

果胶酶固定化研究的最新进展

郭旭¹, 董一鑫¹, 陆益鑫², 朱西挺^{1*}, 蔡燕^{1*}

¹南通大学化学化工学院, 江苏 南通

²南通市海门实验学校, 江苏 南通

收稿日期: 2023年8月30日; 录用日期: 2023年11月1日; 发布日期: 2023年11月8日

摘要

笔者综述了近年来固定化果胶酶领域的研究成果。根据无机材料, 有机材料和复合材料的分类对果胶酶的固定化研究进行了总结, 重点介绍了复合材料固定化果胶酶应用, 并对果胶酶固定化领域的未来发展提出了展望。

关键词

果胶酶, 固定化, 复合材料, 磁性纳米材料

The Latest Progress in the Immobilization of Pectinase

Xu Guo¹, Yixin Dong¹, Yixin Lu², Xiting Zhu^{1*}, Yan Cai^{1*}

¹School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

²Nantong Haimen Experimental School, Nantong Jiangsu

Received: Aug. 30th, 2023; accepted: Nov. 1st, 2023; published: Nov. 8th, 2023

Abstract

The author reviews the research achievements in the field of immobilized pectinase in recent years. This paper summarizes the research on the immobilization of pectinase based on the classification of inorganic materials, organic materials, and composite materials, with a focus on the application of composite material immobilization of pectinase, and proposes prospects for the future development of pectinase immobilization.

*通讯作者。

Keywords

Pectinase, Immobilization, Composite Material, Magnetic Nanomaterials

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

果胶酶是一种可以使果汁、果酒澄清并降低果胶加工过程中营养物质损耗的一种酶，是生物技术行业的新兴酶。果胶酶也广泛地应用于医药领域、食品行业、生物传感器、环境保护及能源利用、生物脱胶、纺织等领域[1] [2]。游离的果胶酶反应后不能回收、不能实现重复利用。固定化酶在一定程度上弥补了这些缺点，还能防止外源物质对果品的污染，提高酶的使用效率，从而提高果胶酶的性能和商业可行性[3] [4]。

研究人员提出了许多方法用于果胶酶的固定化。包埋和共价结合到载体是较为流行和常用的方法，主要是这两者有较好的循环使用效率[5] [6]。近五年来，果胶酶的固定化研究依然是热点，主要集中在对固定化载体的改良和挖掘，不断涌现出新的改进与创新[7]。一个亮点是对聚合物的开发利用，因为它们具有稳定性高、形貌可调控等优点，而且可以构筑柔软、坚硬或弹性等多种质地。还有一个亮点方向是磁性纳米材料。果汁澄清化的过程会产生不溶性沉淀物，而固定化酶的有效回收和沉淀物的分离是无法通过简单的离心和过滤方法实现的。磁性纳米材料允许通过施加外部磁场从反应体系中快速、容易和高效地回收固定化酶，因此它们在众多固定化载体中脱颖而出。尽管单一的固定化载体具有种类多，容易制备等优势，但在普适性方面的不足影响了其应用，于是越来越多的新型复合材料不断涌现。

本文主要综述了近年固定化果胶酶的最新进展。第一个部分概述了果胶酶在无机载体(多孔 ZSM-5 沸石、多孔球形还原氧化石墨烯)上的固定化；第二部分总结了果胶酶在有机材料(聚苯胺基超分子、HPD-750 大孔树脂、共价有机框架材料和糠醛渣)上的固定化。第三部分覆盖复合结构载体，主要是海藻酸钠复合材料和磁性纳米复合材料。

2. 无机载体

无机载体材料有化学性质稳定、可持续利用、对微生物无毒害、不易受微生物分解等优点，但也存在颗粒粒径与比表面积不易改变、酶易从体系内脱落两个主要缺点。酶的循环利用性能是非常重要的固定化考察指标，近年来无机材料固定化果胶酶的研究并不多，但也不乏有表现优异的例子。

Liu 等[8]通过吸附和交联的组合，将果胶酶用戊二醛交联在多孔 ZSM-5 沸石上。多孔 ZSM-5 沸石固定化的果胶酶对水解模型底物 4-硝基苯基 β -D-吡喃糖苷中的 β -糖苷键表现出超高效的生物催化活性，具有宽的操作温度范围、高的热稳定性和优异的重复使用性。该固定化酶制剂在高温(70°C)下的残余酶活比游离果胶酶高 9 倍。阿伦尼斯定律热失活动力学分析显示固定化果胶酶比游离果胶酶具有更高的变性活化能(315 kJ·mol⁻¹)和更长的半衰期(62 min⁻¹)。ZSM-5 固定化的果胶酶在所有已报道的果胶酶固定化催化剂中显示出最佳的乙醇耐受性，在 10% (v/v)乙醇浓度下，果胶酶的活性比游离果胶酶高 247%。在促进黄芩苷中 β -糖苷键的水解转化为黄芩苷的反应中，ZSM-5 固定化的果胶酶显示 98% 的转化率的优异表现，表现出实际工程应用的潜力。Azimi 等[9]在填充床反应器(PBR)中使用固定在玻璃珠上的果胶酶对葡萄汁进行连续澄清取得成功，可以作为果汁工业中使用的间歇系统的潜在替代方案。

多孔球形还原氧化石墨烯(rGO),具有丰富的孔结构、比表面积高、硬度强和酶生物相容性好等优点。[10]连续使用 10 次后,多孔球形 rGO 固定化酶的初始相对酶活性仍保持在 87%左右,具有优于游离酶的较强的热稳定性、酸碱耐受性和储存稳定性。Wu 等[11]开发了一种简便快速的用无机杂化纳米花制备固定化果胶酶的方法,希望可以提高酶催化性能。与游离果胶酶相比, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 杂化纳米花固定化果胶酶较游离状态最高的相对活性增加了 2.5 倍。虽然最佳温度和 pH 没表现出明显差异,但固定化果胶酶在 55℃ 孵育 24 h 后仍保持 33%的残留活性,而游离果胶酶 18 h 后即完全失去活性。此外,固定化酶稳定性明显提高,重复使用 4 次后仍有超过 50%的残留活性。

3. 有机载体

有机载体材料主要包括天然多糖、合成有机高分子化合物和农业副产废弃物等,有选择范围广、成本低、原材料获取容易等优点,但也存在载体易受微生物分解、机械强度低、改性引入的化学基团脱落可能造成反应产物污染等缺点。

Deng Ziyu 等[12]将果胶酶固定在采用内源乳化法制备的海藻酸钙微球中。固定化酶的最适温度为 60℃,比游离果胶酶高近 10℃,3 批反应后保留了其初始活性的 63%,表现出良好的操作稳定性。

水凝胶是通过物理交联或化学交联而得到的具有三维网络结构体系的亲水高分子聚合物。它们不溶于水,但能吸收大量的水溶胀。郝红英课题组[13]以戊二醛为交联剂制备聚苯胺基超分子-戊二醛(PPH-GA)复合材料固定化果胶酶并研究其催化性能。PPH-GA 复合材料具有三维网状结构,孔径大,有利于酶的固定化。固定化酶最佳的酶浓度为 3%、最佳反应温度为 40℃、最佳 pH 值为 3.5、最佳反应时间为 120 min、最佳果胶浓度为 2%。

HPD-750 大孔树脂是中极性的苯乙烯型树脂,平均孔径在 85~90 nm,物理化学性质稳定,具有较大的比表面积,生物相容性好、酶负载量高、机械稳定性高。漆丹萍课题组[14]以 HPD-750 大孔树脂为载体通过物理吸附固定化果胶酶。与游离酶相比,固定化果胶酶在 pH 3.0~5.5 范围内的相对酶活力保持在 80%以上;热稳定性也有了很大提升,在 60℃时活力依然保持在 97%。

共价有机框架材料由于其独特的化学和机械性能,在固定化酶领域具有潜在的应用前景。Cheng 等[15]以 1,3,5-三甲醛和 3,3'-二羟基联苯胺为有机单体,获得了一种新的固定化酶的 COF 材料。得益于大的表面积、有序的通道、可调的孔隙大小和可用的活性位点,果胶酶能有效地固定在 COF-BTDH 上,连续 5 个循环后仍保持 85%以上的活性。

糠醛渣是玉米芯、稻壳、等农副产品加工剩余物中的聚戊糖成分在高温水解生产呋喃甲醛后得到的固体废渣,将糠醛渣磺化可以赋予其很好的化学反应活性。毕淑娟课题组[16]利用静电自组装技术将壳聚糖包覆表面,得到糠醛渣-壳聚糖和磺化糠醛渣-壳聚糖复合材料。与游离酶相比,固定化果胶酶的最佳 pH 值低 0.5,更耐酸性,热稳定性也有了很大提升,特别是磺化糠醛渣复合材料固定化果胶酶耐高温性能更强,70℃时相对酶活为 92.54%。糠醛渣复合材料的固定化果胶酶在重复循环使用 8 次后剩余相对酶活可达 81.78%,磺化糠醛渣复合材料的固定化果胶酶在 4℃下储存 32 d 后仍剩余 88.98%的相对酶活。两种固定酶都表现出较好的操作稳定性和储存稳定性,有较好的经济价值和应用前景。

Oktaç 等[17]采用了一种新的酶固定化方法冷冻凝胶技术,在温和的条件下进行氨基点击反应将果胶酶自发固定聚乙烯亚胺基冷冻凝胶上。果胶酶的固定化率达 90%,60 天后保持其初始活性的 70%。冷冻凝胶固定化的果胶酶具有更宽的 pH 耐受范围(6.5~8.0)和更高的耐热温度(50℃以上)。固定化酶在 pH 6.5 和 55℃条件下能保持 100%的最大活性。

4. 复合材料

复合材料可将两种或两种以上材料的功能复合、互补和优化,可以突破固定化酶对单一载体的限制。

选择和制备合适的复合材料, 并对其适当改性, 有望全面提高固定化酶的酶载量、稳定性与重复使用能力, 但也可能存在成本高、工序复杂、技术难度较大等缺点。

4.1. 海藻酸钠

海藻酸钠是褐藻类中的天然线性高分子多糖, 含有丰富的自由羧基和羟基, 成本低, 具有良好的生物相容性和降解性, 但性质不太稳定, 无法长期保存, 故通常采取复合改性措施。

郝红英课题组[18]以海藻酸钠与 MOFs 复合材料来固定化果胶酶并研究其催化性能。MOFs 是由无机金属中心与桥连的有机配体通过自组装相互连接形成的一类具有周期性网络结构的晶态多孔材料。具有孔隙率高、比表面积大、孔径可调以及拓扑结构多样性等优点。先通过让 MOFs 自由生长在海藻酸钠- Cu^{2+} 凝胶中制备得到交联的复合材料, 再将制得的海藻酸钠微球和果胶酶溶液在 37°C 恒温振荡反应 4 h 制得固定化果胶酶。固定化果胶酶的最佳 pH 从 3.0 (自由酶) 迁移至 3.5, 最佳温度从 40°C (自由酶) 迁移至 50°C 。

漆丹萍等[19]开发了用于果胶酶固定化的强度高且可回收的多孔羟基磷灰石/海藻酸钙复合珠。在 40°C 、pH 4.0、5.2 U/L 果胶酶浓度和 4 h 反应时间的最佳固定化参数下, 果胶酶的最高酶活达(8995 U/mg), 固定化率最高达 91%。固定化果胶酶的热稳定性和 pH 耐受性均优于游离果胶酶, 将游离果胶酶 30 天的储存稳定性从 20% 提高至 50%。

Mohammadi 等[20] [21]以海藻酸-蒙脱土为载体对果胶酶的共价固定化进行了研究。固定化不影响果胶酶的最佳温度(40°C), 但最佳 pH 从 5.5 降低至 5.0。米氏常数(Km)值显著降低, 表明固定化后酶对底物的亲和力增强。固定化酶重复使用 6 个循环后, 其初始活性保持在 53% 左右。

Aksu 等[22]采用双交联剂环氧氯丙烷和三聚磷酸钠将果胶酶固定在壳聚糖-海藻酸盐-粘土微球复合材料。将最佳温度从 50°C 提高到 60°C 。该固定化酶重复使用 5 次后保持了 45% 的初始活性。在 4°C 的溶液中储存 30 天后, 该酶保持了 67% 的活性。

4.2. 磁性纳米结构上果胶酶的固定化

磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs), 是一类利用磁力和磁场的改变来控制粒子运动轨迹的新型材料, 这一特性不仅便于游离酶与载体的结合和分离, 同时也便于固定化酶的分离与回收。纳米材料具有较大的比表面积和较多的孔洞, 能够提高酶的固载量与稳定性, 增大酶与载体之间的结合力[23] [24] [25]。磁性纳米材料虽具有易于回收利用的明显优势, 但其表面缺乏足够的功能部分, 特别是在氧化和酸性条件下, 需要结合一些生物相容性化合物用于维持 MNPs 的稳定性。常用的办法是将磁性粒子和有机高分子相结合制成磁性高分子微球, 并在其表面连接多种活性基团, 如羟基(OH)、羧基(COOH)、醛基(CHO)和巯基(SH)等, 从而实现酶的固定化[26]。

利用黄曲霉生物合成超顺磁性磁铁矿 MNPs 纳米粒子, 并将果胶酶和木聚糖酶分别固定在 MNPs 表面[27]。果胶酶和木聚糖酶共价固定在 MNP 的效率分别为 84% 和 77%。与游离酶相比固定化酶对 pH 和温度变化表现出增强的耐受性, 并表现出改善的储存稳定性。

壳聚糖和磁性粒子结合使用作为固定化果胶酶载体是一种有效的策略。壳聚糖对蛋白质极具亲和力, 易连接活性官能团, 其亲水性、无毒性, 生物相容性、高耐化学降解性和抗菌性能也增加了研究者们对它的兴趣。同时磁性粒子促进了酶催化剂的分离从而允许容易重复使用。Lucas 等[28]比较了三个颗粒尺寸(纳米、微米和宏观)的壳聚糖作为复合磁性粒子固定化材料的区别。宏观尺度壳聚糖颗粒在制备的三个尺寸的材料中热稳定性最高, 而且表现出最高的保留活性(在对所有果汁特别是橙汁重复使用 25 个循环之后, 其中最终残留活性为 85%)。宏观颗粒的壳聚糖比小颗粒更易进行分离操作。但是纳米级别的壳聚糖固定化果胶酶的动力学参数和酶活性回收率最佳。Asieh 等[29]将果胶酶共价偶联

到三聚氯功能化的壳聚糖包封的磁铁矿纳米颗粒的表面。固定化后果胶酶的 α -螺旋和 β -折叠部分减少, 无序结构含量略有增加。固定化果胶酶在最佳条件(40°C, pH 4.5)下循环 13 次后, 保留了约 60% 的初始催化活性。固定化提高了果胶酶的储存稳定性, 在 4°C 下储存 75 天后, 游离和固定化酶分别保留了 43% 和 74% 的初始活性。固定化果胶酶因更稳定且可回收利用对聚半乳糖醛酸的有效降解优于游离果胶酶。Marjan 等[30]开发了交联剂 Kefiran 代替传统的戊二醛用于果胶酶在壳聚糖磁性颗粒上的固定化。戊二醛廉价易得, 操作简便, 易与蛋白质产生共价键而常作为固定化酶工艺的交联剂, 但因尺寸较小可以很容易地穿透催化区域并与负责催化的氨基酸残基交联, 也会有导致酶活性显著降低的情况发生。大分子 kefiran 交联的壳聚糖磁性纳米颗粒是一种高效、实用、绿色的固定化果胶酶的方法。游离果胶酶和固定化果胶酶的最适 pH 值和温度分别是(50°C, pH 4.0)和(60°C, pH 4.0), 一个月后固定化果胶酶保留活性为 60.23%。

聚乙二醇(PEG)是一种环氧乙烷衍生聚合物, 具有无毒性、无抗原性, 亲水性和生物相容性等诸多优点。Kharazmi [31]等通过化学共沉淀法用 FeCl_3 和 FeCl_2 溶液制备磁性纳米粒子 MNP, 并通过偶联改性试剂将三聚氯氰(CC)连接在 MNP 的表面, 制得改性的 MNP-PEG-CC, 最后将果胶酶溶液与 MNP-PEG-CC 共价结合制得固定化果胶酶。固定化 MNPs 果胶酶在极端 pH 值条件下热稳定性得到增强, 储存稳定性和可回收性保持在 94% 以上, 在 25°C 下储存 125 天后主要活性仍保留有 55%。Kharazmi 等将果胶酶和木聚糖酶的同时结合在氰尿酸氯官能化的 PEG 接枝的 MNPs 上[32]。与游离酶相比, 共固定化果胶酶和木聚糖酶具有良好的稳定性和较高的活性 pH 和温度, 在存放 6 个月后还保存 60% 的剩余酶活。

4.3. 其它

Lei 等[33]合成了一种用于离子键固定化果胶酶的双刺激响应载体材料。通过原子转移自由基聚合、点击化学和水解方法, 合成了聚苯乙烯-b-聚甲基丙烯酸(PS-b-PMAA)以及对光和 pH 敏感的聚苯乙烯-(5-炔丙基醚-2-硝基苄基溴异丁酸)-b-聚(二乙氨基)甲基丙烯酸酯-b-聚聚乙二醇甲基丙烯酸酯(PS-ONB-PDEAEMA-b-PPEGMA), 这两个部分在水溶液中自行组装成胶束。胶束在较高的 pH 下收缩, 并且在紫外线照射下其尺寸减小。该载体能够在 pH 5.0 和 60°C 下吸附 10 U/mL 的固定化果胶酶(约 223 mg/g), 最高相对活性高达约 95%。固定化果胶酶在 8 个循环后保持了 50% 以上的初始活性。

将果胶酶(BSP)通过共价结合固定在氧化石墨烯/壳聚糖复合材料(GO/CS)上, 以增强其循环利用和操作稳定性的特点[34]。GO/CS 固定化果胶酶的活性为在最佳条件下达到 $804 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$, 固定化率为 $80.64\% \pm 1.15\%$ 。GO/CS 果胶酶在 50°C、55°C 和 60°C 时表现出比游离果胶酶高 3 倍的半衰期($t_{1/2}$)。GO/CS 果胶酶的 V_{max} 和 K_m 值几乎等于游离果胶酶, 表明固定化后依然保留了果胶酶构象的灵活性。

5. 结论

固定化酶具有广阔的工业应用前景, 是酶工程的热点, 制备出更好保持酶活力、循环使用次数更多、更易于回收利用、能更好实现工业化的固定化果胶酶是共同的研究目标。材料科学尤其是高分子合成与纳米技术的发展为果胶酶固定化提供了极为丰富的载体材料。有效的复合载体的发现和新型固定化方法的探索是果胶酶固定化技术的关注重点。目前, 国内外对于固定化果胶酶在工业化生产方面的报道并不多, 果胶酶固定化技术难以满足工业生产的需求。国内关于果胶酶固定化的研究稍晚于国外的研究进度, 结合当前固定化酶的发展趋势, 将创新的理念和思路融入酶固定化技术是发展所趋。

基金项目

南通市民生科技项目(MS12022006)。

参考文献

- [1] Amin, F., Bhatti, H.N. and Bilal, M. (2019) Recent Advances in the Production Strategies of Microbial Pectinases—A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **122**, 1017-1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
- [2] Bilal, M. and Iqbal, H.M. (2020) State-of-the-Art Strategies and Applied Perspectives of Enzyme Biocatalysis in Food Sector—Current Status and Future Trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **60**, 2052-2066. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1627284>
- [3] Shrestha, S., Rahman S. and Qin, W.S. (2021) New Insights in Pectinase Production Development and Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **105**, 9069-9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- [4] Bilal, M. and Iqbal, H.M. (2019) Naturally-Derived Biopolymers: Potential Platforms for Enzyme Immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **130**, 462-482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>
- [5] Wahab, R.A., Elia, N. and Abdullah, F. (2020) On the Taught New Tricks of Enzymes Immobilization: An All-Inclusive Overview. *Reactive and Functional Polymers*, **152**, Article ID: 104613. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>
- [6] Liu, D.M. and Dong, C. (2020) Recent Advances in Nano-Carrier Immobilized Enzymes and Their Applications. *Process Biochemistry*, **92**, 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.005>
- [7] Rehman, H., Hameed Baloch, A. and Asif Nawaz, M. (2021) Immobilization and Applications. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, **6**, 1-16.
- [8] Liu, C., Zhang, L.M., Tan, L., *et al.* (2021) Immobilized Crosslinked Pectinase Preparation on Porous ZSM-5 Zeolites as Reusable Biocatalysts for Ultra-Efficient Hydrolysis of Beta-Glycosidic Bonds. *Frontiers in Chemistry*, **9**, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.677868>
- [9] Azimi, S.Z., Hosseini, S.S. and Khodaiyan, F. (2021) Continuous Clarification of Grape Juice Using a Packed Bed Bioreactor Including Pectinase Enzyme Immobilized on Glass Beads. *Food Bioscience*, **40**, Article ID: 100877. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100877>
- [10] Gao, M., Li, X.Y., Qi, D.P., *et al.* (2020) Green Synthesis of Porous Spherical Reduced Graphene Oxide and Its Application in Immobilized Pectinase. *ACS OMEGA*, **5**, 32706-32714.
- [11] Wu, P., Luo, F., Lu, Z., *et al.* (2020) Improving the Catalytic Performance of Pectate Lyase through Pectate Lyase/Cu₃(PO₄)₂ Hybrid Nanoflowers as an Immobilized Enzyme. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, Article 280. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00280>
- [12] Deng, Z., Wang, F., Zhou, B., *et al.* (2019) Immobilization of Pectinases into Calcium Alginate Microspheres for Fruit Juice Application. *Food Hydrocolloids*, **89**, 691-699. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.031>
- [13] 郝红英, 马金玲, 詹海鹏, 等. 聚苯胺超分子水凝胶固定化果胶酶的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(11): 24-28.
- [14] 漆丹萍, 林江丽, 高敏, 等. 以 HPD-750 大孔树脂为载体材料固定化果胶酶[J]. 化学通报, 2020, 83(2): 161-166.
- [15] Hao, C., Wei, Y.Q., Han, J.Y., *et al.* (2022) Catalytic Hydrolysis of Ginsenosides by Pectinase Immobilized on a Covalent Organic Framework Material. *Process Biochemistry*, **118**, 317-322. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.038>
- [16] 毕淑娟, 郝红英, 汪明圆, 等. 糠醛渣复合材料固定果胶酶的制备[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 77-82.
- [17] Oktay, B., Demir, S. and Kayaman-Apohan, N. (2020) Immobilization of Pectinase on Polyethyleneimine Based Support via Spontaneous Amino-Yne Click Reaction. *Food and Bioproducts Processing*, **122**, 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.010>
- [18] 郝红英, 于正花, 詹海鹏, 等. 海藻酸钠与 MOFs 复合材料固定化果胶酶的研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(23): 6-9.
- [19] Qi, D.P., Gao, M., Li, X.Y., *et al.* (2020) Immobilization of Pectinase onto Porous Hydroxyapatite/Calcium Alginate Composite Beads for Improved Performance of Recycle. *ACS OMEGA*, **5**, 20062-20069. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01625>
- [20] Mohammadi, M., Heshmati, M.K. and Hamishehkar, H. (2019) Activated Alginate-Montmorillonite Beads as an Efficient Carrier for Pectinase Immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **137**, 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.236>
- [21] Mohammadi, M., Mokarram, R.R., Shahvalizadeh, R., *et al.* (2020) Immobilization and Stabilization of Pectinase on an Activated Montmorillonite Support and Its Application in Pineapple Juice Clarification. *Food Bioscience*, **36**, Article ID: 100625. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100625>

- [22] Aksu, A., Çetinkaya, S., Yenidünya, A.F., *et al.* (2023) Immobilization of Pectinase on Chitosan-Alginate-Clay Composite Beads: Experimental, DFT and Molecular Docking Studies. *Journal of Molecular Liquids*, **390**, Article ID: 122947. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122947>
- [23] de Carvalho, S.J., de França, P.R.L., Converti, A., *et al.* (2019) Pectin Hydrolysis in Cashew Apple Juice by *Aspergillus Aculeatus* URM4953 Polygalacturonase Covalently-Immobilized on Calcium Alginate Beads: A Kinetic and Thermodynamic Study. *International Journal of Biological Macromolecules*, **126**, 820-827. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.236>
- [24] Zhang, S.S., Bilal, M., Zdart, J., *et al.* (2021) Biopolymers and Nanostructured Materials to Develop Pectinases-Based Immobilized Nano-Biocatalytic Systems for Biotechnological Applications. *Food Research International*, **140**, Article ID: 109979. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109979>
- [25] Hassan, S.S., Duffy, B. and Williams, G.A. (2022) Biofabrication of Magnetic Nanoparticles and Their Use as Carriers for Pectinase and Xylanase. *OpenNano*, **6**, Article ID: 100034. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2021.100034>
- [26] Kharazmi, S. and Taheri-Kafrani, A. (2023) Bi-Enzymatic Nanobiocatalyst Based on Immobilization of Xylanase and Pectinase onto Functionalized Magnetic Nanoparticles for Efficient Fruit Juice Clarification. *LWT*, **183**, Article ID: 114914. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114914>
- [27] Soozanipour, A. and Taheri-Kafrani, A. (2019) Preparation of a Stable and Robust Nanobiocatalyst by Efficiently Immobilizing of Pectinase onto Cyanuric Chloride-Functionalized Chitosan Grafted Magnetic Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **536**, 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.053>
- [28] Lucas, D.M., Kelly, S.M., Betina, E.B., *et al.* (2019) Immobilization of Pectinase on Chitosan-Magnetic Particles: Influence of Particle Preparation Protocol on Enzyme Properties for Fruit Juice Clarification. *Biotechnology Reports*, **24**, e00373. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00373>
- [29] Soozanipour, A., Taheri-Kafrani, A., *et al.* (2019) Preparation of a Stable and Robust Nanobiocatalyst by Efficiently Immobilizing of Pectinase onto Cyanuric Chloride-Functionalized Chitosan Grafted Magnetic Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **536**, 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.053>
- [30] Marjan, N. and Faramarz, K. (2020) Green Synthesis of Chitosan Magnetic Nanoparticles and Their Application with Poly-Aldehyde Kefiran Cross-Linker to Immobilize Pectinase Enzyme. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **29**, Article ID: 101681. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101681>
- [31] Muller, S., Concha, D., Vasquez, P., *et al.* (2022) Effect of the Immobilization of Pectinase on the Molecular Weight Distribution of Pectin Oligosaccharides Obtained from Citrus Pectin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **43**, Article ID: 102389. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102389>
- [32] Kharazmi, S., Taheri-Kafrani, A. and Soozanipour, A. (2020) Efficient Immobilization of Pectinase on Trichlorotriazine-Functionalized Polyethylene Glycol-Grafted Magnetic Nanoparticles: A Stable and Robust Nanobiocatalyst for Fruit Juice Clarification. *Food Chemistry*, **325**, Article ID: 126890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126890>
- [33] Lei, L., Liu, J., Ma, X., *et al.* (2019) A Novel Strategy to Synthesize Dual-Responsive Polymeric Nanocarriers for Investigating the Activity and Stability of Immobilized Pectinase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **66**, 376-388. <https://doi.org/10.1002/bab.1734>
- [34] Kamal, S., Rehman, S., Bibi, I., *et al.* (2022) Graphene Oxide/Chitosan Composites as Novel Support to Provide High Yield and Stable Formulations of Pectinase for Industrial Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **220**, 683-691. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.101>