

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/03/2022.

GUILHERME NUNES LUCENA

Enzyme modified magnetic nanoparticles: an approach for biomass
conversion processes

Thesis presented to Institute of Chemistry, São
Paulo State University, in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in
Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara

2020

CATALOGUING DATA

L935e Lucena, Guilherme Nunes
Enzyme modified magnetic nanoparticles: an approach
for biomass conversion processes / Guilherme Nunes
Lucena. – Araraquara: [s.n.], 2020
116 p.: il.

Thesis (doctor) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Advisor: Rodrigo Fernando Costa Marques

1. Nanoparticles. 2. Enzymes. 3. Immobilized enzymes.
4. Cellulase. 5. Biomass. I. Title.

GUILHERME NUNES LUCENA

Nanopartículas magnéticas modificadas com enzimas: uma
abordagem para processos de conversão de biomassa

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Enzyme modified magnetic nanoparticles: an approach for biomass conversion processes"

AUTOR: GUILHERME NUNES LUCENA

ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ARNALDO SARTI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Prof.ª Dr.ª LARISSA DE FREITAS
Departamento de Engenharia Química / Escola de Engenharia de Lorena - USP - Lorena

Prof. Dr. RAFAEL FIRMANI PERNA
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFAL - Poços de Caldas

Araraquara, 20 de março de 2020

CURRICULUM VITAE

IDENTIFICATION

Full name: Guilherme Nunes Lucena

Name in scientific citations: Lucena, G. N.

PROFESSIONAL ADDRESS

Institute for Research in Bioenergy, Institute of Chemistry, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, ZIP: 14.800-060, Araraquara, SP, Brazil.

ACADEMIC EDUCATION

Bachelor’s degree in Environmental Chemistry (2010-2014)

Federal University of Tocantins, Gurupi, TO, Brazil

Graduation in Chemistry (2018-2019)

University of Franca, Franca, SP, Brazil

Master’s degree in Chemistry (2014-2016)

Institute of Chemistry, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

Doctor’s degree in Chemistry (2016-2020)

Institute of Chemistry, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

PUBLICATIONS IN SCIENTIFIC JOURNALS

Farias, A. J. G. et al. Potential of limestone tailings for correction and fertilization of an Oxisol in the Brazilian savanna. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, 2020. DOI: 10.1080/00103624.2020.1744629.

Guedes, W. N. et al. Easy estimation of endoglucanase activity using a free software app for mobile devices. **Br. J. Anal. Chem.**, 7, 2020.

Lucena, G. N. et al. Magnetic cross-linked enzyme aggregates (MCLEAs) applied to biomass conversion. **J. Solid. State Chem.**, 270, 58-70, 2019.

Frem, R. C. G. et al. MOFs (Metal-Organic Frameworks): uma fascinante classe de materiais inorgânicos porosos. **Quim. Nova**, 41, 1178-1191, 2018.

Lucena, G. N. et al. Zn-based porous coordination solid as diclofenac sodium carrier. **J. Solid. State Chem.**, 260, 67-72, 2018.

Silva, R. R. et al. Spectroscopic and elementary characterization of humic substances in organic substrates. **Comum. Sci.**, 9, 264-274, 2018.

Silva, R. R. et al. Over-liming in the chemical attributes in a Red Latosol of texture medium. **Tecnol. & Cien. Agropec.**, 12, 53-58, 2018.

Silva, M. E. C. et al. Synthesis of whey peptide-iron complexes: Influence of using different iron precursor compounds. **Food Res. Int.**, 101, 73-81, 2017.

BOOK CHAPTERS

Silva, R. R. Rejeitos da mineração de calcário na melhoria dos atributos químicos do solo e nas características agronômicas do capim Mombaça. In: Silva & Freitas, Eds. Capim Mombaça: correção da acidez, gessagem, adubação, bioestimulante, morfofisiologia, qualidade e manejo da pastagem. 1ª ed. Editora UFT, 2018. ISBN: 978-8560487530.

Frem, R. C. G. et al. Design and applications of metal-organic frameworks. In: Longo & La Porta, Eds. Recent advances in complex functional materials: from design to application. 1ª ed. Springer. p. 339-369. 2017. ISBN: 978-3319538976.

PROFESSIONAL ACTUATION

Teacher: Fundamentals of laboratory practice and fundamentals of chemical processes

Course: Chemical Technician

School: Education and technology center, SENAI, Palmas, TO, Brazil

Date: 02/2020 – present

Professor: Experimental physical chemistry

Course: Chemical Engineering

University: Institute of Chemistry, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brazil

Date: 02/2019 – 07/2019

Dedico este trabalho à minha família, pais e irmãos, grandes incentivadores e razão de tudo isso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leopoldino e Maria, e irmãos, Ananda e Danillo, por todo apoio, carinho e paciência, pois sem eles nada disso teria acontecido.

Àquelas que sempre foram mais que amigas, Brenda, Camila e Mayra, por todo o companheirismo e amizade durante essa jornada que teve início em 2010. Ao lado de vocês me tornei um ser humano melhor. De coração, obrigado por tudo.

Ao Professor Rodrigo, orientador deste trabalho, por todos os ensinamentos, amizade, confiança e pelo auxílio no meu crescimento como pessoa e pesquisador. Comigo, cinco anos de futebol e quatro gols (porque deixei).

À Professora Ariela Veloso de Paula, sempre atenciosa, prestativa e na prática a coorientadora desta tese, por sua atenção, carinho, confiança, amizade e colaboração científica. Me deve um vinho chileno.

Aos amigos do laboratório do IPBEN, Amanda, Bruna e Professor Arnaldo Sarti, por toda amizade, parceria e gratificantes conversas durante os inúmeros cafés desse doutorado. Vou sentir saudade desse trio de palmeirenses sem mundial.

Aos amigos do laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides, Caio, Carol, Chico, Gabriel, Luísa e Pelé, pela ajuda na condução desse trabalho e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. Obrigado, bebemos bem.

À Renata, Crica, pela amizade sincera, parceria e boas conversas. Depois que deixei de trabalhar com você meus resultados nunca mais foram os mesmos.

Aos amigos do futebol (IQ e Ascar) por toda resenha, parceria, cerveja, churrasco e inúmeros gols perdidos. Eu sei, na minha frente o gol fica realmente pequeno.

Ao Instituto de Química e sua equipe de colaboradores (professores, técnicos, biblioteca, manutenção, limpeza e terceirizados) por todo suporte e solicitude.

Ao Sci-Hub e sua criadora, Alexandra Elbakyan, por removerem as barreiras no caminho da ciência.

Por fim, ao FINEP, pelo apoio financeiro (processo 01.14.0151.00) e CNPq, pela bolsa concedida (processo 142288/2016-0). Passou da hora de um aumento.

To infinity and beyond!

Buzz Lightyear



ABSTRACT

Lignocellulosic biomass has highlighted as an essential renewable raw material for production of many value-added chemicals of industrial interest in field as energy production, food, pharmaceutical, agriculture, environment and so on. Despite it, many applications have wrought with a series of difficulties in regarding enzymatic conversion processes, as enzyme operational instability, high production and purification cost, inhibition reactions, and issues of recovery and recycle. To overcome these issues, many enzyme immobilization methods have emerged, among which highlights the obtention of magnetic-cross linked enzyme aggregates (MCLEAs). This materials class is obtained from cross-linking reaction between enzyme physical aggregates and magnetic supports, which can gather the important catalytic properties of the physical aggregates (as a result of enzyme native structure maintenance) to recovery and recycle capacity of magnetic nanoparticles (as result of its intrinsic magnetic properties). Faced it, this work reports the synthesis, characterization and potential application of different cellulases MCLEAs in the cellulose enzymatic conversion process. Sectioned in three chapters, firstly is presented a review about the state of art in concern to obtention of value-added chemicals from lignocellulosic biomass using MCLEAs. In the second chapter, different MCLEAs were prepared in the presence of quitosana-coated magnetic nanoparticles with three different precipitation agents (ammonium sulfate, ethanol and polyethylene glycol). Highlighted the obtention of a MCLEA using ethanol as precipitant agent, which showed highest enzymatic activity (193.42 U g^{-1}) and activity recovery (43.53 %), and other MCLEA, obtained by use of polyethylene glycol as precipitation agent, with the highest reusability capacity (80% of initial relative activity after five cycles of reaction). In addition, for the first time, the colloidal properties of MCLEAs and free cellulases were characterized by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential analyses, which were correlated with the activity of MCLEAs and free cellulases. As result, was demonstrated that increasing in colloidal stability with changes in temperature has improved the thermal stability of the MCLEAs. The hydrolysis of cellulose-derived from sugarcane bagasse and straw using MCLEAs showed a higher capacity of obtention of cello-oligosaccharides with value-added than the free cellulases. Lastly, final chapter engaged to further investigate the effects of an alternating magnetic field (AMF) in the activity of a MCLEA based on aminosilane-coated magnetic nanoparticles. For this purpose, it was used a factorial design (2x2) with two variables at two levels, frequency (203-420 kHz) and amplitude (3-6 kA m^{-1}). Independently of condition, AMF application decrease MCLEA activity when compared to field free condition. In addition, frequency variable implied in more significant effects in the MCLEA activity when compared to AMF amplitude and suggest that

further studies should be carried out in conditions of lower AMF frequency. However, although this last result has not been expected, it can help to fill the gap of further study in this growing and essential approach that is the use of magnetic support for enzyme immobilization.

RESUMO

A biomassa lignocelulósica vem se destacando como uma matéria-prima essencial para a produção de muitos produtos químicos de interesse industrial em áreas como a produção de energia, alimentos, fármacos, agricultura, meio ambiente e assim por diante. Apesar disso, muitas aplicações vêm esbarrando em uma série de dificuldades encontradas nos processos de conversão enzimática, como instabilidade operação das enzimas, alto custo de produção e purificação, reações de inibição e problemas de recuperação e reciclo. Para contornar esses problemas, muitos métodos de imobilização enzimática têm surgido, entre os quais, destaca-se a obtenção de agregados enzimáticos reticulados magnéticos (MCLEAs). Esta classe de materiais é obtida a partir da reação de reticulação entre agregados físicos de enzimas e suportes magnéticos, o qual pode unir as importantes propriedades catalíticas dos agregados físicos (como resultado da manutenção da estrutura nativa da enzima) à capacidade de recuperação e reciclo do suporte magnético (devido suas propriedades magnéticas intrínsecas). Frente a isso, esse trabalho relata a síntese, caracterização e potencial aplicação de MCLEAs de enzimas celulasas em processos de conversão de celulose. Dividido em três capítulos, primeiramente é apresentado um review sobre o estado da arte no que diz respeito a obtenção de produtos de valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica utilizando MCLEAs. No segundo capítulo, diferentes MCLEAs foram preparados na presença de nanopartículas magnéticas modificadas com quitosana, utilizando três agentes precipitantes diferentes (sulfato de amônio, etanol e polietileno glicol-PEG). Destacou-se a obtenção de um MCLEA utilizando etanol como agente de precipitação, o qual apresentou a maior atividade enzimática ($193,42 \text{ U g}^{-1}$) e atividade recuperada (43,53 %); e outro MCLEA obtido com polietileno glicol, com a maior capacidade de reciclo (80 % da atividade inicial após cinco ciclos de reação). Adicionalmente, pela primeira vez, as propriedades coloidais dos MCLEAs e celulasas livres foram caracterizadas por medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta, as quais foram correlacionadas com suas respectivas atividades enzimáticas. Foi demonstrado que o aumento na estabilidade coloidal frente às mudanças de temperatura incrementaram a estabilidade térmica dos MCLEAs. Quando aplicados na hidrólise de celulose obtida a partir de uma mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar, os MCLEAs mostraram a uma maior capacidade de obtenção de celooligosacarídeos de valor agregado do que as celulasas livres. Por fim, o último capítulo focou na investigação mais profunda dos efeitos da aplicação de um campo magnético alternado (AMF) na atividade de um MCLEA contendo nanopartículas magnéticas modificadas com aminosilano. Para isto, foi utilizado um planejamento fatorial (2×2) com duas variáveis em dois níveis, frequência (203-420 kHz) e amplitude ($3\text{-}6 \text{ kA m}^{-1}$). Independentemente da condição, a

aplicação do AMF diminuiu a atividade enzimática do MCLEA em comparação à condição sem campo. Adicionalmente, a frequência do AMF mostrou efeitos mais significante na atividade do MCLEA quando comparada à amplitude e sugere-se que estudos posteriores devam ser realizados em condições de frequências mais baixas. No entanto, embora este último resultado não tenha sido o esperado, ele pode ajudar a preencher a lacuna de estudos mais aprofundados desta crescente e essencial abordagem que é o uso de nanopartículas magnéticas como suporte para enzimas.

RESUMO EXPANDIDO EM PORTUGUÊS

INTRODUÇÃO

Celulases são um complexo enzimático constituído pelas enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. Estas três enzimas agem sinergicamente para produzir glicose a partir da celulose, o polímero carboidrato de baixo custo mais abundante na natureza. As enzimas endoglucanases hidrolisam as ligações β -1,4-glicosídicas na região amorfa da fibra de celulose, produzindo oligômeros de cadeia longa, enquanto as exoglucanases agem nas extremidades da fibra de celulose, produzindo celooligosacarídeos (COS). Posteriormente, os COS são hidrolisados à glicose por ação da enzima β -glicosidase. A hidrólise enzimática da celulose vem sendo extensivamente estudada para a produção de etanol de segunda geração e outros produtos de maior valor agregado. No entanto, embora as enzimas sejam biocatalizadores sustentáveis reconhecidos por sua alta especificidade, eficiência e baixa geração de resíduos, sendo empregadas em uma variedade de processo de interesse industrial, elas apresentam algumas limitações como instabilidade estrutural frente à variações de condições operacionais como pH e temperatura, alto custo de produção e purificação, reações de inibição, dificuldade de recuperação e reciclo, desvantagens estas que acabam onerando o custo de muitos processos. Visando a redução desse custo, o aumento da estabilidade, recuperação e o reciclo das enzimas cellulases, por meio de diversos métodos de imobilização, vem surgindo como uma importante estratégia.

Frente a isso, a obtenção de agregados enzimáticos reticulados (CLEA, *cross-linked enzyme aggregates*) é uma tecnologia robusta, pois a sua capacidade de manutenção da superestrutura organizada na formação dos CLEAs leva a uma boa estabilidade mecânica e à alta atividade enzimática. Os CLEAs consistem em agregados físicos de moléculas de enzimas obtidas pelo uso de agentes precipitantes (por exemplo, solventes, sais ou polímeros), os quais mantêm a estrutura terciária nativa da enzima, interligados entre si, através de agentes reticulantes como o glutaraldeído. Quando a precipitação é realizada na superfície de um suporte sólido, os CLEAs podem ser ligados covalentemente a ele, por exemplo, pelo próprio agente de reticulação, permitindo, desta forma, aliar as vantagens dos CLEAs às propriedades

NOTA

Por se tratar de um resumo da tese, o texto contido neste resumo expandido não pode ser utilizado para fins de citações bibliográficas em nome do autor. Para tal, utilize a íntegra do conteúdo ao longo dos capítulos dando o devido crédito aos seus respectivos autores.

intrínsecas do suporte, estratégia que pode levar a obtenção de biocatalisadores únicos. Entre os muitos suportes possíveis, as nanopartículas magnéticas (MNP, *magnetic nanoparticles*), tais como a magnetita (Fe_3O_4), vem ganhando destaque devido a sua alta área de superfície e capacidade de adsorção, baixa toxicidade, fácil modificação de superfície e, principalmente, suas propriedades magnéticas, as quais a permite ser recuperada a partir do meio reacional pela simples aplicação de campo magnético externo. Neste contexto, muitos trabalhos vêm relatando o uso de MNP como suporte para imobilização de CLEAs de diferentes enzimas. Em resumo, esses CLEAs magnéticos (MCLEAs) vêm apresentando incrementos na estabilidade frente às variações no pH e temperatura, decréscimos em reações inibitórias, alta atividade e, principalmente, uma excepcional capacidade de recuperação e reciclo, fazendo deles uma estratégia essencial na melhoria de muitos processos enzimáticos.

Desta forma, é nesse conjunto de ideias centrais que estão baseados os dois primeiros capítulos da presente tese de doutorado. O primeiro capítulo, intitulado “*Magnetic cross-linked enzyme aggregates (MCLEAs) applied to biomass conversion*”, consiste em artigo de revisão já publicado na Journal of Solid State Chemistry (doi: 10.1016/j.jssc.2018.11.003) que trata especificamente da aplicação de MCLEAs nos mais variados processos de conversão de biomassa lignocelulósica, além de aspectos como metodologias de síntese e caracterização dessa importante classe de materiais. O segundo capítulo, intitulado “*Synthesis and characterization of magnetic cross-linked enzyme aggregates of cellulases for the potential application in producing cello-oligosaccharides*” relata a síntese e caracterização de três MCLEAs sintetizados pelo autor utilizando diferentes agentes de precipitação (etanol, sulfato de amônio e polietilenoglicol), além de sua potencial aplicação para produção de celooligosacarídeos, uma classe de compostos com importantes propriedades prebióticas de interesse da indústria farmacêutica e alimentícia. Além disso, no segundo capítulo é apresentado um estudo ainda não relatado na literatura sobre como as propriedades coloidais dos MCLEAs e de enzimas celulases não imobilizadas atuam na estabilidade de ambos frente às variações de pH e temperatura do meio reacional.

Por fim, embora muitos resultados positivos venham sendo observados na aplicação de MCLEAs em processos de conversão de biomassa lignocelulósica, avanços ainda são necessários, principalmente no que diz respeito ao melhor aproveitamento de suas propriedades

NOTA

Por se tratar de um resumo da tese, o texto contido neste resumo expandido não pode ser utilizado para fins de citações bibliográficas em nome do autor. Para tal, utilize a íntegra do conteúdo ao longo dos capítulos dando o devido crédito aos seus respectivos autores.

magnéticas. E este é o foco do terceiro capítulo, intitulado “*Synthesis, characterization and evaluation of the alternating magnetic field effects in the catalytic activity of a magnetic cross-linked enzyme aggregate*”. As propriedades magnéticas das MNP não estão restritas à recuperação e reciclo magnético. Na presença de um campo magnético alternado (AMF, *alternating magnetic field*), como resultado das relaxações de Néel e Brown, as MNP rotacionam e colidem entre si produzindo calor, um fenômeno chamado hipertermia magnética. O campo magnético alternado pode alterar a cinética enzimática aumentando o número de colisões entre o MCLEA e o substrato, mudar o estado de agregação do MCLEA e disparar mudanças conformacionais na estrutura da enzima, processos estes que podem levar a melhorias na atividade enzimática do MCLEA. Frente a isto, o terceiro capítulo foca na avaliação dos efeitos de campo magnético alternado, sob diferentes condições de frequência e amplitude, na atividade enzimática de um MCLEA. Neste estudo foi observado que incrementos na frequência e na intensidade do campo levaram à diminuição da atividade enzimática do MCLEA. Além disso, a frequência apresentou efeitos estatisticamente mais significativos na atividade catalítica do MCLEA quando comparada à amplitude do campo.

NOTA

Por se tratar de um resumo da tese, o texto contido neste resumo expandido não pode ser utilizado para fins de citações bibliográficas em nome do autor. Para tal, utilize a íntegra do conteúdo ao longo dos capítulos dando o devido crédito aos seus respectivos autores.

TABLE SYMBOL

APTS: 3-aminopropyl-triethoxysilane

B: amplitude of the alternating magnetic field

C₅: sugar with 5 carbons

C₆: sugar with 6 carbons

CCD: central composite design

CLEA: cross-linked enzyme aggregates

CMC: carboxymethylcellulose

COS: cello-oligosaccharides

DLS: dynamic light scattering

DNS: 3,5-dinitrosalicylic acid

DP: degree of polymerization

f: frequency of the alternating magnetic field

FT-IR: Fourier transform infrared

GPC: gel permeation chromatography

MCLEA: magnetic cross-linked enzyme aggregates

MCLEA-AS: magnetic cross-linked enzyme aggregates obtained with ammonium sulfate

MCLEA-ET: magnetic cross-linked enzyme aggregates obtained with ethanol

MCLEA-PEG: magnetic cross-linked enzyme aggregates obtained with polietilenoglicol 600

MNP: magnetic nanoparticles

NP-APTS: 3-aminopropyl-triethoxysilane-modified magnetic nanoparticle

NP-CH: chitosan-modified magnetic nanoparticle

PDI: polydispersity index

PEG: polietilenoglicol 600

PSD: particle-size distribution

PXRD: powder X-ray diffraction

SEM: scanning electronic microscopy

TGA: thermogravimetric analyses

ζ-potential: zeta potential

TABLE OF CONTENTS

<i>Chapter 1</i>	27
<i>Magnetic cross-linked enzyme aggregates (MCLEAs) applied to biomass conversion</i>	27
1.1 Introduction: a look over biomass	28
1.2 Biomass: structure, enzymatic conversion and products	30
1.2.1 Structure	30
1.2.2 Enzymatic conversion	31
1.2.3 Products from C₆ and C₅ sugars	31
1.2.4 Magnetite nanoparticles as enzymes supports	32
1.2.5 Enzyme immobilization in magnetic supports and MCLEAs synthesis	33
1.2.6 MCLEAs characterization	37
1.2.6.1 Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) .	37
1.2.6.2 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)	38
1.2.6.3 X-ray diffraction (XRD)	38
1.2.6.4 Circular dichroism spectroscopy (CDS)	39
1.2.6.5 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)	40
1.2.6.6 Thermal analysis	40
1.3 MCLEAs applied to biomass conversion	41
1.3.1 Cellulose conversion	42
1.3.2 Hemicellulose conversion	45
1.3.3 MCLEAs applied to another biomass-derived conversion	46
1.4 Conclusions and outlooks	50
Acknowledgements	51
References	51
<i>Chapter 2</i>	63
<i>Synthesis and characterization of magnetic cross-linked enzyme aggregates of cellulases for the potential application in producing cello-oligosaccharides</i>	63
2.1 Introduction	64
2.2 Experimental section	65
2.2.1 Materials	65
2.2.2 Characterization	66
2.2.3 One-step synthesis of chitosan-coated magnetic nanoparticles (NP-CH)	67
2.2.4 Synthesis of cellulases MCLEAs	67
2.2.5 Determination of enzyme loading efficiency	67

2.2.6	Enzyme activity assay (optimal pH and temperature condition).....	68
2.2.7	MCLEAs reusability assay	69
2.2.8	Cellulose obtained from sugarcane bagasse and straw mixture	69
2.2.9	Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse and straw	69
2.3	Results and discussion.....	70
2.3.1	Synthesis and characterization of NP-CH and MCLEAs.....	70
2.3.2	Enzymatic activity assay	74
2.3.3	Reusability assay	81
2.3.4	Cellulose hydrolysis and cello-oligosaccharides (COS) production.....	83
2.4	Conclusions	86
	Acknowledgments	87
	References	87
	<i>Chapter 3.....</i>	<i>94</i>
	<i>Synthesis, characterization and evaluation of the alternating magnetic field effects in the catalytic activity of a magnetic cross-linked enzyme aggregate.....</i>	<i>94</i>
3.1	Introduction.....	95
3.2	Experimental section.....	96
3.2.1	Materials and measurements	96
3.2.2	Synthesis of APTS coated magnetite nanoparticles (NP-APTS).....	97
3.2.3	Syntheses of magnetic cross-linked cellulase aggregate (MCLEA)	97
3.2.4	Cellulase activity assay: central composite design	98
3.2.5	Hyperthermia assay of the MCLEA.....	100
3.3	Results and discussion.....	100
3.3.1	Synthesis and characterization of MCLEA	100
3.3.2	Cellulase immobilization and activity assay optimized by CCD.....	102
3.3.3	Magnetic hyperthermia assay	105
3.4	Conclusions	108
	Acknowledgments	108
	References	109
	General conclusions	115
	Attachments	116

References

- [1] S. Velasco-lozano, M. Knez, F. Lo, Coupling enzymes and inorganic piezoelectric materials for electricity production from renewable fuels, *Acs Appl. Energy Mater.* 1 (2018) 2032–2040. <https://doi.org/10.1021/acsaem.7b00328>.
- [2] E. Ermis, Halal status of enzymes used in food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 64 (2018) 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.008>.
- [3] M. Kalantari, M. Yu, Y. Yang, E. Strounina, Z. Gu, X. Huang, Tailoring mesoporous-silica nanoparticles for robust immobilization of lipase and biocatalysis, *Nano Res.* 10 (2017) 605–617. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1320-6>.
- [4] J. Chapman, A.E. Ismai, C.Z. Dinu, Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks, *Catalysts.* 8 (2018) 238–263. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.
- [5] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- [6] N. Karaki, A. Aljawish, C. Humeau, L. Muniglia, J. Jasniewski, Enzymatic modification of polysaccharides: mechanisms, properties, and potential applications: a review, *Enzyme Microb. Technol.* 90 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>.
- [7] M. Bilal, Y. Zhao, T. Rasheed, M.N. Iqbal, Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 2530–2544. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025>.
- [8] R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1583–1587.
- [9] S.S. Nadar, A.B. Muley, M.R. Ladole, P.U. Joshi, Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase, *Int. J. Biol. Macromol.* 84 (2016) 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.082>.
- [10] S. Velasco-lozano, F. López-gallego, J.C. Mateos-díaz, E. Favela-torres, Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement - a review, *Biocatalysis.* (2015) 166–177. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0012>.

- [11] H. Vaghari, H.J. Mojgan, Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z>.
- [12] S. V Otari, S.K.S. Patel, S. Kim, J.R. Haw, V.C. Kalia, I. Kim, J. Lee, Copper ferrite magnetic nanoparticles for the immobilization of enzyme, *Indian J. Microbiol.* 59 (2019) 105–108. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0768-3>.
- [13] C.C.S. Fortes, A.L. Daniel-da-silva, A.M.R.B. Xavier, A.P.M. Tavares, Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 117 (2017) 1–8 <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.009>.
- [14] J. Feng, S. Yu, J. Li, T. Mo, P. Li, Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles, *Chem. Eng. J.* 286 (2016) 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.083>.
- [15] M. Reza, J. Mohammadi, M. Peyda, Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil, *Renew. Energy.* 101 (2017) 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.09.022>.
- [16] S.S. Nadar, V.K. Rathod, Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase, *Enzyme Microb. Technol.* 83 (2016) 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.10.009>.
- [17] A. Awad, W. Adel, M. Özacar, Z. Ziyade, Evaluation of different saccharides and chitin as eco-friendly additive to improve the magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) activities, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 2040–2050. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.075>.
- [18] S. Peirce, M. Elena, R. Isticato, R. Fernández, P. Salatino, A. Marzocchella, Structure and activity of magnetic cross-linked enzyme aggregates of bovine carbonic anhydrase as promoters of enzymatic CO₂ capture, *Biochem. Eng. J.* 127 (2017) 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.014>.
- [19] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W. Kim, W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 23501–23544.

- <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>.
- [20] I. Armenia, M. Valeria, G. Bonavia, L. De Matteis, P. Ivanchenko, G. Martra, R. Gornati, J.M. De, G. Bernardini, Enzyme activation by alternating magnetic field: importance of the bioconjugation methodology, *J. Colloid Interface Sci.* 537 (2019) 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.058>.
- [21] N.L. Klyachko, M. Sokolsky-papkov, N. Pothayee, M. V Efremova, D.A. Gulin, N. Pothayee, A.A. Kuznetsov, A.G. Majouga, J.S. Riffle, Y.I. Golovin, A. V Kabanov, Changing the enzyme reaction rate in magnetic nanosuspensions by a Non-heating magnetic Field, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 51 (2012) 12016–12019. <https://doi.org/10.1002/anie.201205905>.
- [22] Y. Liu, C. Guo, C.-Z. Liu, Enhancing the resolution of (R,S)-2-octanol catalyzed by magnetic crosslinked lipase aggregates using an alternating magnetic field, *Chem. Eng. J.* 280 (2015) 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.089>.
- [23] G. Liu, J. Zhang, J. Bao, Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39 (2016) 133–140. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1497-1>.
- [24] N. Srivastava, M. Srivastava, P.K. Mishra, V.K. Gupta, G. Molina, Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82 (2018) 2379–2386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>.
- [25] F. Yazdani, M. Seddigh, Magnetite nanoparticles synthesized by co-precipitation method: The effects of various iron anions on specifications, *Mater. Chem. Phys.* 184 (2016) 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.09.058>.
- [26] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 254 (1976) 248–254.
- [27] M. Tanaka, M. Taniguchi, R. Matsuno, T. Kamikubo, Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*, *J. Ferment. Technol.* 59 (1981) 177–183.
- [28] A.R. Khataee, M. Fathinia, S. Aber, M. Zarei, Optimization of photocatalytic treatment of dye solution on supported TiO₂ nanoparticles by central composite design: intermediates identification, *J. Hazard. Mater.* 181 (2010) 886–897.

- <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.096>.
- [29] Z.M. Gao, T.. Wu, S.. Peng, Preparation and structural features of ultrafine spinel magnesium ferrites, *ACTA PHYSICO-CHIMICA Sin.* 11 (1995) 395–400.
<https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB19950503>.
- [30] M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Shen, H. Zhang, N. Gu, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 212 (2003) 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00305-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00305-9).
- [31] L.D. White, C.P. Tripp, Reaction of (3-Aminopropyl) dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 232 (2000) 400–407.
<https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7224>.
- [32] J. Sánchez-Ramírez, J.L. Martínez-Hernández, P. Segura-Ceniceros, G. López, H. Saade, M.A. Medina-Morales, R. Ramos-González, C.N. Aguilar, A. Ilyina, Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave Atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40 (2017) 9–22. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1670-1>.
- [33] R. Saini, J.K. Saini, M. Adsul, A.K. Patel, A. Mathur, D. Tuli, R.R. Singhanian, Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application, *Bioresour. Technol.* 188 (2015) 240–246.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.048>.
- [34] L. Zang, J. Qiu, X. Wu, W. Zhang, E. Sakai, Y. Wei, Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 3448–3454. <https://doi.org/10.1021/ie404072s>
- [35] J. Han, L. Wang, Y. Wang, J. Dong, X. Tang, L. Ni, L. Wang, Preparation and characterization of Fe₃O₄-NH₂@₄-arm-PEG-NH₂, a novel magnetic four-arm polymer-nanoparticle composite for cellulase immobilization, *Biochem. Eng. J.* 130 (2018) 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.11.008>.
- [36] K. Saha, P. Verma, J. Sikder, S. Chakraborty, S. Curcio, Synthesis of chitosan-cellulase nanohybrid and immobilization on alginate beads for hydrolysis of ionic liquid pretreated sugarcane bagasse, *Renew. Energy.* 133 (2019) 66–76.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.014>.

- [37] J. Zdarta, A. Jedrzak, Ł. Klapiszewski, T. Jesionowski, Immobilization of cellulase on a functional inorganic-organic hybrid support: stability and kinetic study, *Catalysts*. 7 (2017) 374–390. <https://doi.org/10.3390/catal7120374>.
- [38] M. Rastogi, S. Shrivastava, Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 80 (2017) 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>.
- [39] M. Ballesteros, J. Carrasco, C. Martín, M.J. Negro, F. Saez, R. Saez, Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol, *Applied Biochem. Biotechnol.* 28 (1991) 307–315.
- [40] W. Kopp, T.P. Da Costa, S.C. Pereira, M. Jafelicci, R.C. Giordano, R.F.C. Marques, F.M. Araújo-Moreira, R.L.C. Giordano, Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: catalytic and morphological studies, *Process Biochem.* 49 (2014) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.09.024>.
- [41] L. Cao, Immobilised enzymes: science or art?, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>.
- [42] L. Betancor, A. Hidalgo, G. Ferna, C. Mateo, M. Guisan, Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques, *Biotechnol Prog.* 19 (2003) 763–767.
- [43] J. Cleiton, S. Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-murcia, Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes, *ChemCatChem.* 7 (2015) 2413–2432. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500310>.
- [44] R. Ahmad, M. Sardar, Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix, *Biochem. Anal. Biochem.* 4 (2015) 2–8. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>.
- [45] X.J.A. Janssen, A.J. Schellekens, K. Van Ommering, L.J. Van Ijzendoorn, M.W.J. Prins, Controlled torque on superparamagnetic beads for functional biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1937–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.09.024>.
- [46] G. V. Kurlyanskaya, M.L. Sánchez, B. Hernando, V.M. Prida, P. Gorria, M. Tejedor,

- Giant-magnetoimpedance-based sensitive element as a model for biosensors, *Appl. Phys. Lett.* 3053 (2015) 3053–3055. <https://doi.org/10.1063/1.1571957>.
- [47] T. Xia, W. Lin, C. Liu, C. Guo, Improving catalytic activity of laccase immobilized on the branched polymer chains of magnetic nanoparticles under alternating magnetic field, *J. Chem. Technol .Biotechnol.* (2018) 88–93.

General conclusions

Considering the current demand for renewable raw materials, lignocellulosic biomass shows as an essential low-cost biomaterial for several areas of financial and environmental interest. Faced it, many approaches have been studied and applied out in a variety of biomass conversion processes.

In summary, this thesis aimed to modify magnetic nanoparticles with cellulase enzymes and applied it in a biomass conversion process. For this purpose, different MCLEAs were synthesized and showed potential for obtention of value-added chemicals from lignocellulosic biomass. Essentially, they showed potential for cello-oligosaccharides production, an important class of glucose oligosaccharides with prebiotics properties of food and pharmaceutical industry interest. Besides that, cross-linking reaction between cellulases and magnetic nanoparticles led to production of MCLEAs with some enhanced properties when compared to free enzymes, among which can be cited thermal stability and recovery and recycle capacity. Thus, such enhancement in catalytic properties suggests a positive effect of the magnetic nanoparticles in the cellulase cross-linked structure.

Further studies have been carried out to increase the knowledge in regard to some physical-chemistry properties of the MCLEAs. Thus, it was shown that as increases in colloidal stability can avoid the thermal denaturation of enzymes and that high frequency of alternating magnetic field can decrease its respective catalytic activity. In addition, such studies can be explored to assess physical-chemistry behavior of other systems involving different enzymes and support.

Lastly, it is expected that this work can contribute with current and future advances in the use of magnetic nanoparticles as support for enzyme immobilization. But, not restricted to only it, it is expected that it can help in changes of paradigms of current industrial manufacture toward more sustainable industrial processes.