imobilização, alterando ligeiramente os valores ótimos de pH, temperatura e as constantes cinéticas para a enzima imobilizada. Essas mudanças conformacionais não impactaram significativamente na atividade enzimática, que se manteve estável durante 150 dias.

#### 5 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões obtidas, propõem-se algumas sugestões para a continuidade desse trabalho:

- a. Utilização de resíduos industriais como agente espaçador no processo de imobilização, como soro de leite visando a redução do custo de preparo do biocatalizador;
- b. Utilização de nanopartículas magnéticas, para facilitar a recuperação do biocatalizador do meio reacional;
- c. Utilização de agentes formadores de poros, facilitando a disponibilidade das enzimas internas do CLEA ao substrato;
- d. Co-imobilização com outras celulasas pra aplicação em biodigestão de substrato lignocelulosicos;
- e. Aplicação de reatores para testar sua aplicabilidade em reatores reais e determinação do tempo de meia vida.