



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

CAMILA REGINA HACKENHAAR

Desenvolvimento de uma matriz de alginato e gelatina entrecruzada com genipina para  
imobilização de  $\beta$ -galactosidase

Porto Alegre, RS.

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

CAMILA REGINA HACKENHAAR

Desenvolvimento de uma matriz de alginato e gelatina entrecruzada com genipina para  
imobilização de  $\beta$ -galactosidase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul para obtenção do título de  
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manuela Poletto Klein

Porto Alegre, RS.

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Hackenhaar, Camila Regina

Desenvolvimento de uma matriz de alginato e gelatina entrecruzada com genipina para imobilização de  $\beta$ -galactosidase / Camila Regina Hackenhaar. -- 2021.

161 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Coorientadora: Manuela Poletto Klein.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Alginato de sódio. 2. Gelatina. 3. Genipina. 4. Imobilização de enzimas. I. Hertz, Plinho Francisco, orient. II. Klein, Manuela Poletto, coorient. III. Título.

## DISSERTAÇÃO

Submetida como um dos requisitos para obtenção do grau

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Homologada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pela Banca Examinadora:

Por:

---

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz  
Orientador – UFRGS (Porto Alegre, RS)

---

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos (ICTA/UFRGS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Manuela Poletto Klein  
Coorientadora – UFCSPA (Porto Alegre,  
RS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Hickmann Flôres  
Diretora do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giandra Volpato  
Banca – IFRS (Porto Alegre, RS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Hickmann Flôres  
Banca – UFRGS (Porto Alegre, RS)

---

Dr.<sup>a</sup>.: Carla Roberta Matte  
Banca – UFRGS (Porto Alegre, RS)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Plinho Francisco Hertz e a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Manuela Poletto Klein, por todos os ensinamentos transmitidos, pelas oportunidades, pela paciência em todas minhas dificuldades, pelos conselhos oferecidos desde meu período como bolsista de iniciação científica até o mestrado e, principalmente, por todo carinho e amizade que foram fundamentais ao longo de toda minha trajetória acadêmica e pessoal. Deixo meus sinceros agradecimentos por tudo!!

Agradeço ao Prof. Patricio Román Santagapita da Universidade de Buenos Aires, por toda ajuda e incansável disposição nas análises e discussões do artigo, que foram de grande valia para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela disponibilização da infraestrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos seus professores e funcionários, pela presteza em todos os momentos.

À UFRGS pela estrutura utilizada no desenvolvimento deste trabalho e à Capes pela bolsa outorgada.

Às minhas amigas Júlia, Natália e Livia, pelos bons momentos que passamos juntas, e que mesmo distantes, sempre estiveram presentes me dando força e incentivo para continuar.

Às bolsistas Carolina e Camila, que me acompanharam ao longo do mestrado. Agradeço muito pela disposição, responsabilidade e por todas contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço também aos meus colegas do laboratório, Elí, Patrik, Gustavo, Fernanda e Larissa, pela enorme parceira criada, pela harmonia no laboratório, pela ajuda nos experimentos, pela disponibilidade, pelas conversas interessantes e aleatórias, pelos momentos de descontração, e principalmente pelo incentivo, abraços e palavras de conforto em momentos que tudo dava errado.

Aos colegas do Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise, pela amizade e ajuda no dia-a-dia.

Às minhas grandes amigas, Mariel e Palmira, que sem dúvida foram essenciais para o êxito deste trabalho. Muito obrigada por estarem sempre presentes, principalmente oferecendo palavras de conforto em momentos difíceis, pelo apoio incondicional, pelas dicas

e ajuda, por todas as risadas e pelas incontáveis horas de conversas e desabafos. Muito obrigada pela amizade e parceria!

Aos meus pais, Reneu e Ieda, por sempre estarem presentes dando amor, apoio e incentivo para eu seguisse meus sonhos. Ao meu irmão Fernando e minha cunhada Karoline pelas conversas e momentos de distração. Muito obrigada de coração a todos vocês por sempre acreditarem em mim e por todos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse realizar meus sonhos!!

Aos meus sogros, Tadeu e Rejane, por todo incentivo e acolhida sempre que precisei. À minha cunhada Fabiana, por toda troca de experiência e incentivo na vida acadêmica.

E por fim, meu eterno agradecimento ao meu noivo Rafael, com quem tenho o prazer de compartilhar a vida, sonhos e desafios. Muito obrigada pelo companheirismo, paciência, amor e carinho e por sempre estar presente. Ao teu lado a vida é mais leve e feliz. Sem dúvida compartilhar a vida contigo foi o que me fez chegar até aqui, e me faz querer ir muito mais além. Muito obrigada por absolutamente tudo. Te amo!!

## RESUMO

O uso de enzimas imobilizadas tem crescido em função de suas inúmeras vantagens quando comparada ao uso de enzimas livres. No entanto, é fundamental avaliar a escolha do suporte, aliando disponibilidade, biocompatibilidade, atoxicidade e boas qualidades mecânicas, a fim de melhorar as características da enzima a ser imobilizada. Assim, o objetivo deste trabalho foi preparar um suporte composto de alginato de sódio e gelatina aproveitando as diferentes características dos materiais para imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Para isso, foram avaliadas diferentes concentrações de alginato de sódio, gelatina, genipina e carga enzimática com o intuito de verificar o efeito de cada componente nos parâmetros de imobilização. A elaboração das esferas de alginato-gelatina foi realizada através da gelificação ionotrópica, seguido de ativação utilizando genipina, um composto natural extraído do jenipapo (*Genipa americana L*), e imobilização covalente da enzima no suporte. Caracterizações calorimétricas (TGA e DSC) e estruturais (SAXS) foram realizadas com o biocatalisador. Além disso, verificou-se o desempenho da enzima imobilizada em relação à sua estabilidade térmica, operacional e de armazenamento. Os resultados mostraram que a enzima foi imobilizada com sucesso apresentando altos rendimentos de imobilização. As modificações micro-estruturais das esferas determinadas por SAXS, demonstram que a adição de genipina e enzima no sistema produziu uma redução significativa no tamanho e na densidade Ca(II)-alginato. Através das análises TGA e DSC, pode-se constatar que a ativação com genipina, seguida da imobilização da enzima, não tiveram influência na resistência à temperatura do suporte. A maior estabilidade térmica do biocatalisador foi observada em presença do substrato lactose. O processo de imobilização proporcionou alta estabilidade ao armazenamento, permitindo manter aproximadamente 80 % da atividade relativa após 175 dias sob refrigeração a 4 °C. Para o processo de hidrólise da lactose, o biocatalisador mostrou-se estável por 11 bateladas de reuso, resultando em 69.3 % de conversão de lactose, a 40 °C. Para esta mesma temperatura, em um reator de leito fixo com fluxo de 0,25 mL min<sup>-1</sup>, a conversão de lactose foi de 76.5 % em 20 h de operação contínua. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que o suporte utilizando alginato de sódio e gelatina tem potencial para aplicações em processos de imobilização enzimática, pois, alia as boas propriedades de cada componente, além de ser uma matriz segura para aplicações em alimentos.

**Palavras-chave:** alginato de sódio, gelatina, genipina,  $\beta$ -galactosidase, imobilização covalente, hidrólise da lactose.



## ABSTRACT

The use of immobilized enzymes has grown due to its numerous advantages when compared to the use of free enzymes. However, it is essential to evaluate the choice of support, combining availability, biocompatibility, atoxicity, and good mechanical qualities, in order to improve the characteristics of the enzyme to be immobilized. Thus, this work's objective was to prepare a support composed of sodium alginate and gelatin taking advantage of the different characteristics of the materials for immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. For this, different concentrations of sodium alginate, gelatin, genipin, and enzyme load were evaluated in order to verify the effect of each component on the immobilization parameters. The elaboration of the alginate-gelatin beads was performed through ionotropic gelation, followed by activation using genipin, a natural compound extracted from genipap (*Genipa americana L*), and covalent immobilization of the enzyme in the support. Calorimetric (TGA and DSC) and structural (SAXS) characterizations were performed with the biocatalyst. In addition, the performance of the immobilized enzyme in relation to its thermal, operational and storage stability was verified. The results showed that the enzyme was successfully immobilized, obtaining high immobilization yields. The structural modifications of the beads determined by SAXS demonstrates that the addition of genipin and enzyme in the system produced a significant reduction in size and density of Ca(II)-alginate. Through the TGA and DSC analyzes, it can be seen that activation with genipin, followed by immobilization of the enzyme, did not influence the temperature resistance of the support. The greater thermal stability of the biocatalyst was observed in the presence of its substrate, lactose. The immobilization process provided high stability to the storage, allowing to maintaining 80 % of the relative activity after 175 days under refrigeration at 4 °C. The biocatalyst proved to be stable for 11 batches of reuse for the lactose hydrolysis process, resulting in 69.3 % lactose conversion at 40 °C. For this same temperature, in a fixed bed reactor with a flow of 0.25 mL min<sup>-1</sup>, the lactose conversion was 76.5 % in 20 h of continuous operation. Thus, the results obtained in this work indicate that the support using sodium alginate and gelatin has potential for applications in enzymatic immobilization processes, as it combines the good properties of each component, in addition to being a safe matrix for food applications.

**Keywords:** covalent immobilization, sodium alginate, gelatin, genipin,  $\beta$ -galactosidase, lactose hydrolysis.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>OBJETIVO</b> .....	15
<b>CAPÍTULO 1 : REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
1.1. ENZIMAS.....	16
1.1.1. $\beta$ -galactosidases .....	17
1.1.2. Hidrólise da lactose .....	20
1.1.3. Aplicações tecnológicas das $\beta$ -galactosidases.....	22
1.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	23
1.2.1. Métodos para imobilização de enzimas .....	26
1.2.1.1. Adsorção física.....	26
1.2.1.2. Encapsulamento e aprisionamento .....	27
1.2.1.3. Ligação covalente.....	28
1.2.1.4. Entrecruzamento.....	29
1.2.2. Agentes de ativação e entrecruzamento.....	30
1.3. TIPOS DE SUPORTES .....	30
1.3.1. Alginato .....	33
1.3.1.1. Formação do gel .....	34
1.3.2. Gelatina.....	36
1.4. GENIPINA.....	40
1.4.1. Reatividade da genipina como agente de entrecruzamento.....	42
1.5. IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE .....	43
<b>CAPÍTULO 2 : DEVELOPMENT OF A BIOCOMPOSITE BASED ON ALGINATE/GELATIN CROSSLINKED WITH GENIPIN FOR <math>\beta</math>- GALACTOSIDASE IMMOBILIZATION: PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS</b> .....	47
<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	96
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	97
<b>APÊNDICE A - BATCH SYNTHESIS OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES FROM CO-PRODUCTS OF MILK PROCESSING USING IMMOBILIZED B- GALACTOSIDASE FROM BACILLUS CIRCULANS</b> .....	117

## INTRODUÇÃO

Constantemente indústrias de alimentos buscam novas tecnologias e matérias-primas inovadoras para desenvolver produtos com alegações de saúde e segurança, devido à alta demanda do mercado consumidor. Consumidores que, por sua vez, estão cada vez mais preocupados com os componentes alimentares e suas funções fisiológicas na saúde, além do seu impacto no equilíbrio ecológico (NERI-NUMA et al., 2020).

Diante desse cenário, pesquisas e aplicações no âmbito da tecnologia de bioprocessos têm ganhado destaque frente a operações convencionais que utilizam catalisadores químicos, geralmente atreladas à geração de substâncias indesejáveis sensorialmente e nutricionalmente, além do possível impacto ambiental pela geração de material residual devido a etapa de purificação do produto. Alternativamente, a aplicação de enzimas apresenta diversas vantagens, como alta seletividade e especificidade, caráter sustentável, e eficiência no processo. No entanto, muitos processos ainda não são viáveis devido a questões como custo de algumas enzimas, contaminação do produto final, recuperação impraticável, além da sensibilidade das enzimas às condições reacionais (MATEO et al., 2007a), problemas estes que podem ser minimizados ou superados com a imobilização enzimática.

Uma das enzimas amplamente utilizadas na indústria é a  $\beta$ -galactosidase (lactase), responsável pela hidrólise da lactose em seus monossacarídeos, glicose e galactose, e que possui aplicação em alimentos com o intuito de melhorar características de solubilidade, dulçor, digestibilidade, além do desenvolvimento de produtos com baixo teor de lactose e síntese de galactooligossacarídeos (FREITAS et al., 2011).

A imobilização enzimática tem sido utilizada principalmente com o objetivo de reutilizar as enzimas e assim reduzir os custos inerentes ao processo. De forma geral, o uso de enzimas imobilizadas oferece vantagens como a possibilidade de uso em operação contínua, facilidade de separação do produto final, aumento da estabilidade ao pH e temperatura, entre outros (MENDES et al., 2011).

São conhecidas e descritas inúmeras técnicas de imobilização na literatura como encapsulação, adsorção em materiais insolúveis ou por ligação covalente. Apesar disto, não há um método aplicável para todas as enzimas, sendo importante avaliar suas vantagens e desvantagens, bem como as características do suporte, a fim de escolher o procedimento mais simples, barato e que resulte em um biocatalisador com alta estabilidade operacional e boa retenção de atividade catalítica (MENDES et al., 2011).

Dentre os vários tipos de suporte sugeridos para a imobilização de enzimas, os biopolímeros naturais como alginato e gelatina, já amplamente empregados na área biomédica e farmacêutica (DUCONSEILLE et al., 2015; FAROKHI et al., 2020; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020; SUN; TAN, 2013), surgem como potenciais promissores para a indústria de alimentos devido à vantagens no que diz respeito a biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, simplicidade de produção do suporte, baixo potencial alergênico e custos (ZAZZALI et al., 2019).

Por outro lado, apesar do emprego extensivo de alginato para imobilização de enzimas, seu uso como suporte é restrito, devido à baixa resistência mecânica desse polissacarídeo e alta porosidade. Para resolver o problema mencionado, materiais poliméricos frequentemente são misturados com outros polímeros, como gelatina, formando *blends* mais complexos com melhoria de suas propriedades (BILAL; IQBAL, 2019), visto que o uso apenas de gelatina também é limitado devido à baixa estabilidade e resistência mecânica (SARKER et al., 2014). Essas propriedades podem ser ainda mais aprimoradas em conjunto com moléculas bifuncionais por meio da formação de ligações covalentes.

Quando se aborda o uso de agentes de entrecruzamento para ativação do suporte, o glutaraldeído é o reagente químico de maior aplicação, porém por apresentar efeitos citotóxicos, atualmente, vem sendo substituído por outros agentes ativadores, como a genipina – biomolécula extraída principalmente do jenipapo (*Genipa americana L.*) e da flor da gardênia (*Gardenia jasminoides Ellis*), por apresentar citotoxicidade muito baixa e ser biocompatível.

Dentro deste contexto, a matriz alginato-gelatina pode ter suas propriedades melhoradas com o uso da genipina, tornando-a uma alternativa interessante como suporte para imobilização de enzimas e também em aplicações inovadoras na área médica, farmacêutica, entre outras. Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver um suporte para imobilização de  $\beta$ -galactosidase, buscando, por meio da utilização de genipina como agente de entrecruzamento, dispor de biocatalisadores seguros e eficientes para uso industrial.

Este trabalho será apresentado na forma de artigo científicos onde encontra-se organizado da seguinte forma: no Capítulo 1 está apresentada a revisão bibliográfica abordando os principais pontos do tema proposto. O Capítulo 2 apresenta os resultados obtidos, na forma como foram submetidos à publicação em periódico internacional. Em

seguida, são apresentadas as principais conclusões obtidas e as perspectivas para os trabalhos futuros. Por fim, no Apêndice A estão apresentados os resultados obtidos de um estudo paralelo a este, na forma como foram submetidos à publicação em periódico internacional, o qual tinha por objetivo estudar a síntese de galactooligossacarídeos a partir de soro e permeado de soro de leite, utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada em esferas de quitosana.

## OBJETIVO

O presente trabalho teve por **objetivo geral** o desenvolvimento de um novo *blend* à base de alginato e gelatina para ser utilizado como suporte para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase, utilizando genipina como agente de entrecruzamento. Como **objetivos específicos**, são pontuados:

- ✓ Desenvolver um suporte à base de alginato e gelatina tipo A;
- ✓ Imobilizar a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em esferas de alginato-gelatina usando genipina como agente de entrecruzamento;
- ✓ Verificar o efeito de diferentes concentrações de enzima, genipina, alginato e gelatina nos parâmetros de imobilização enzimática;
- ✓ Caracterizar os biocatalisadores obtidos em relação as condições pH e temperatura de atividade;
- ✓ Caracterizar o suporte obtido em relação às suas propriedades estruturais e térmicas;
- ✓ Estudar a estabilidade térmica e operacional da enzima imobilizada;
- ✓ Avaliar a hidrólise de lactose em processo tipo batelada e tipo contínuo em reator de leito fixo.

## CAPÍTULO 1 : REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. ENZIMAS

No âmbito da tecnologia de bioprocessos, as enzimas são descobertas notáveis. As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores naturais, onipresentes em plantas, animais e microrganismos, onde catalisam processos vitais para os organismos vivos (HOMAEI et al., 2013). Elas são capazes de aumentar a velocidade das reações por meio da diminuição da energia livre de ativação e, manter o equilíbrio químico de reações bioquímicas sem serem consumidas (SINGH et al., 2016).

Diante da crescente demanda por processos verdes e sustentáveis, a biocatálise vem se apresentando como uma opção interessante em processos industriais por exigirem condições mais suaves de reação (temperaturas próximas a ambiente, pressão atmosférica e pH fisiológico). Além disso, o uso de enzimas gera menos resíduos devido ao alto grau de especificidade, fato este relacionado à sua complexa conformação tridimensional, o que garante que o rendimento da reação não seja reduzido em função de reações paralelas, evitando formação de subprodutos. Assim, a aplicação das enzimas contribuem para tornar os processos mais eficientes, ambientalmente e economicamente mais atrativos do que a síntese orgânica convencional (SHELDON; VAN PELT, 2013a).

Apesar do avanço científico nas áreas da biotecnologia e engenharia de proteínas, a aplicação industrial das enzimas é, muitas vezes, dificultada pela sua sensibilidade a variações de temperatura e pH, pela baixa estabilidade operacional e a longo prazo, difícil recuperação do meio reacional na forma ativa e posterior reutilização (HOMAEI et al., 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013a).

Com o objetivo de superar as limitações impostas pelo uso de enzimas em processos industriais, em meados de 1960, surgiram as técnicas de imobilização enzimática (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008). Desde então, diversas aplicações, metodologias e materiais de suporte foram desenvolvidos. Atualmente, diversas enzimas são comercializadas para utilização em sua forma imobilizada, como por exemplo glicose isomerase, amilocilase, invertase, fenilalanina amônia liase, termolisina, glicoamilase,  $\beta$ -galactosidase, entre outras (CUI et al., 2014; FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015; LU et al., 2020; SHEN et al., 2011).



### 1.1.1. $\beta$ -galactosidases

As enzimas  $\beta$ -galactosidases [lactase;  $\beta$ -D-galactoside galactohidrolase; EC 3.2.1.23], são classificadas nas famílias das glicosil hidrolases (GH) 1, 2, 35, 42, 59 e 147 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>), com base na similaridade de sequência de aminoácidos. De acordo com o número de sequências depositadas no banco de dados, essas enzimas existem principalmente nas famílias GH2, GH35 e GH 42 (LU et al., 2020).

As  $\beta$ -galactosidases ocorrem amplamente na natureza e têm sido isoladas de animais (em órgãos como cérebro, intestino, placenta, testículos), vegetais (damasco, amêndoas, pêssego, maçã), bem como de microrganismos (como fungos, leveduras e bactérias) (HUSAIN, 2010). Em comparação com as fontes animal e vegetal, a produção de enzimas microbianas apresenta rendimentos mais elevados (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008).

A maioria das enzimas industriais são obtidas de *Aspergillus sp.* e *Kluyveromyces sp.* (KLEWICKI, 2007), e possuem uma produção mundial estimada em cerca de 5,75 milhões de toneladas métricas por ano (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

No entanto, nem todas as fontes de  $\beta$ -galactosidase são aceitáveis ou reconhecidas como seguras (GRAS - *Generally Recognized as Safe*), sendo esse um critério importante para aplicações em alimentos. A  $\beta$ -galactosidase isolada de *Escherichia coli* recombinante, por exemplo, que embora seja a  $\beta$ -galactosidase mais pesquisada e conhecida em níveis estruturais e catalíticos, sua aplicação na indústria de alimentos não é considerada adequada devido a problemas de toxicidade associados a esta bactéria (LADERO et al., 2001).

$\beta$ -galactosidases isoladas de fungos como *A. oryzae* e *A. niger*, leveduras como *K. lactis*, e de bactérias como *Bacillus circulans* e *Bifidobacterium bifidum* são considerados microrganismos GRAS (DE ANDRADE et al., 2020; SAQIB et al., 2017). Segundo a legislação brasileira, através da Resolução RDC n°53/2014, a  $\beta$ -galactosidase utilizada em alimentos deve ser de origem microbiana obtidas das seguintes fontes: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. oryzae* expresso em *A. niger*, *Candida pseudotropicalis*, *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. marxianus* e *Saccharomyces sp.* (ANVISA, 2014).

A enzima  $\beta$ -galactosidase utilizada neste trabalho, é uma enzima extracelular proveniente do fungo *A. oryzae*, pertencente à família GH 35. É uma enzima monomérica com massa molecular de 110 KDa, distribuída numa sequência de 1005 resíduos de aminoácidos (FREITAS et al., 2011; MAKSIMAINEN et al., 2013). Comparadas às enzimas

de levedura, as  $\beta$ -galactosidases fúngicas são mais termoestáveis, porém são mais sensíveis à inibição pelo produto, principalmente pela galactose que é um inibidor competitivo (BOON; JANSSEN; VAN 'T RIET, 2000). Uma aplicação importante dessa enzima é na indústria de laticínios, tendo como exemplo a reação de hidrólise da lactose.

Uma visão geral de algumas  $\beta$ -galactosidases comercialmente disponíveis é mostrado na Tabela 1. Como pode ser visto, a temperatura e pH ótimos diferem de acordo com a fonte de obtenção da enzima, onde  $\beta$ -galactosidases fúngicas funcionam em uma faixa de pH relativamente ampla atuando entre pH 2,5-5,4, e as provenientes de leveduras e bactérias tem pH ótimo entre 6,0-7,0. Estas diferentes condições de pH ótimo determinam a escolha e aplicação de determinada enzima, sendo  $\beta$ -galactosidases fúngicas mais adequadas para hidrólise de soro ácido e permeado de soro de leite, enquanto  $\beta$ -galactosidases de leveduras e bactérias são mais adequadas para hidrólise de leite e soro doce do leite (HUSAIN, 2010; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Tabela 1. Fontes comercialmente disponíveis de  $\beta$ -galactosidase.

Marca	Fabricante	Organismo	pH ótimo	T ótima (°C)
Maxilact	DSM	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	40
Tolerase	DSM	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,0	40
$\beta$ -galactosidase	Megazyme International	<i>Aspergillus niger</i>	4,5	60
$\beta$ -galactosidase	Megazyme International	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	45
Lactozym	Novozymes	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,0	48
Lactoles L3	Amano Enzyme	<i>Bacillus circulans</i>	6,0	65
Lactase F	Amano Enzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	55
$\beta$ -galactosidase	Worthington Biochemicals	<i>Escherichia coli</i>	6,0-8,0	37
$\beta$ -galactosidase	Sigma-Aldrich	<i>Escherichia coli</i>	6,0-8,0	37
$\beta$ -galactosidase	Sigma-Aldrich	<i>Bos taurus</i>	4,3	37
$\beta$ -galactosidase	Sigma-Aldrich	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5-5,5	50
L017P	Biocatalysts	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5-5,5	55
Ha-lactase	Chr. Hansen	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	40
Lactase NL	Enzeco	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	40
Fungal lactase	Enzeco	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,0-5,5	55
GODO-YNL2	Godo Shusei Co., Ltd	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	40
Biolactase F	Kerry Ingredients and Flavours	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	55
Biolactasa NTL	Biocon	<i>Bacillus circulans</i>	6,0	65
Biolactase L	Kerry Ingredients and Flavours	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,0	40
GODO-YNL2	DuPont Danisco	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5	40
Lactase 100	Specialty Enzymes & Biotechnologies Co.	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5-5,5	55

Fonte: Adaptado de Benjamins (2014).

### 1.1.2. Hidrólise da lactose

A lactose (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glicose,  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) é um dissacarídeo também conhecido como açúcar do leite, apresentando-se como um pó branco e cristalino. Possui leve dulçor - 6 vezes menos doce que a sacarose - e é significativamente menos solúvel em relação aos seus monossacarídeos. É o principal carboidrato do leite e está presente em quase todos os mamíferos, sendo formada nas glândulas mamárias. No leite humano a concentração de lactose é aproximadamente 7 % enquanto no leite bovino em média de 4,8 % (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

No leite, a lactose apresenta duas formas isoméricas:  $\alpha$  e  $\beta$  lactose, que apresentam diferentes propriedades de solubilidade, cristalização, temperatura de fusão e rotação óptica (UGIDOS-RODRÍGUEZ; MATA LLANA-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MATA, 2018).

Como a lactose é um açúcar higroscópico e tem alta tendência a absorver sabores e odores, além de desenvolver textura arenosa, por sua baixa solubilidade, seu uso na indústria é limitado (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Para minimizar ou eliminar esses problemas, uma tecnologia bastante difundida dentro da indústria de laticínios é a reação de hidrólise prévia da lactose através da enzima  $\beta$ -galactosidase.

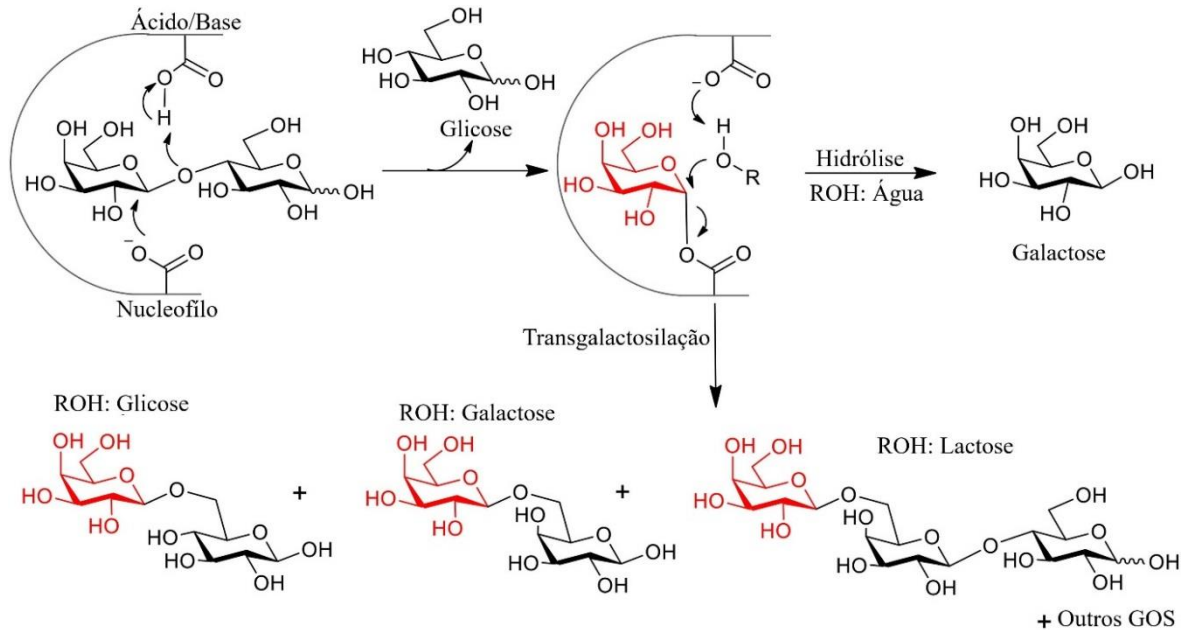
Devido a essa função de hidrólise, a enzima ganhou importância mundial nas últimas décadas dentro da indústria de alimentos, sendo suas principais aplicações: remoção da lactose de produtos lácteos e produção de produtos galactosilados, como os galactooligossacarídeos (HUSAIN, 2010).

A hidrólise da lactose pode ser realizada por tratamento ácido em alta temperatura (150 °C), que pode resultar em diversos problemas tecnológicos, como alterações de odor e cor dos produtos, formação de subprodutos indesejáveis, bem como a desnaturação das proteínas do leite (LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000). Por outro lado, a catálise enzimática, realizada com a enzima  $\beta$ -galactosidase, permite condições mais suaves de temperatura e pH, e consequentemente permite uma maior economia energética com preservação das propriedades das moléculas (DARIF, 2018).

A enzima  $\beta$ -galactosidase é responsável pela hidrólise do resíduo terminal  $\beta$ -galactopiranosil da lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc) para formar glicose e galactose, dois monossacarídeos (MAHONEY, 1998).

Diversos mecanismos já foram propostos para ação desta enzima (PRENOSIL; STUKER; BOURNE, 1987), e um esquema geral está demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Mecanismo de reação da  $\beta$ -galactosidase usando lactose como substrato.



Fonte: Adaptado de Lu e colaboradores (2020).

O mecanismo de ação da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise da ligação glicosídica da lactose requer dois resíduos de ácido glutâmico (Glu<sup>482</sup> e Glu<sup>551</sup>), um como doador de prótons e outro como nucleófilo, de modo simultâneo na reação enzimática (LU et al., 2020). Na etapa inicial, há formação do complexo enzima-galactosil e simultânea liberação de glicose. Na próxima etapa, o complexo é transferido para aceptores nucleofílicos contendo grupos hidroxil, que pode ser um sacarídeo ou água. Se a solução de lactose for diluída, a água, em vez de outros açúcares, pode ser mais competitiva para ser um aceptor, portanto a galactose é formada e liberada do sítio ativo. Por outro lado, em uma solução com alta concentração de lactose, a molécula de lactose tem mais chance de agir como aceptor, ligando-se ao complexo enzima-galactose para formar oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização (GOSLING et al., 2010; ZHOU; CHEN, 2001). Ou seja, o mecanismo de ação da enzima inclui tanto a hidrólise da lactose quanto a reação de transgalactosilação.

Na realidade, os dois mecanismos citados anteriormente, podem ocorrer simultaneamente na reação, pois os galactooligosacarídeos (GOS) sintetizados podem ser hidrolisados. Além disso, como a galactose é mais efetiva por ser competidora da molécula de lactose pelo sítio da  $\beta$ -galactosidase, a transgalactosilação pode ser inibida pela formação dos produtos. Assim, condições específicas de processamento como a concentração de

lactose, a natureza da enzima e as condições de reação irão determinar qual será a rota cinética da enzima (GOSLING et al., 2010; KLEIN et al., 2016; LU et al., 2020).

### 1.1.3. Aplicações tecnológicas das $\beta$ -galactosidases

A redução de lactose em produtos lácteos torna-o mais digerível para indivíduos intolerantes à lactose, os quais representam, aproximadamente, 70 % da população mundial. Essa deficiência de  $\beta$ -galactosidase na mucosa do intestino delgado resulta em má absorção de lactose, o que leva a apresentar sintomas como dor abdominal, diarreia, náusea, flatulência e inchaço após a ingestão. Isso pode ser consequência de diferentes processos: deficiência primária, diminuição enzimática secundária oriunda de doenças intestinais e deficiência congênita (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012), e a severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar (XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

Outro propósito da hidrólise da lactose é a prevenção de sua cristalização em diversos produtos lácteos, pois devido à baixa solubilidade da lactose em altas concentrações, produtos como doce de leite, leite condensado, sorvetes, entre outros, ficam propensos a uma excessiva cristalização desse açúcar, o qual gera um aspecto arenoso aos alimentos. Essa cristalização pode ser evitada utilizando a hidrólise da lactose previamente ao processamento, visto que os açúcares formados, galactose e glicose, são mais solúveis quando comparados à lactose. Adicionalmente, a adição de açúcar no produto pode ser reduzida, pois a glicose e galactose possuem uma doçura relativa muito maior que a da lactose pura (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012; SHUKLA, 1975). A hidrólise da lactose também pode ser aplicada como ferramenta a fim de diminuir o tempo de processos fermentativos, como por exemplo, na fabricação de queijos e iogurtes (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

Outro benefício de grande importância é a formação de galactooligossacarídeos, um grupo de oligossacarídeos resistentes às enzimas digestivas do intestino com efeitos similares ao da fibra alimentar. Sua ingestão estimula seletivamente o crescimento das bifidobactérias intestinais (PARK; OH, 2010), as quais exercem efeitos benéficos na manutenção da saúde humana, como redução de alguns fatores de risco para doenças cardiovasculares, aumento da absorção de cálcio, redução da inflamação intestinal, entre

outros benefícios (MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008; SANDERS et al., 2019).

Além de seus efeitos prebióticos, os galactooligossacarídeos tem baixa cariogenicidade, baixa doçura e valor calórico (MANO; PAULINO; PASTORE, 2019; VERA et al., 2016) sendo sua principal aplicação em bebidas, principalmente em formulações para bebês, devido à semelhança estrutural dos oligossacarídeos do leite humano (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015).

O uso da enzima na reação de hidrólise, como visto anteriormente, promove diversas melhorias tecnológicas durante o processamento e nas características sensoriais dos alimentos. Além dessas melhorias, uma abordagem interessante é a utilização do soro lácteos como substrato para a reação. O soro é o principal subproduto da indústria de laticínios, e devida a alta concentração de lactose presente, quando descartado sem nenhum tratamento prévio, poluem severamente reservas de água prejudicando o ecossistema devido à alta demanda biológica de oxigênio para sua degradação (GONZÁLEZ SISO, 1996). Dessa forma, os produtos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise da lactose do soro, podem, por exemplo, ser utilizados para o desenvolvimento de um xarope doce, empregado em vários processos das indústrias de laticínios, confeitaria, panificação e refrigerantes (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010) e produção de compostos com alto valor agregado, como os galactooligossacarídeos. Além disso, os monossacarídeos formados podem ser convertidos em biomoléculas, após tratamento adequado (MANO; PAULINO; PASTORE, 2019).

## 1.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A aplicação industrial de enzimas na forma livre nos múltiplos processos práticos é, muitas vezes, dificultada pela baixa estabilidade térmica, faixa estreita de pH e a perda de atividade catalítica após um ciclo (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Contudo, esses inconvenientes podem, geralmente, ser superados pela imobilização enzimática (HANEFELD; CAO; MAGNER, 2013).

A primeira observação científica de imobilização enzimática foi feita em 1916, a qual demonstrou que uma invertase exibia a mesma atividade quando adsorvida em um sólido, como carvão ou hidróxido de alumínio, tanto no fundo do recipiente de reação como quando distribuída uniformemente em toda a solução (NELSON & GRIFFIN, 1916, HOMAEI 2013). Desde o trabalho pioneiro em imobilização enzimática no início dos anos 1960

(KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000), milhares de pesquisas e patentes já foram publicadas sobre as mais diversas técnicas de imobilização de enzimas.

Dessa forma, define-se como enzima imobilizada a retenção da proteína em uma matriz, ou em um suporte sólido insolúvel, em meio aquoso e em solventes orgânicos para que seja reutilizada continuamente, criando um sistema heterogêneo (CHIBATA, 1986).

Um dos principais interesses na imobilização enzimática, principalmente em escala industrial, é a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador por diversos ciclos de reação e, assim, reduzir os custos inerentes a sua utilização (SHELDON; VAN PELT, 2013a). A imobilização também permite a utilização em operações contínuas e a separação do biocatalisador do produto, minimizando ou eliminando a transferência da proteína para etapas subsequentes do processo. Um benefício adicional é geralmente um ganho na estabilidade, sob condições de armazenamento e operacionais, a qual, geralmente, é superior em relação à enzima livre (MATEO et al., 2007b; SHELDON; VAN PELT, 2013a). Outra vantagem importante da imobilização enzimática é que as enzimas imobilizadas podem ter suas propriedades catalíticas alteradas de maneira a permitir que preservem suas atividades em condições que não sejam ambientes aquosos (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Durante o processo de imobilização, mudanças estruturais da enzima, alterações de pH e temperatura ótima da enzima podem ocorrer, devido as interações suporte-enzima. Essas alterações podem levar a inativação da enzima devido a mudanças conformacionais, dessorção da enzima do suporte, bloqueio do sítio ativo ou ainda limitações de transferência de massa promovidas pela própria imobilização (KRAJEWSKA, 2004; MATEO et al., 2007a). Entretanto, muitos dos problemas citados anteriormente podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do método e suporte de imobilização adequados.

Idealmente, a técnica de imobilização deve garantir a estabilidade da enzima por longos períodos de tempo, evitar sua lixiviação, torná-la reutilizável e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação (ISPAS; SOKOLOV; ANDREESCU, 2009). Entretanto, devido às diferentes características físico-químicas de cada enzima, assim como às diferentes propriedades dos substratos e diversidade de aplicações dos produtos obtidos, não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas (KRAJEWSKA, 2004). Além do mais, todos os métodos apresentam vantagens e limitações. A Tabela 2 mostra, de maneira resumida, alguns fatores a serem considerados na imobilização como condições, propriedades e características da enzima e do suporte.



Tabela 2: Resumo de alguns fatores a serem analisados para desenvolvimento de protocolos de imobilização.

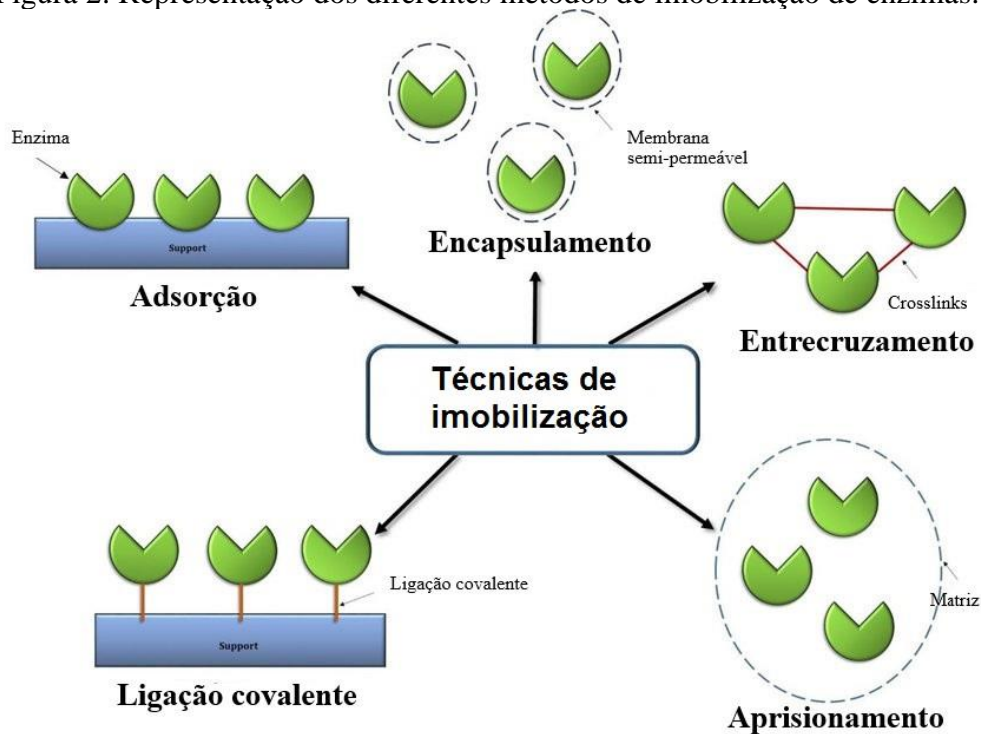
Parâmetros a serem considerados		Exemplos
Suporte	Parâmetros químicos	Composição, grupos funcionais, estabilidade química em solventes, hidrofobicidade, propriedades da superfície do suporte (pH, carga da superfície, presença íons metálicos).
	Parâmetros físicos	Morfologia, tamanho de partícula, porosidade (estrutura, tamanho e distribuição de poros), área superficial ativa, resistência mecânica.
Enzimas	Propriedades bioquímicas	Disponibilidade, estabilidade ao armazenamento, toxicidade, flexibilidade conformacional, peso e tamanho molecular, sítio ativo, grupos funcionais e cargas na superfície.
	Parâmetros cinéticos	Atividade específica, perfis de pH e temperatura, estabilidade relacionada as condições de reação (pH, solventes e temperatura), aditivos estabilizantes e necessidade de cofatores.
Processo de imobilização	Estratégia de imobilização	Adsorção física, encapsulação, ligação covalente, ligação cruzada.
	Condições de imobilização	pH, temperatura, solventes, agentes de estabilização.
	Difusão e transferência de massa	Efeito do tampão, viscosidade do meio de reação, difusão nos poros do suporte.
	Desempenho	Reusabilidade, recuperação do produto, inibição enzimática.
	Custos do processo	Custos da enzima e suporte, eliminação de resíduos, energia.

Fonte: Adaptado de Hartmann e Kostrov (2013).

### 1.2.1. Métodos para imobilização de enzimas

Diferentes métodos para imobilização já foram desenvolvidos e podem ser classificados como físicos, quando existem interações fracas entre o suporte e a enzima, não ocorrendo modificação química, como a adsorção (física ou iônica) em uma matriz insolúvel, o aprisionamento em gel, a microencapsulação e a formação de filmes; e químicos, que incluem a ligação covalente da enzima ao suporte e o entrecruzamento desta pelo uso de um reagente multifuncional de baixa massa molecular (Figura 2). De maneira ideal, o método de imobilização deve permitir a difusão de substratos e produtos da reação, evitar sua lixiviação e, também, garantir a estabilidade da enzima durante longos períodos de tempo (SHELDON; VAN PELT, 2013a).

Figura 2: Representação dos diferentes métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado de Jun e colaboradores (2019).

#### 1.2.1.1. Adsorção física

Este método é baseado na adsorção física de enzimas na superfície de suportes insolúveis em água, sob condições adequadas. A adsorção pode ser realizada através de diferentes tipos de interações fracas, tais como interações hidrofóbicas, ligações iônicas,

forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (PANESAR et al., 2006). Há pouco ou nenhuma alteração conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferida e energeticamente favorável devido à ausência de ligações químicas fixas entre enzima e suporte (HARTMANN; JUNG, 2010). Geralmente não há uso de reagentes bifuncionais, nem requer funcionalização do suporte, e apenas um mínimo de etapas de ativação é necessário para o processo de adsorção, tornando este um dos métodos de imobilização mais fácil, simples e econômico (HUSAIN, 2010). Em geral, a adsorção física entre enzima e suporte é muito fraca, sendo assim mudanças na temperatura, pH ou força iônica podem resultar em dessorção da enzima (NGUYEN; KIM, 2017).

#### 1.2.1.2. Encapsulamento e aprisionamento

Conforme Brady e Jordaan (2009), o melhor meio de evitar qualquer influência negativa na estrutura de uma enzima é encapsulá-la, isto é, protegendo-a do meio reacional, minimizando, assim, a desnaturação. A técnica de encapsulamento, aprisionamento ou confinamento consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída por polímeros como por exemplo carragenana, silanos, gelatina, alginato e poliacrilamida.

O método é realizado em duas etapas, onde primeiro ocorre a mistura da enzima na solução do monômero, seguida pela polimerização dessa solução por uma reação química (NGUYEN; KIM, 2017), de forma que a enzima fique inserida no suporte ou envolvida por ele (SHELDON; VAN PELT, 2013a). Sendo assim, não ocorrem alterações estruturais ou ligações com grupos reativos ou sítio ativo da enzima.

As principais limitações são a alta concentração de enzima necessária para garantir o procedimento de encapsulação e a dificuldade de interação com substratos de alto peso molecular, pois os mesmos não conseguem difundir-se profundamente no gel da matriz para alcançar o sítio ativo da enzima (HUSAIN, 2010). Além disso, se o tamanho dos poros da matriz de suporte for grande, provavelmente ocorrerá a lixiviação da enzima. A fim de evitar essas perdas, pode-se promover ligações adicionais através do uso de agente de entrecruzamento (NGUYEN; KIM, 2017).

### 1.2.1.3. Ligação covalente

Um dos métodos mais amplamente utilizados para imobilização enzimática é através de ligações covalentes entre os grupos reativos do suporte e da enzima. Metodologias de imobilização de forma covalente costumam ser mais complexas, porém resultam em ligações irreversíveis e mais estáveis (GARCIA-GALAN et al., 2011). Entretanto, como a ligação é irreversível, quando a enzima se torna inativa, tanto suporte quanto enzima são inutilizados (SHELDON; VAN PELT, 2013a).

Numa primeira etapa, o suporte sólido é ativado utilizando um reagente funcional, e posteriormente, ocorre o acoplamento covalente da enzima ao suporte. É importante que o grupo funcional presente na enzima seja não essencial para a atividade enzimática, que geralmente envolve a ligação pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, sendo os principais alvos para imobilização os seguintes: lisina (grupos amino), cisteína (grupo tiol) e ácido aspártico e glutâmicos (grupo carboxílico) (NGUYEN; KIM, 2017).

As lisinas estão presentes na maioria das proteínas, frequentemente localizadas na superfície, podendo corresponder de 6% a 10% dos aminoácidos. Considerando que são muito reativas, sem a necessidade de serem ativadas, proporcionam boa estabilidade após imobilização. A imobilização de proteínas usando as cadeias laterais carboxílicas são interessantes, uma vez que os aminoácidos ácido glutâmico e ácido aspártico constituem uma fração principal dos aminoácidos expostos à superfície (STEEN REDEKER et al., 2013). A exploração do grupo tiol de cisteínas pode ser usada para dirigir uma imobilização (por ponte S-S) e pode dar origem a uma ligação covalente mais fraca porém passível de recarga de suporte (SCHÖFFER et al., 2017).

Alguns outros resíduos de aminoácidos da enzima explorados para imobilização covalente são: serina e treonina (grupo hidroxila), tirosina (grupo fenol), metionina (grupo tioéter), histidina (grupo imidazol) e arginina (grupo guanidina) (STEEN REDEKER et al., 2013).

Como regra geral, a imobilização covalente deve ser preferida quando se trabalha em solução aquosa e quando existem fatores desnaturantes. Isto é devido ao fato de que a formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, evitando assim o desdobramento e desnaturação da proteína (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009). Estudos relacionam a uma melhoria na estabilidade da enzima covalentemente ligada, especialmente quando ocorre

ligações multipontuais, pois esta ligação promove a rigidificação da estrutura enzimática, reduzindo as mudanças conformacionais envolvidas na sua inativação (CAO, 2005). No entanto, como a imobilização não ocorre de maneira uniforme para todas as moléculas de enzimas, a orientação indesejável do sítio ativo da enzima pode dificultar o reconhecimento do substrato, diminuindo a atividade catalítica, ou então levar a uma orientação inativa, ou seja, impedimento estérico (ZHOU; HARTMANN, 2012). Estudos tem demonstrado novas estratégias de imobilização a fim de que ela seja totalmente orientada pela sua posição. Um exemplo disso é a orientação molecular da enzima através de resíduos de cisteína(LI et al., 2018; LIU et al., 2013).

#### 1.2.1.4. Entrecruzamento

A imobilização de enzimas por ligações cruzadas é baseada na formação de ligações covalentes entre moléculas de proteínas utilizando reagentes bi ou multifuncionais, que atuam como *linkers*, formando agregados enzimáticos tridimensionais insolúveis, destacando-se por ser um processo simples, rápido e econômico – pela inexistência de um suporte (SHELDON; VAN PELT, 2013a).

O método pode ser muito útil na imobilização de enzimas multiméricas para impedir a dissociação da estrutura da enzima e perda de atividade (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). O objetivo dessa metodologia é a formação de biocatalisadores insolúveis com elevada atividade catalítica. No entanto, devido a modificação química causada na superfície da enzima, frequentemente ocorre diminuição da atividade enzimática através da obstrução dos sítios ativos (GARCIA-GALAN et al., 2011), além de apresentarem baixa resistência mecânica e difícil recuperação (CANTONE et al., 2013).

Existem duas abordagens utilizadas nesta técnica de imobilização: a formação de agregados de enzimas entrecruzadas (CLEAs – do inglês *crosslinked enzyme aggregates*), e a formação de cristais enzimáticos entrecruzados (CLECs- *crosslinked enzyme crystals*). Ambos métodos requerem o uso de agente de entrecruzamento para estabilizar os agregados. No método CLEC, o agente de entrecruzamento é adicionado aos cristais de enzimas após a cristalização, de maneira que este método proporciona melhorias mecânicas significativas, contudo requer a formação de cristais, um procedimento trabalhoso e caro requerendo uma enzima de alta pureza. Por outro lado, o CLEA é uma versão aprimorada da produção CLEC. No método baseado no CLEA, a adição de sais inorgânicos, solventes orgânicos ou

polímeros não-iônicos, seguido por ligação cruzada com um agente de entrecruzamento bifuncional, resulta na formação de agregados enzimáticos que retêm as propriedades catalíticas da enzima (GARCIA-GALAN et al., 2011; NGUYEN; KIM, 2017).

### 1.2.2. Agentes de ativação e entrecruzamento

Nem todos os suportes possuem grupos funcionais disponíveis para ligações covalentes com a enzima, sendo assim, agentes de ligação são necessários pois introduzem grupos reativos na superfície do suporte capazes de reagirem com os grupos reativos da enzima. O emprego desses agentes é simples e pode ser realizado misturando os diretamente em uma matriz ou através da aplicação em matrizes pré-formadas, e pode melhorar a estabilidade da enzima através de ligações bi- ou multipontuais. Estes compostos podem ser utilizados para entrecruzamento de enzimas, como também em combinação com outros métodos (NGUYEN; KIM, 2017).

Diversos agentes de ativação podem ser utilizados para o entrecruzamento, diferindo em mecanismos, especificidades e efeitos. Os aldeídos, particularmente formaldeído e glutaraldeído, são provavelmente os reticulantes mais amplamente utilizados, devido seu baixo custo e reação rápida com grupos  $\epsilon$ -amino livres não protonados nas proteínas (AZEREDO; WALDRON, 2016). No entanto, tem havido preocupações quanto à sua toxicidade, o que pode ser um problema no caso de sua migração para produtos alimentícios (CHIOU et al., 2006). Além dos aldeídos, reagentes contendo grupos epóxidos também são comumente utilizados, porém são fracamente reativos sob condições suaves, necessitando de condições extremas de reação para favorecer a ligação enzima-suporte (MATEO et al., 2000).

Assim, outros agentes de entrecruzamento não tóxicos ou menos tóxicos têm sido estudados, onde recentemente a genipina atraiu interesse devido à sua menor toxicidade quando comparado aos reagentes comumente utilizados (MUZZARELLI et al., 2015). Uma abordagem sobre a genipina será discutida mais adiante.

### 1.3. TIPOS DE SUPORTES

Embora seja reconhecido que não há suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, deve-se enfatizar que a seleção dos materiais de suporte é o desafio mais crucial

devido ao enorme impacto que ele pode ter nas propriedades do sistema biocatalítico. Dessa maneira, para se obter um derivado enzimático ativo e estável deve-se atentar às características particulares da enzima e das condições do processo catalítico, bem como do material de suporte escolhido, pois a interação entre ambos concede propriedades que podem ser determinantes à sua aplicação prática (KRAJEWSKA, 2004; ZDARTA et al., 2018).

Vários materiais, naturais ou sintéticos, podem ser usados como suporte para imobilizar enzimas e, durante a escolha para o processo de imobilização, algumas características devem ser consideradas para este fim, sendo as principais a seguir (KRAJEWSKA, 2004; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; ZDARTA et al., 2018):

- ✓ Alta afinidade com proteínas;
- ✓ Funcionalidade química;
- ✓ Disponibilidade e custo;
- ✓ Capacidade de regeneração e reutilização;
- ✓ Resistência química e mecânica;
- ✓ Permeabilidade;
- ✓ Diâmetro de poro adequado;
- ✓ Resistência ao ataque microbiano;
- ✓ Elevada área superficial;
- ✓ Não toxicidade e biocompatibilidade.

No entanto, muitos dos suportes possuem poucas das propriedades citadas, portanto, deve-se tomar cuidado ao selecionar o material, levando em consideração as vantagens e desvantagens de suas propriedades.

Esses materiais podem ser classificados em relação a sua composição química em orgânicos e inorgânicos. Ou quanto a sua morfologia em porosos e não porosos (SOUZA et al., 2017).

Como principal vantagem, os materiais porosos apresentam uma elevada área superficial interna específica disponível para imobilização, possibilitando uma maior carga enzimática e uma maior proteção da enzima frente a eventuais condições adversas do meio reacional. Como inconveniente do uso desse tipo de suporte têm-se problemas de transferência de massa. Como a maior área disponível é a interna, o diâmetro dos poros do

suporte deve ser adequado ao tamanho da enzima, substrato e produto para evitar limitações difusionais (MOHAMAD et al., 2015; ZDARTA et al., 2018).

Por outro lado, os suportes não-porosos não apresentam problemas difusionais por acomodarem as moléculas apenas na superfície externa, facilitando a interação da enzima com o substrato. No entanto, esse material apresenta uma baixa área superficial específica, o que limita a área de imobilização. Esse problema pode ser minimizado ao utilizar nanopartículas, pois proporciona alta área superficial para imobilização. Porém, outras dificuldades podem surgir com as nanopartículas como, por exemplo, a impossibilidade de usar em sistemas contínuos do tipo coluna, pois o material pode compactar em altas pressões e altas velocidades de fluxo (LIESE; HILTERHAUS, 2013; SOUZA et al., 2017).

Os suportes inorgânicos, tais como, vidro, sílica, alumina, nanotubos de carbono, óxidos metálicos, magnetita, bentonita, zircônia, entre outros, em geral, apresentam maior resistência a condições extremas de funcionamento. Isto é, possuem maior resistência mecânica, boa estabilidade térmica e ao pH, resistência ao ataque de microrganismos e a solventes orgânicos e fácil regeneração por processo de pirólise, torna-os mais apropriados para utilização industrial, quando comparados aos suportes orgânicos (JUN et al., 2019; ZDARTA et al., 2018). Dentre os diversos suportes inorgânicos, a sílica é uns dos materiais mais frequentemente utilizados para imobilização de enzimas. Uma das principais características da sílica é a possibilidade de fabricação com diferentes parâmetros morfológicos e estruturas porosas. Além disso, a sílica apresenta em sua superfície regiões de ligações silanos (Si-OH) livres que podem ser funcionalizados com agentes de modificação de superfície como o glutaraldeído ou 3-aminopropiltrióxissilano (APTES) (HARTMANN; KOSTROV, 2013; ZDARTA et al., 2018).

Suportes orgânicos, em especial os polímeros, podem ser classificados em naturais ou sintéticos. Os polímeros sintéticos possuem superfície porosa, são insolúveis por natureza e inertes ao ataque microbiano. Incluem nesta classificação o poliestireno, cloreto de polivinil (PVC), poliacrilato, poliamida, polipropileno, dietilaminoetil celulose (DEAE celulose), resinas de troca iônica, etc. (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Esses materiais exibem diferentes formas físicas e estruturas químicas, que podem ser combinados para formar um novo suporte, de acordo com as propriedades da enzima (SOUZA et al., 2017).

Uma grande variedade de polímeros naturais, principalmente polissacarídeos como quitosana, ágar, colágeno, carragenanos, alginato, gelatina, celulose, albumina, amido, agarose, etc., têm sido utilizados como matriz de suporte para imobilização enzimática. As



propriedades desses polímeros que os tornam um bom sistema de suporte incluem, sua capacidade de formar géis aquosos inertes, estrutura química facilmente ativada, além de normalmente apresentarem boa resistência térmica e mecânica após reticulação com reagentes bifuncionais. Além disso, estão disponíveis em grandes quantidades, são seguros biologicamente e normalmente possuem custo reduzido (HOMAEI et al., 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Nesta revisão serão abordados apenas o alginato de sódio e gelatina como material de suporte.

### 1.3.1. Alginato

Os alginatos são polissacarídeos aniônicos e hidrofílicos de ocorrência natural, comumente produzidos a partir de vários gêneros de algas marrons (principalmente *Laminaria hyperborean*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*), e algumas bactérias como *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa* (PARREIDT; MÜLLER; SCHMID, 2018), sendo um dos mais abundantes materiais biossintetizados (SUN; TAN, 2013).

Atualmente, os alginatos comerciais são extraídos exclusivamente de algas, embora uma alternativa interessante é a biossíntese bacteriana, pois podem ser produzidos em condições controladas, padronizadas e fornecer ao alginato estruturas químicas e propriedades físicas mais definidas do que o alginato derivado de algas marinhas (LEE; MOONEY, 2012).

Sua estrutura é composta por duas unidades monoméricas: ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ligada ao ácido D-manurônico (estrutura M) e por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) ligada ao ácido -L-gulurônico (estrutura G), de composição e estrutura sequencial amplamente variável. A composição básica de alginatos consiste em unidades lineares não ramificadas de polímeros constituídos de três formas diferentes de segmentos: resíduos G consecutivos, resíduos M consecutivos e resíduos MG alternados (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017). O alginato derivado de diferentes espécies contém proporção e sequência diferentes de resíduos M e G, o que determina a sua massa molecular e propriedades físicas e químicas do alginato, como a viscosidade, transição sol/gel, solubilidade e estabilidade do gel que será formado (SZEKALSKA et al., 2016).

Alginatos e polissacarídeos de algas em geral, são aceitos para uso como aditivos alimentares e são reconhecidos como GRAS pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela Comunidade Europeia e listado no *Codex Alimentarius* (FAO/OMS).

Devido a sua capacidade de atuar como agentes estabilizante, gelificante e espessante, é utilizado como aditivo na indústria de alimentos para modificar e melhorar a textura de certos alimentos, como por exemplo, molhos e emulsões, alimentos reestruturados, geleias e sobremesas. Algumas dessas propriedades provêm das características inerentes ao próprio alginato, mas também podem resultar de interações com outros componentes dos alimentos, por exemplo, proteínas, gordura ou fibra (STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006).

Além das propriedades citada, a biocompatibilidade, biodegradabilidade, não antigenicidade, capacidade quelante, não toxicidade e baixo custo fazem do alginato um biopolímero atrativo (SUN; TAN, 2013).

A nível biomédico várias aplicações do alginato podem ser referidas, particularmente nas áreas de cicatrização de feridas, administração/liberação controlada de medicamentos, cultura celular *in vitro* e engenharia de tecidos (LEE; MOONEY, 2012), por outro lado, não mostra propriedades antibacterianas (POURALI; YAHYAEI, 2019). Outra aplicação com grande potencial tem sido na área biotecnológica, especificamente em imobilização celular (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017).

#### 1.3.1.1. Formação do gel

Em comparação com outros polissacarídeos, como gelatina ou ágar, o alginato é capaz de formar gel independente da temperatura. A formação de géis de alginato pode ser obtida por dois métodos: a precipitação ácida em  $\text{pH} < 3,5$  (géis ácidos) ou a reticulação iônica com cátions polivalentes (géis iônicos).

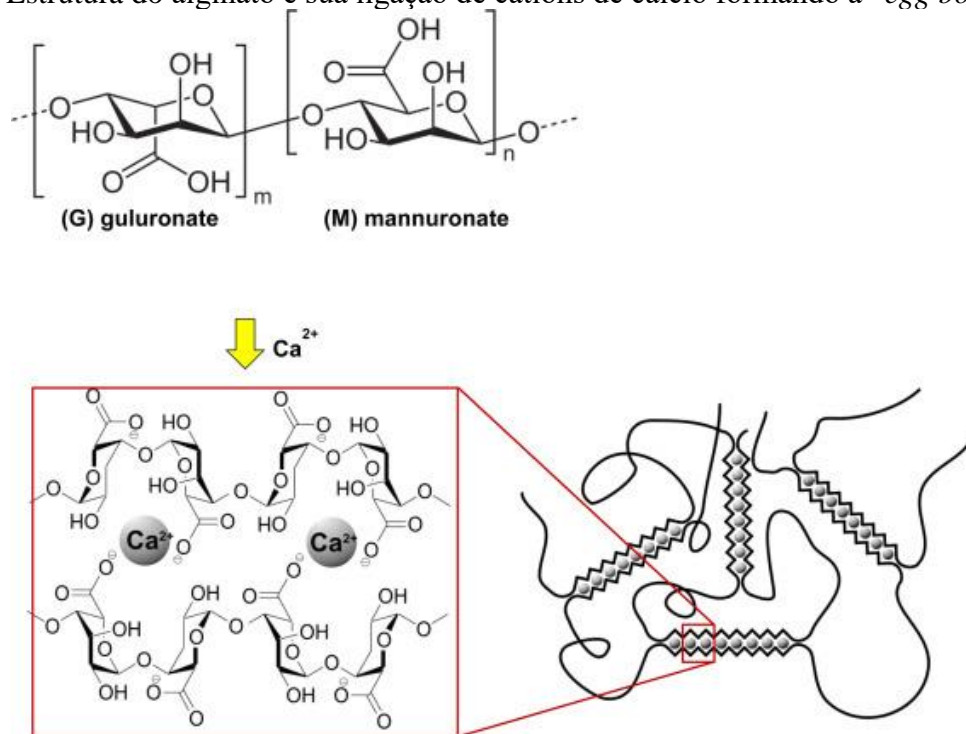
Na precipitação ácida, o alginato pode formar géis a valores de pH menores aos valores de pKa dos resíduos de ácidos urónico (3,38 e 3,65 para M e G, respectivamente) (ZAZZALI et al., 2019). Porém, uma diminuição abrupta do pH causa uma precipitação de moléculas de ácido algínico, e não irá ocorrer formação de gel (STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006).

O mecanismo de gelificação iônica é um processo altamente seletivo e a afinidade do alginato em relação aos diferentes íons bivalentes diminuem na seguinte ordem:  $\text{Pb} > \text{Cu} >$

Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn. No entanto, para fins práticos o uso de cátions tóxicos não é aconselhável, sendo a reticulação com cálcio a mais amplamente difundida para formação de géis. No entanto, as esferas de alginato de cálcio formadas são sensíveis à quebração por agentes como fosfato, citrato, lactato e agentes não-gelificantes como íons sódio e magnésio (MØRCH et al., 2006). E também, podem ser facilmente desestabilizados na presença de cátions monovalentes (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008).

A adição de íons  $\text{Ca}^{+2}$  no polímero proporciona a ligação entre os grupos carboxílicos das cadeias G em lados opostos, formando uma cavidade hidrofóbica. Os pontos de reticulação formados pela ligação cruzada entre os monômeros G e íons  $\text{Ca}^{+2}$  formam uma estrutura tridimensional denominada “egg box” (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017), como mostra Figura 3. Esta propriedade, fez do alginato um dos biopolímeros mais comumente utilizados como material de encapsulamento de diversos compostos de interesse e liberação controlada de fármacos (COOK et al., 2011).

Figura 3: Estrutura do alginato e sua ligação de cátions de cálcio formando a “egg box”.



Fonte: Bruchet e Melman (2015).

Existem dois métodos de gelificação do alginato reticulados pelos íons cálcio: gelificação interna ou gelificação externa, também conhecida por difusão. A difusão é realizada quando os íons cálcio (nesse caso a fonte mais comum é o cloreto de cálcio), são

difundidos de uma reserva externa para dentro de uma solução de alginato. Quando o cálcio entra em contato com a solução de alginato, forma-se o gel na interface, de modo que a gelificação prossegue enquanto os íons cálcio conseguem difundir através da interface, ou seja, o processo consiste basicamente no gotejamento de uma solução de polissacarídeo aniônico sobre uma solução salina catiônica, promovendo a formação de ligações cruzadas nas partículas. No entanto, esse método não permite uma concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  uniforme em toda a estrutura do gel, devido ao processo de difusão, que se inicia na superfície do gel e causa resistência aos íons de  $\text{Ca}^{+2}$ , resultando numa superfície mais concentrada. A gelificação interna, envolve liberação dos íons cálcio através de uma fonte interna de um sal de cálcio diretamente na solução polimérica contendo material de núcleo. Posteriormente, essa mistura é dispersa em uma fase oleosa contendo surfactante, o qual favorece a formação e estabilidade da emulsão. A gelificação da solução biopolimérica ocorre através da redução do pH mediante a adição de uma solução ácida na emulsão de água em óleo. À medida que o ácido entra na fase aquosa, ele reage com o sal de cálcio, liberando os íons, permitindo sua complexação com os grupos carboxílicos do alginato (AGUILAR et al., 2015; FAROKHI et al., 2020; SCHOUBBEN et al., 2010).

A formação do gel de alginato é bastante complexa e diversos fatores podem afetar sua estrutura e características. Como visto, os blocos G tem mais afinidade pelos íons  $\text{Ca}^{+2}$  que blocos M, sendo assim, maiores conteúdos de blocos G no alginato formam géis mais rígidos, quebradiços e mecanicamente mais estáveis. Por outro lado, uma alta proporção de blocos M formam géis mais macios e elásticos, com menor propensão a apresentar sinérese, porém tendem a se desintegrar mais facilmente com o tempo. Além disso, esferas de alginato com maior teor M são menos porosas do que as esferas correspondentes de alginato com alto teor G (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008; KAWAGUTI; SATO, 2008; MØRCH et al., 2006).

### 1.3.2. Gelatina

O colágeno é a proteína mais abundante encontrada nos animais e é composto por três cadeias  $\alpha$  entrelaçadas formando uma estrutura tripla-hélice. Existem pelo menos 28 tipos de colágeno identificados, onde cada tipo varia em sequência, estrutura e função e, portanto, cada um é distribuído de maneira diferente em peles, ossos, tendões, sistemas vasculares ou tecidos conjuntivos intramusculares (LIU et al., 2015). Entre as fontes de

colágeno mais utilizadas, podem ser citadas, pele de suínos ou couro, ossos e aparas bovinas e, mais recentemente de aves e peixes (MARIOD; ADAM, 2013; RANASINGHE et al., 2020).

A gelatina é um composto proteico natural solúvel obtido pela hidrólise parcial do colágeno, onde as ligações de hidrogênio e algumas ligações covalentes do colágeno são clivadas a temperaturas acima de 40 °C, e isso leva à desestabilização da estrutura da hélice tripla, levando à formação de gelatina solúvel. Alguns fatores como fonte, idade do animal, forma de obtenção, e tipo de colágeno, influenciam as propriedades das gelatinas (GOMEZ-GUILLEN et al., 2011). Além desses fatores, o conteúdo relativo de cadeias  $\alpha$  e componentes  $\beta$  ou  $\gamma$ , agregados de alto peso molecular, presença de fragmentos de proteínas de baixo peso molecular e a hidrofobicidade afetam as propriedades físicas da gelatina (RANASINGHE et al., 2020).

Comparada ao colágeno, a gelatina possui produtos metabólicos de pouca resposta antigênica, é biocompatível, biodegradável, de baixo custo e, um dos biomateriais mais conhecidos e, assim como seus derivados, não é tóxica. Devido a características específicas, incluindo sua natureza anfotérica, estrutura helicoidal específica de fita tripla e sua interação com a água, que não são observadas em outros polímeros hidrofílicos sintéticos, a gelatina tornou-se crucial em diferentes aplicações (RANASINGHE et al., 2020), e é classificada como GRAS para uso pela FDA (SANTORO; TATARA; MIKOS, 2014).

A gelatina é comumente utilizada nas indústrias farmacêuticas para formação de emulsões, confecção de cápsulas, revestimento, encapsulamento, microencapsulação de comprimidos, curativos, instrumento para liberação controlada de fármacos, sensores biorresponsivos e engenharia de tecidos (MARIOD; ADAM, 2013; SANTORO; TATARA; MIKOS, 2014). A natureza hidrocoloidal única da gelatina também permite amplas aplicações na indústria de alimentos como agente emulsionante, espumante, agente de acabamento, estabilizador de coloide, material biodegradável para formação de filme, agente dispersante, aeração e microencapsulação (GOMEZ-GUILLEN et al., 2011) em produtos como geleias, sobremesas, doces, produtos à base de carne, sorvetes e laticínios (RANASINGHE et al., 2020).

A gelatina apresenta peso molecular variando de 15 a 400 kDa, é composta por 18 aminoácidos com sequências repetidas de glicina-X-Y, em que X e Y, frequentemente, são os aminoácidos prolina e hidroxiprolina (aminoácidos não essenciais derivados de prolina), respectivamente. Essas sequências são responsáveis pela capacidade da gelatina de formar

géis físicos. Aminoácidos como lisina, arginina, metionina e valina também estão presentes nessa estrutura, mas em proporção significativamente menor (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2020).

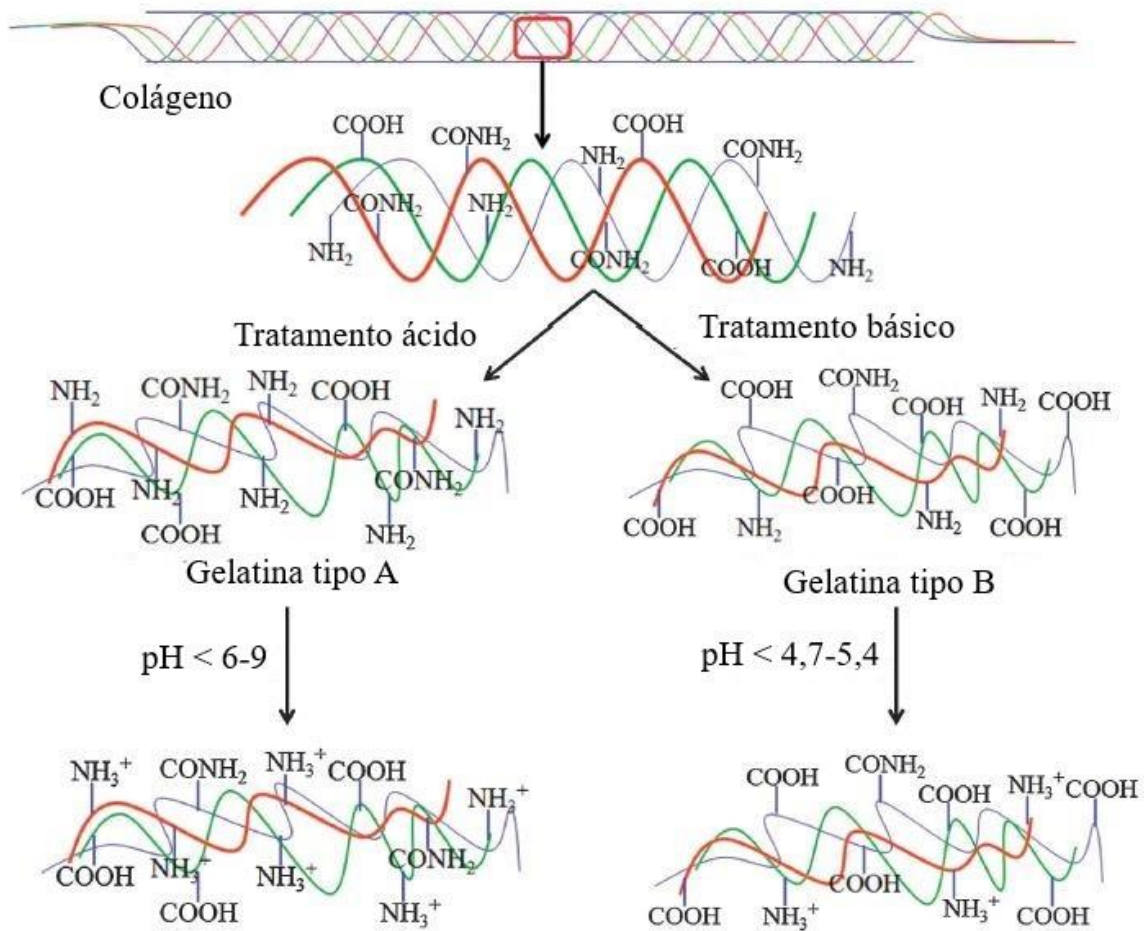
Conforme Ranasinghe e colaboradores (2020), o processo de conversão do colágeno em gelatina consiste principalmente de 3 etapas:

- ✓ Remoção de material que não seja colágeno;
- ✓ Hidrólise parcial do colágeno em gelatina;
- ✓ Recuperação e secagem do produto final.

Inicialmente, são realizados pré-tratamentos químicos (ácidos ou alcalinos) com o objetivo de inchar os colágenos e remover a proteína não colágena. A extração por água quente é o método mais amplamente utilizado para a extração de gelatina. Durante o processo, a estrutura em hélice tripla se decompõe e moléculas menores de gelatina são produzidas. Esses procedimentos são muito afetados pelo pH, temperatura e tempo aplicado no pré-tratamento e extração (GOMEZ-GUILLEN et al., 2011).

Com base no pré-tratamento realizado no processo de extração, existem dois tipos de gelatina obtidas; tipo B (ponto isoelétrico 4,8 - 5,4) (SAMAL et al., 2012), que é obtida por hidrólise alcalina de ossos e pele de bovinos e tem como alvo os grupos amida de asparagina e glutamina da gelatina, hidrolisando-os em grupos carboxílicos, o que a torna carregada negativamente; e tipo A (ponto isoelétrico 8 - 9) (ARAMWIT et al., 2015), obtida por hidrólise ácida de pele de suínos. Esse processo não afeta significativamente os grupos amina, de maneira que seu caráter catiônico se manifesta em pH abaixo de seu ponto isoelétrico pela protonação dos grupos amina, conforme mostra Figura 4 (SAMAL et al., 2012). Assim, com base no pré-tratamento é que vão ser determinadas as características futuras do suporte.

Figura 4: A natureza catiônica intrínseca da gelatina a valores de pH abaixo de seu ponto isoelétrico.



Fonte: Adaptado de SAMAL e colaboradores (2012).

No entanto, a principal limitação da gelatina é sua rápida dissolução em ambientes aquosos, baixa estabilidade e resistência mecânica, limitando seu uso (XING et al., 2014). Por isso, os efeitos da introdução de outros polímeros na gelatina foram estudados na tentativa de superar as restrições à aplicação de gelatina, como por exemplo a formação de *blends* com alginato. Neste caso, as funções amino da gelatina interagem com grupos carboxílicos de alginato para formar um complexo no qual as enzimas podem ser aprisionadas e imobilizadas por ligações covalentes utilizando reagentes bifuncionais (FADNAVIS et al., 2003), possibilitando a formação de suportes mais complexos e resistentes, com características distintas para novas aplicações, como por exemplo, na utilização em engenharia de tecidos do miocárdio (ROSELLINI et al., 2009), liberação controlada de fármacos (BANERJEE; PATRA; GANGULY, 2017), imobilização de lacase

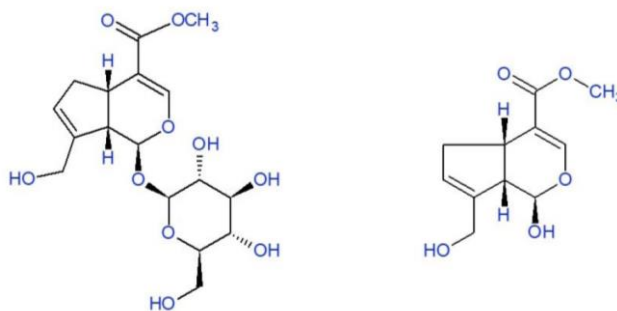
para descoloração de corantes sintéticos (MOGHARABI et al., 2012) e encapsulação de probióticos (KHALIL et al., 2019).

#### 1.4. GENIPINA

A genipina é um iridoide incolor, pertencente à classe dos monoterpênos, que pode ser obtido diretamente da *Genipa americana* L. (jenipapo), planta nativa de regiões do sul do México, América Central e região norte da América do Sul, e após hidrólise enzimática dos geniposídeos de frutos da *Gardenia jasminoides* Ellis (gardênia), uma planta originária da Ásia (BRAUCH et al., 2016; YANG et al., 2011).

Descoberta em 1960 por Djerassi e colaboradores, a genipina possui fórmula molecular  $C_{11}H_{14}O_5$  e massa molar igual a  $226,23 \text{ g mol}^{-1}$  (DJERASSI; GRAY; KINCL, 1960; MANICKAM; SREEDHARAN; ELUMALAI, 2014), sendo também conhecida como a aglicona do geniposídeo. É caracterizada pela presença de uma unidade ciclopentanoide ligada com anel de diidropirano (DINDA; DEBNATH; HARIGAYA, 2007). A diferença entre a estrutura do geniposídeo em relação a genipina ocorre no carbono 1 do hexano, onde o geniposídeo possui uma glicose ligada, enquanto a genipina possui uma hidroxila no lugar, como mostra a Figura 5.

Figura 5: Estrutura química do geniposídeo (a) e da genipina (b).



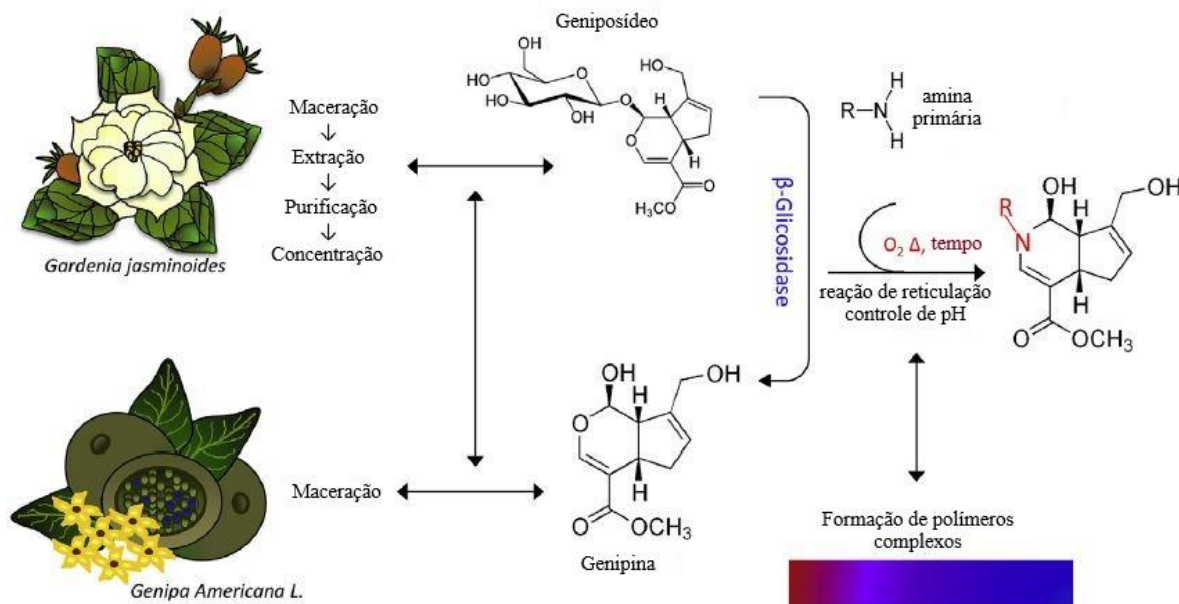
Fonte: Náthia-Neves e colaboradores (2018).

Embora a genipina seja incolor, quando em presença de oxigênio, ela reage espontaneamente com aminas primárias e proteínas, produzindo pigmentos violeta-azulados solúveis em água. Além da genipina, derivados como o geniposídeo e o ácido geniposídico, também reagem com outros compostos para produzir pigmentos, sendo o mecanismo de formação de pigmentos complexo e altamente dependente de fatores como pH, temperatura,



presença de oxigênio e fonte de aminoácido (Figura 6) (BRAUCH et al., 2016; BUCHWEITZ, 2016; TOKAREVA; IVANTSOVA; MIRONOV, 2017).

Figura 6: Recuperação de genipina em frutos da gardênia (*Gardenia jasminoides*) e do jenipapo (*Genipa americana L.*).



Fonte: Adaptado de Neri-Numa e colaboradores (2017).

Durante o amadurecimento das frutas, o pH ácido (pH 3) inibe a formação de coloração azul (BENTES et al., 2015), fato que corrobora com estudo de Mi e colaboradores (2005), que afirmam que em valores de pH mais ácido (pH < 4), os grupos amino estão na sua forma protonada, inibindo o ataque nucleofílico do carbono 3 da genipina. Em pH mais elevado (pH > 10), a reação é inibida devido a hidrólise do grupo éster da genipina, formando um pigmento de coloração vermelha (BRAUCH et al., 2016). Ao contrário do pH, um aumento na temperatura de reação (60-90 °C) afeta positivamente a produção de pigmento, embora esse parâmetro seja variável de acordo com a fonte da amina primária (LEE et al., 2003).

Devido a capacidade de reagir com aminoácidos e proteínas, que permite sua utilização em protocolos de imobilização enzimática como agente de reticulação (FLORES et al., 2019; KLEIN et al., 2016), a genipina é um produto com alto potencial para diversas outras aplicações, como quantificação de aminoácidos (LEE et al., 2003), como substituto da ninidrina na ciência forense (DI TOMMASO et al., 2013), para encapsular substâncias (KHALIL et al., 2019), como possível substituto de *stents* metálicos (CHEN et al., 2009),

na liberação controlada de medicamentos (HARRIS; LECUMBERRI; HERAS, 2010), no tratamento de ferimentos cutâneos e engenharia de tecidos (MUZZARELLI et al., 2015). Quanto aos aspectos regulatórios, o pigmento azul, obtido de *G. jasminoides* está disponível para fins medicinais e alimentares no leste da Ásia em países como Japão e Coreia (BENTES; MERCADANTE, 2014). Na Colômbia, desde 2014 a utilização do extrato já é autorizada pelas suas autoridades sanitárias (*Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos*, INVIMA).

Estudos indicam que a genipina possui propriedades anti-inflamatórias (KOO et al., 2004), antifúngicas (LELONO; TACHIBANA; ITOH, 2009), atividades neuroprotetivas (HOBBS et al., 2018), antidiabéticas (ZHANG et al., 2006), antitumorais (CAO et al., 2010), hepatoprotetoras, propriedades antioxidantes, antidepressivas (WINOTAPUN et al., 2013), além de ser menos citotóxica que o glutaraldeído (TOKAREVA; IVANTSOVA; MIRONOV, 2017).

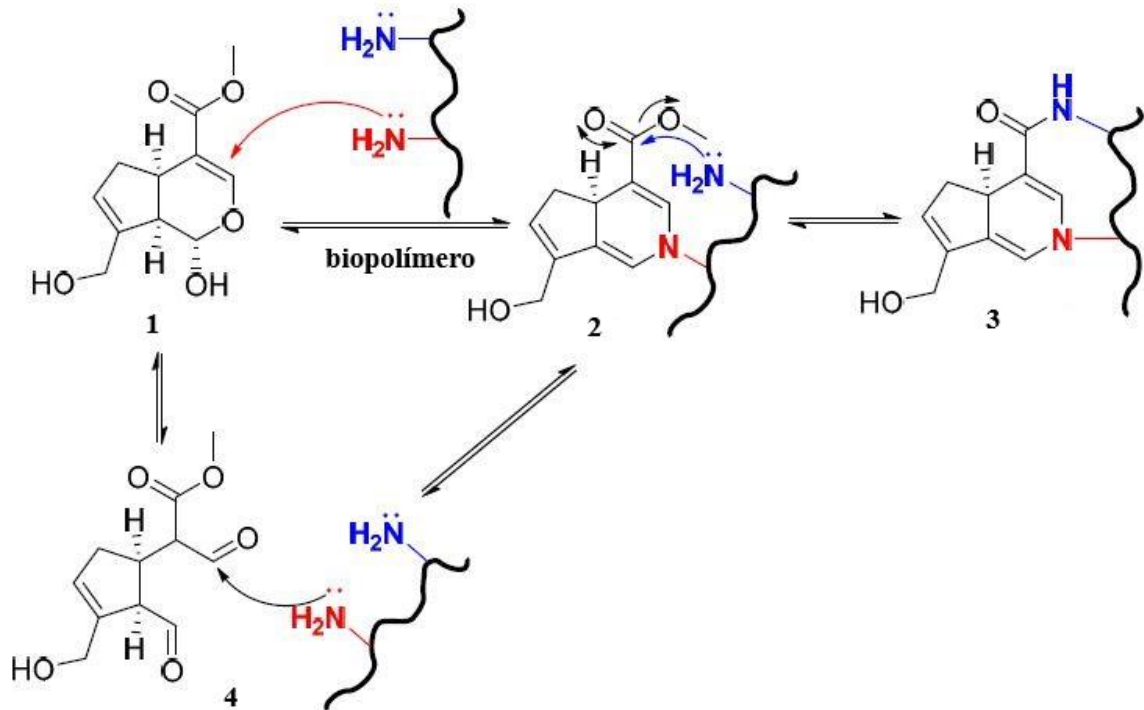
#### 1.4.1. Reatividade da genipina como agente de entrecruzamento

A genipina possui uma alta capacidade para reagir com grupos amina primários, no entanto, o mecanismo de reação de entrecruzamento ainda não está bem elucidado. Duas possíveis hipóteses do mecanismo de reação são propostas na literatura (TOKAREVA; IVANTSOVA; MIRONOV, 2017) conforme esquema da reação mostrado na Figura 7.

De acordo com uma das hipóteses, inicialmente ocorre o ataque nucleofílico de um grupo amino do biopolímero (em vermelho) ao éster  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado da genipina, gerando o composto (2). Na segunda etapa, outro grupo amina da biopolímero (em azul) atacará o grupo metoxicarbonil para produzir uma ligação secundária do tipo amida, com a liberação concomitante de um composto metílico, para produzir o composto reticulado (3).

Na outra hipótese, acontece novamente um ataque nucleofílico ao carbono 3 da genipina (1). Esse ataque gera uma abertura no anel diidropirânico da genipina, seguido de formação de um grupamento aldeído intermediário na molécula (4), que por sua vez, reage com a amina secundária recém formada, formando um novo composto heterocíclico (3) (TACIAS-PASCACIO et al., 2019).

Figura 7: Possível mecanismo de reticulação da genipina com biopolímeros contendo grupamentos amino.



Fonte: Adaptado de Tacias-Pascacio e colaboradores (2019).

É importante notar que, independentemente da natureza precisa das ligações químicas envolvidas na reticulação, a genipina é sem dúvida um reagente muito útil, não tóxico e ambientalmente amigável para a geração de biomateriais reticulados (TACIAS-PASCACIO et al., 2019).

### 1.5. IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE

Com o objetivo de melhorar parâmetros de imobilização, estabilidade e possibilidade de reuso, pesquisas mostram diferentes métodos e suportes para imobilização enzimática com finalidades distintas. A seguir serão relatados alguns estudos voltados para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase.

✓ Utilizando esferas de alginato de cálcio e gelatina, a enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* foi encapsulada, empregando o glutaraldeído e a concanavalina A como agentes modificadores, a fim de avaliar a influência da adição de cada agente modificador na imobilização da enzima, para a hidrólise da lactose presente no soro de queijo. Dessa forma,

os autores desenvolveram um biocatalisador com a adição de concanavalina A, seguida de imobilização da  $\beta$ -galactosidase nas esferas de alginato-gelatina e tratamento com glutaraldeído, e outro experimento sem a adição de glutaraldeído. Assim, os autores demonstraram que o teor de hidrólise da lactose após 720 min de reação, obteve uma conversão máxima de 71,42 %, utilizando a enzima complexada com concanavalina A em esferas de alginato-gelatina, sem a presença de glutaraldeído no processo de imobilização (MÖRSCHBÄCHER; VOLPATO; SOUZA, 2016).

✓ O emprego de quitosana reticulada com genipina para imobilizar  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* foi estudado por Klein e colaboradores (2016), onde a imobilização proporcionou um biocatalisador com boa retenção de atividade enzimática e estabilidade térmica satisfatória, sendo comparável à imobilização tradicional com glutaraldeído. Além disso, a enzima imobilizada manteve 100% de sua atividade inicial após 25 bateladas de hidrólise de uma solução de lactose.

✓ No estudo publicado por Haider e Husain (2007), os autores pesquisaram a aplicação da enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*, na taxa de hidrólise de lactose utilizando três diferentes condições de imobilização. 1) Encapsulamento em esferas de alginato de cálcio; 2) enzima complexada em concanavalina A e posterior encapsulação; 3) enzima reticulada com glutaraldeído previamente a complexação com concanavalina A, e posterior encapsulação. Como resultado, obtiveram uma taxa de hidrólise de lactose, após 3 h de reação, de 66 %, 78 % e 89 %, respectivamente. Além disso, a enzima reticulada previamente a complexação reteve 95 % da sua atividade após o sétimo reuso e 93 % da sua atividade inicial após 2 meses de armazenamento a 4 °C.

✓ Freitas e colaboradores (2011), ao encapsular a enzima  $\beta$ -galactosidase (*A. oryzae*) em esferas de alginato-gelatina reticulada com glutaraldeído, apresentou perfil semelhante de pH e temperatura em comparação com a enzima livre e, que estatisticamente, tanto a enzima livre quanto imobilizada apresentaram a mesma afinidade pelo substrato com valores de  $K_m$  de 52,13 e 60,30 mM, respectivamente.

✓ Em outro estudo, Katrolia e colaboradores (2019) imobilizaram a enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* em sistemas independentes de alginato de bário e quitosana para

análise comparativa da hidrólise de lactose do leite. Como resultados os autores observaram que a enzima imobilizada em quitosana apresentou a melhor taxa de hidrólise de lactose (95,7 %) no leite após 12 h, enquanto a enzima encapsulada em alginato de bário hidrolisou 70,9 % de lactose no leite após mesmo período, sendo inferior à hidrólise da lactose com a enzima livre (82,7 %).

✓ O uso de fibras de hidrogel em *blends* de alginato e gelatina entrecruzadas com glutaraldeído foi estudado na encapsulação de  $\alpha$ -galactosidase de *A. oryzae* para redução de oligossacarídeos não digeríveis presentes no leite de soja. O derivado imobilizado em um reator de leiteo fluidizado apresentou uma redução de 93 % de oligossacarídeos no leite de soja a uma taxa de 25 mL h<sup>-1</sup>. Além disso, o derivado imobilizado foi capaz de manter uma boa redução de oligossacarídeos em até 70 % após 5 ciclos (NAGANAGOUDA; MULIMANI, 2006).

✓ Aburto e colaboradores (2018) estudaram um biocatalisador combinado formado por agregados enzimático reticulado de  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* e células de *Saccharomyces cerevisiae* co-imobilizadas por aprisionamento em partículas de gel de alginato de cálcio para síntese e purificação de galactooligossacarídeos a partir de lactose. Como resultado os autores obtiveram um produto com pureza de 25,7 % e rendimento de 23,3 % de GOS, após 8 h de reação, utilizando o biocatalisador combinado.

✓  $\beta$ -galactosidase de *K. fragilis* foi imobilizada covalentemente em esferas de celulose com epicloridrina para hidrólise da lactose do leite e soro de leite utilizando reator de leiteo fluidizado. A lactose de soro de leite hidrolisado no leiteo fluidizado obteve 90 % de conversão em 30 h de reação e a enzima imobilizada pode ser reutilizada três vezes sem qualquer alteração no desempenho do reator. Ao utilizar leite como substrato, a estratégia com leiteo fluidizado apresentou até 60 % de conversão em 5 h de reação (ROY; GUPTA, 2003).

✓ Utilizando o método de encapsulamento em carragenina, pectina e seus hidrogéis híbridos,  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* foi imobilizada para avaliar o desempenho da atividade catalítica in vitro. Carragenina, pectina e hidrogéis híbridos apresentaram eficiência de encapsulação de  $58 \pm 1\%$ ,  $72 \pm 1\%$  e  $77 \pm 2\%$ , respectivamente. Os hidrogéis

de carragenina e pectina foram 2,0 e 2,4 vezes mais eficazes do que o comprimido comercial na liberação de  $\beta$ -galactosidase sob condições de administração *in vitro*, respectivamente. Além disso, a influência do pH na atividade enzimática indicou que a imobilização em esferas de hidrogéis não foi suficiente para evitar a perda de atividade da enzima induzida por pHs extremamente ácidos (SILVA; TREVISAN; GARCIA, 2020).

## **CAPÍTULO 2 : DEVELOPMENT OF A BIOCOMPOSITE BASED ON ALGINATE/GELATIN CROSSLINKED WITH GENIPIN FOR $\beta$ -GALACTOSIDASE IMMOBILIZATION: PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS**

Neste capítulo será apresentado o trabalho resultante do período do mestrado intitulado “**Development of a biocomposite based on alginate/gelatin crosslinked with genipin for  $\beta$ -galactosidase immobilization: performance and characteristics**” que será submetido à publicação na revista *Biomacromolecules*.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um suporte a base de alginato e gelatina, sintetizados pelo método de gelificação ionotrópica, com a finalidade de imobilizar a enzima  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae*, utilizando a genipina como agente de entrecruzamento. A fim de obter mais informações do suporte, esse material foi caracterizado em função de suas propriedades físico-químicas e seu desempenho como biocatalisador foi avaliado.

Através das análises, observou-se bons rendimentos de imobilização, porém o biocatalisador apresentou baixa retenção de atividade. Apesar do suporte ter uma alta área superficial, por se constituir de material poroso, à existência desses poros internos podem estar inacessíveis para o substrato, o que contribui para menor atividade observada, além da possibilidade de haver bloqueio do sítio ativo pelo próprio efeito da imobilização.

Para a faixa de pH estudado, observou-se que embora a imobilização não tenha modificado significativamente o pH em comparação à enzima livre, o biocatalisador apresentou uma amplitude maior da faixa de pH. Enquanto que para a faixa de temperatura estudado, houve um aumento na temperatura ótima da enzima imobilizada em relação à enzima livre. Este fator agrega valor ao complexo desenvolvido pois possibilita a sua aplicação em processos industriais, como a pasteurização. Além disso, a enzima imobilizada foi mais ativa em temperaturas mais baixas que a enzima livre.

Para a estabilidade térmica da enzima, foi observada um comportamento semelhante entre a enzima livre e o biocatalisador, na temperatura avaliada, com uma tendência à rápida perda de atividade relativa, entretanto, a estabilidade térmica da enzima imobilizada foi bastante superior quando em presença de lactose concentrada, devido ao efeito de exclusão preferencial dos açúcares da superfície da proteína.

A incorporação de alginato, gelatina e genipina no suporte para imobilizar a enzima tinha como objetivo aliar as propriedades desejadas desses dois compostos, para produzir um suporte mais robusto, com maior efeito protetor à enzima. Através das análises calorimétricas, conclui-se que o entrecruzamento e imobilização não tiveram influência na resistência à temperatura do suporte. Porém, o suporte foi resistente até 230 °C, sendo acima da temperatura da maioria das reações enzimáticas (até 100 °C). A caracterização estrutural das esferas mostrou resultados interessantes, onde a adição de genipina e  $\beta$ -galactosidase não provocaram efeito no rearranjo dos dímeros na escala de ~1 nm. No entanto, houve um aumento nas zonas de junção ao adicionar genipina, que foi responsável por um tamanho



geral reduzidos dos dímeros, sendo que a redução adicional após a adição da enzima pode ser por uma consequência da reticulação ou por uma interação eletrostática direta entre enzima e alginato devido ao pI da enzima ser inferior ao pH da síntese. Por fim na maior escala analisada (~100 nm) não foram observadas diferenças quanto à interconectividade das “*hastes*” com a adição de genipina, porém a adição da enzima produziu um aumento na interconectividade provavelmente devido à presença da enzima que poderia reorganizar as cadeias de alginato formando essa rede altamente interconectada.

O biocatalisador liofilizado apresentou boa estabilidade ao armazenamento, onde manteve sua estabilidade sem perdas significativas por até 30 dias, tornando-o uma alternativa interessante de comercialização.

Por fim, a estabilidade operacional foi satisfatória, já que o biocatalisador se manteve estável após 11 bateladas de reuso na reação de hidrólise da lactose, a 40 °C, sem perdas significativas da atividade relativa. Enquanto para esta mesma temperatura, em um reator de leito fixo, o biocatalisador manteve sua atividade hidrolítica próximo a 80% após 20 h de funcionamento contínuo do reator.

Embora alguns resultados não tenham promovido uma melhoria satisfatória no desempenho do biocatalisador, de maneira geral, nas condições avaliadas, o suporte apresenta características interessantes e, em particular, promissor já que foi preparado por uma metodologia simples, viável, de fácil manipulação, seguro, além de permitir a separação do meio reacional, ponto importante para aplicações.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Por fim, como perspectivas futuras desse trabalho sugerem-se:

- ✓ Estudar as condições para otimizar o entrecruzamento da genipina no suporte;
- ✓ Com relação ao suporte obtido, tendo em vista a perda da estabilidade observada com o reator de leito fixo, faz-se necessário um estudo mais aprofundado da elaboração do material;
- ✓ Avaliar uso de alginato de sódio com maior disponibilidade de grupos G para promover um gel mecanicamente mais estável;
- ✓ Avaliar o uso de alginato parcialmente oxidado para facilitar a ligação covalente com gelatina através de base de Schiff;
- ✓ Avaliar o uso de soro de leite e permeado de soro de leite como substrato para a hidrólise;
- ✓ Avaliar a possibilidade de inicialmente adsorver a enzima, seguido de processo de estabilização da enzima e de ligação cruzada com agente de entrecruzamento;
- ✓ Testar a produção de galactooligossacarídeos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURTO, C. et al. Co-immobilized  $\beta$ -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells for the simultaneous synthesis and purification of galacto-oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 118, n. April, p. 102–108, 2018.
- ADRIANO, W. S. et al. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.
- AFZAL, S. et al. The structural, crystallinity, and thermal properties of pH-responsive interpenetrating gelatin/sodium alginate-based polymeric composites for the controlled delivery of cetirizine HCl. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 63–76, 2018.
- AGUILAR, K. C. et al. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v. 154, p. 17–24, 2015.
- AGUIRRE CALVO, T. R.; PERULLINI, M.; SANTAGAPITA, P. R. Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca(II)-alginate beads: A structural study. **Journal of Food Engineering**, v. 235, p. 32–40, 2018.
- ALAMSYAH, G. et al. Effect of chitosan's amino group in adsorption-crosslinking immobilization of lipase enzyme on resin to catalyze biodiesel synthesis. **Energy Procedia**, v. 136, p. 47–52, 2017.
- ALBAYRAK, N.; YANG, S. T. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 2, p. 240–251, 2002a.
- ALBAYRAK, N.; YANG, S.-T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 1, p. 8–19, 2002b.
- AMADORI, S. et al. Effect of sterilization and crosslinking on gelatin films. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 1–9, 2015.
- ANSARI, S.; HUSAIN, Q. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase on concanavalin A-layered calcium alginate-cellulose beads and its application in lactose hydrolysis in continuous spiral bed reactors. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 13, n. 4, p. 15–20, 2011.
- ANVISA. **Resolução RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014**Anvisa, 2014.

ARAMWIT, P. et al. A comparative study of type A and type B gelatin nanoparticles as the controlled release carriers for different model compounds. **Materials Express**, v. 5, n. 3, p. 241–248, 2015.

AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 109–122, 2016.

BANERJEE, A.; PATRA, S.; GANGULY, S. Alginate-gelatin blend with embedded voids for controlled release applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 18, 2017.

BEG, I. et al. Comparison of the thermal stabilization of proteins by oligosaccharides and monosaccharide mixtures: Measurement and analysis in the context of excluded volume theory. **Biophysical Chemistry**, v. 237, n. March, p. 31–37, 2018.

BELLÉ, A. S. et al. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, v. 246, n. August 2017, p. 266–274, 2018.

BENJAMINS, F. **Galacto-oligosaccharide synthesis using immobilized  $\beta$ -galactosidase**. [s.l: s.n.].

BENTES, A. D. S.; MERCADANTE, A. Z. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa Americana* l.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 44, p. 10800–10808, 2014.

BENTES, A. DE S. et al. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3919–3924, 2015.

BEPPU, M. M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, n. 1-2, p. 126–130, 2007.

BIGI, A. et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4827–4832, 2002.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462–482, 2019.

BOON, M. A.; JANSSEN, A. E. M.; VAN 'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**,

v. 26, n. 2-4, p. 271–281, 2000.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

BRAUCH, J. E. et al. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, v. 89, p. 391–398, 2016.

BRUCHET, M.; MELMAN, A. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 57–64, 2015.

BUCHWEITZ, M. **Natural Solutions for Blue Colors in Food**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262–6276, 2013.

CAO, H. et al. Genipin induced apoptosis associated with activation of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p53 protein in HeLa cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1343–1348, 2010.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design**. 1. ed. The Netherlands: Wiley-VHC, 2005.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385–396, 2013.

CHAN, E. S. et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 225–232, 2011.

CHAROENWONGPAIBOON, T. et al. Highly porous core-shell chitosan beads with superb immobilization efficiency for: *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase and production of inulin-type fructooligosaccharides. **RSC Advances**, v. 8, n. 30, p. 17008–17016, 2018.

CHEN, C. S.; HSU, C. K.; CHIANG, B. H. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 801–808, 2002.

CHEN, H. et al. Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, n. Part 2, p. 287–295, 2017.

CHEN, K.; ZHANG, H. Alginate/pectin aerogel microspheres for controlled release of

proanthocyanidins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 936–943, 2019.

CHEN, M. C. et al. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5560–5571, 2009.

CHEN, S. C.; DUAN, K. J. Production of galactooligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with tris(hydroxymethyl)phosphine as an optional coupling agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12499–12512, 2015.

CHIBATA, I. Biocatalysis: immobilized cells and enzymes. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 1986, p. 63–86, 1986.

CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 2017.

CHIOU, B. SEN et al. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. **Polymer**, v. 47, n. 18, p. 6379–6386, 2006.

CHOI, E. J.; AHN, H. W.; KIM, W. J. Effect of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase on diacetyl content of beer. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 1373–1380, 2015.

CONDE-BÁEZ, L. et al. Economic projection of 2-phenylethanol production from whey. **Food and Bioproducts Processing**, v. 115, p. 10–16, 2019.

COOK, M. T. et al. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2834–2840, 2011.

CUI, J. D. et al. Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: A recent review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 258–268, 2014.

D'AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. **Molecules**, v. 13, n. 9, p. 2069–2106, 2008.

DAÂSSI, D. et al. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 71–78, 2014.

DARIF, A. P. S. **Estudo da imobilização de  $\beta$  -galactosidase de *Aspergillus oryzae* ,**

**Kluyveromyces lactis e Saccharomyces marxianus var lactis em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2018.

DASHEVSKY, A. Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 161, n. 1, p. 1–5, 1998.

DE ANDRADE, B. C. et al. Microbial  $\beta$ -Galactosidases of industrial importance: Computational studies on the effects of point mutations on the lactose hydrolysis reaction. **Biotechnology Progress**, n. January, p. 1–9, 2020.

DESHMUKH, K. et al. **Biopolymer Composites in Electronics 3 – Biopolymer Composites With High Dielectric Performance : Interface.** [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

DI TOMMASO, S. et al. Structure of genipin in solution: A combined experimental and theoretical study. **RSC Advances**, v. 3, n. 33, p. 13764–13771, 2013.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A Review, part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 159–222, 2007.

DJERASSI, C.; GRAY, J. D.; KINCL, F. A. Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX.1 Isolation and Characterization of Genipin<sup>2</sup>. **Journal of Organic Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 2174–2177, 1960.

DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science**, v. 280, n. 1-2, p. 37–44, 2006.

DUCONSEILLE, A. et al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 360–376, 2015.

ESKANDARLOO, H.; ABBASPOURRAD, A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using  $\beta$ -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, v. 251, n. January, p. 115–124, 2018.

FADNAVIS, N. W. et al. Gelatin blends with alginate: Gels for lipase immobilization and purification. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 557–564, 2003.

FAROKHI, M. et al. Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 4, p. 230–247, 2020.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 405–418, 2009.

FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15–22, 2015.

FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and

- Whey: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 678–697, 2018.
- FLORES, E. E. E. et al. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, v. 84, n. May, p. 73–80, 2019.
- FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, n. August 2016, p. 1–8, 2017.
- FREITAS, F. F. et al. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, n. 1, p. 33–38, 2011.
- FREITAS, F. F. et al. Optimization of the immobilization process of  $\beta$ -galactosidase by combined entrapment-cross-linking and the kinetics of lactose hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 15–24, 2012.
- GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685–694, 2008.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.
- GENARI, A. N.; PASSOS, F. V.; PASSOS, F. M. L. Configuration of a Bioreactor for Milk Lactose Hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2783–2789, 2003.
- GENNARI, A. et al. Stabilization study of tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase by immobilization on immovead: Thermal, physico-chemical, textural and catalytic properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 4, p. 1403–1417, 2019.
- GOMEZ-GUILLEN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.
- GONZÁLEZ SISO, M. I. **The biotechnological utilization of cheese whey: A review** *Bioresource Technology*, 1996.
- GONZÁLEZ-DELGADO, I. et al.  $\beta$ -galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 257, p. 51–61, 2018.
- GOSLING, A. et al. Facile pretreatment of *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase increases the yield of galactosyl oligosaccharides in milk and lactose reaction systems. **Journal of**



- Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 11570–11574, 2009.
- GOSLING, A. et al. **Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose** **Food Chemistry** Elsevier Ltd, , 2010.
- GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and applications of immobilised  $\beta$ -galactosidase in food industry - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.
- GUERRERO, C. et al. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 70, p. 9–17, 2015.
- GUO, T. et al. A facile fabrication of core–shell sodium alginate/gelatin beads for drug delivery systems. **Polymer Bulletin**, v. 76, n. 1, p. 87–102, 2019.
- HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 1, p. 72–80, 2007.
- HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilisation: Fundamentals and application. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6211–6212, 2013.
- HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.
- HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104–109, 2012.
- HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; HERAS, A. Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: Clarithromycin, tramadol and heparin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1750–1762, 2010.
- HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: The status quo and future trends. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 844–857, 2010.
- HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6277–6289, 2013.
- HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. Circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1-2, p. 26–32, 2000.
- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization:

Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.

HOBBS, C. A. et al. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, n. April, p. 695–708, 2018.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HUSAIN, Q.  $\beta$  Galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41–62, 2010.

ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 543–554, 2009.

IWASAKI, K. I.; NAKAJIMA, M.; NAKAO, S. I. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using  $\beta$ -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 69–76, 1996.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, n. 5-6, p. 801–821, 2014.

JUN, L. Y. et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102961, 2019.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 157–176, 2000.

KATROLIA, P. et al. Enhanced Properties and Lactose Hydrolysis Efficiencies of Food-Grade  $\beta$ -Galactosidases Immobilized on Various Supports: a Comparative Approach. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 2, p. 410–423, 2019.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 134–143, 2008.

KHALIL, K. A. et al. Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* Strain G4 within Bovine Gelatin-Genipin-Sodium Alginate Combinations: Optimisation Approach Using Face Central Composition Design-Response Surface Methodology (FCCD-RSM). **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 2019.

KITTUR, F. S. et al. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives

by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 185–193, 2002.

KLEIN, M. P. et al. Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2456–2464, 2012.

KLEIN, M. P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 184–190, 2016.

KLEWICKI, R. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1196–1201, 2007.

KOO, H. J. et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, n. 2-3, p. 201–208, 2004.

KOVALENKO, G. A. et al. Catalytic properties of glucoamylase immobilized on synthetic carbon material Sibunit. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 374–378, 2007.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.

KRIŽNIK, L. et al. Hyper-activation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, v. 179, p. 225–234, 2018.

LADERO, M. et al. Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 2-3, p. 181–193, 2001.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 583–592, 2000.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEE, S. W. et al. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 2, p. 267–274, 2003.

LELONO, R. A. A.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. Isolation of antifungal compounds from *Gardenia jasminoides*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 13, p. 949–956,

2009.

LI, B. et al. Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

LI, Y. et al. Effect of immobilization site on the orientation and activity of surface-tethered enzymes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 2, p. 1021–1029, 2018.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–6249, 2013.

LIMA, A. F. et al. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 443–452, 2013.

LIN, J. et al. Laccase – methacrylyol functionalized magnetic particles: Highly immobilized, reusable, and efficacious for methyl red decolourization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 144–152, 2017.

LIU, D. et al. Collagen and Gelatin. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 527–557, 2015.

LIU, Y. et al. Molecular orientation of enzymes attached to surfaces through defined chemical linkages at the solid-liquid interface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12660–12669, 2013.

LU, L. et al.  $\beta$ -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. **Biotechnology Advances**, v. 39, n. November 2019, p. 107465, 2020.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 305–344, 2008.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147–154, 1998.

MAKSIMAINEN, M. M. et al. The crystal structure of acidic  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 109–115, 2013.

MANICKAM, B.; SREEDHARAN, R.; ELUMALAI, M. “Genipin” – The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview. **Current Drug Delivery**, v. 11, n. 1, p. 139–145, 2014.

MANO, M. C. R.; PAULINO, B. N.; PASTORE, G. M. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. **Food Research**

**International**, v. 124, n. September, p. 78–85, 2019.

MARÍN-NAVARRO, J. et al. Immobilization of thermostable  $\beta$ -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 989–998, 2014.

MARIOD, A. A.; ADAM, H. F. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 2, p. 135–147, 2013.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. L. et al. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 581, n. February, p. 119289, 2020.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007a.

MATEO, C. et al. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1022–1033, 2007b.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. DE C.; CARRILHO, F. J. Lactose intolerance: Diagnosis, genetic, and clinical factors. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 5, n. 1, p. 113–121, 2012.

MEI, S.; HAN, P.; WU, H. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. **Journal of Biotechnology**, v. 266, p. 1–8, 2018.

MENDES, A. A. et al. APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1985–2000, 2005.

MOGHARABI, M. et al. Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2012, 2012.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological**

**Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MØRCH, Y. A. et al. Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads.

**Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.

MÖRSCHBÄCHER, A. P.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. DE. Kluyveromyces lactis  $\beta$ -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 921–926, 2016.

MUELLER, I. et al. Synthesis, kinetic analysis and modelling of galacto-oligosaccharides formation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 130, p. 154–166, 2018.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7314–7338, 2015.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for  $\alpha$ -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1903–1907, 2006.

NARAYANAN, R. P. et al. Photodegradable iron(III) cross-linked alginate gels. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2465–2471, 2012.

NÁTHIA-NEVES, G. et al. Identification and quantification of genipin and geniposide from *Genipa americana* L. by HPLC-DAD using a fused-core column. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 116–122, 2018.

NERI, D. F. M. et al. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 92–99, 2009.

NERI-NUMA, I. A. et al. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 271–279, 2017.

NERI-NUMA, I. A. et al. Genipap (*Genipa americana* L.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids. **Food Research International**, v. 134, n. September 2019, p. 109252, 2020.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017.

NOROUZIAN, D. Enzyme Immobilization: the State of Art in Biotechnology. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 197–206, 2003.

O'MAHONY, J. ; FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic aspects, 4th edition**. [s.l: s.n.]. v. 1

ORTEGA, N. et al. Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 109–115, 2009.

PAIK, Y. S. et al. Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: Effects of pH, temperature, and light. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 430–432, 2001.

PALAI, T.; MITRA, S.; BHATTACHARYA, P. K. Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade  $\beta$ -galactosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 418–423, 2012.

PANESAR, P. S. et al. **Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase** **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2006.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 325–356, 2010.

PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279–1286, 2010.

PARREIDT, T. S.; MÜLLER, K.; SCHMID, M. Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 1–38, 2018.

PELEGRINE, D. H. G.; GOMES, M. T. M. S. Analysis of whey proteins solubility at high temperatures. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 3, 2012.

PEREIRA, E. B. et al. Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 739–752, 2001.

POURALI, P.; YAHYAEI, B. Wound healing property of a gel prepared by the combination of *Pseudomonas aeruginosa* alginate and *Alhagi maurorum* aqueous extract in rats. **Dermatologic Therapy**, v. 32, n. 1, p. 1–10, 2019.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 9, p. 1019–1025, 1987.

RAMOS, P. E. et al. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 8–16, 2018.

RAMOS-DE-LA-PEÑA, A. M. et al. A review through recovery, purification and identification of genipin. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 37–49, 2016.

RANASINGHE, R. A. S. N. et al. Functional and Bioactive Properties of Gelatin Extracted from Aquatic Bioresources – A Review. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–44,

2020.

REDDY, L. G.; SHANKAR, V. Immobilization of single-strand specific nuclease (S1 nuclease) from *Aspergillus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 231–240, 1987.

REHMAN, H. U. et al. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 1081–1086, 2013.

REMPEL, A. et al. Bioresource Technology Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource Technology**, v. 263, n. April, p. 163–171, 2018.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Physical and Chemical Treatments on Chitosan Matrix to Modify Film Properties and Kinetics of Biodegradation. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 51–57, 2013.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104 SUPPL., p. S1–63, 2010.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. et al. Analysis of fermentation selectivity of purified galactooligosaccharides by in vitro human faecal fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5743–5752, 2013.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. et al. Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. **Food Chemistry**, v. 145, p. 388–394, 2014.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. et al. Continuous packed bed reactor with immobilized  $\beta$ -Galactosidase for production of galactooligosaccharides (GOS). **Catalysts**, v. 6, n. 12, p. 189, 2016.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 1, p. 1–20, 2020.

ROSELLINI, E. et al. Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 91, n. 2, p. 447–453, 2009.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Lactose hydrolysis by Lactozym<sup>TM</sup> immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 325–332, 2003.

SABATER, C. et al. An efficient process for obtaining prebiotic oligosaccharides derived



from lactulose using isomerized and purified whey permeate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 15, p. 5074–5082, 2017.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69–80, 1999.

SAMAL, S. K. et al. Cationic polymers and their therapeutic potential. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7147–7194, 2012.

SÁNCHEZ-GARCÍA, Y. I. et al. Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. **Food Research International**, v. 116, n. January 2018, p. 455–461, 2019.

SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 10, p. 605–616, 2019.

SANGWAN, V. et al. Galactooligosaccharides reduce infection caused by *Listeria monocytogenes* and modulate IgG and IgA levels in mice. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 58–63, 2015.

SANTAGAPITA, P. R.; MAZZOBRE, M. F.; BUERA, M. DEL P. Invertase stability in alginate beads. Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 321–330, 2012.

SANTORO, M.; TATARA, A. M.; MIKOS, A. G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 210–218, 2014.

SAQIB, S. et al. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.

SARKER, B. et al. Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 11, p. 1470–1482, 2014.

SCHÖFFER, J. D. N. et al. Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1311–1316, 2013.

SCHÖFFER, J. DA N. et al. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. **Process Biochemistry**, v. 58, n. April, p. 120–127, 2017.

SCHOUBBEN, A. et al. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate

particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 363–369, 2010.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013a.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013b.

SHEN, Q. et al. Gelatin-templated biomimetic calcification for  $\beta$ -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1565–1571, 2011.

SHUKLA, T. P. Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. **C R C Critical Reviews in Food Technology**, v. 5, n. 3, p. 325–356, 1975.

SILVA, R. C.; TREVISAN, M. G.; GARCIA, J. S. B-galactosidase Encapsulated in Carrageenan, Pectin and Carrageenan/Pectin: Comparative Study, Stability and Controlled Release. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, n. 1, p. 1–15, 2020.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. **Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 79

SMITH, A. M.; MOXON, S.; MORRIS, G. A. Biopolymers as wound healing materials. In: **Wound Healing Biomaterials**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 2p. 261–287.

SOUZA, L. T. DE A. et al. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte**. São Paulo: Blucher, 2017.

STEEN REDEKER, E. et al. Protein engineering for directed immobilization. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 1761–1777, 2013.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition**. 2nd ed. ed. [s.l.] Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

SUÁREZ, S. et al. Effect of particle size and enzyme load on the simultaneous reactions of lactose hydrolysis and transgalactosylation with glyoxyl-agarose immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 56–64, 2018.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1285–1309, 2013.

SZEKALSKA, M. et al. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, p. 1–17, 2016.

- TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Genipin as an emergent tool in the design of biocatalysts: Mechanism of reaction and applications. **Catalysts**, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2019.
- TODOROVA-BALVAY, D. et al. An efficient two step purification and molecular characterization of  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 4, p. 299–304, jul. 2006.
- TOKAREVA, M. I.; IVANTSOVA, M. N.; MIRONOV, M. A. Heterocycles of Natural Origin as Non-Toxic Reagents for Cross-Linking of Proteins and Polysaccharides. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 53, n. 1, p. 21–35, 2017.
- TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 57–64, 2012.
- TRAFFANO-SCHIFFO, M. V. et al. Gums induced microstructure stability in Ca(II)-alginate beads containing lactase analyzed by SAXS. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. September 2017, p. 402–407, 2018.
- TRAFFANO-SCHIFFO, M. V. et al. High-intensity ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cowpea pods and its encapsulation in hydrogels. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04410, 2020.
- UGIDOS-RODRÍGUEZ, S.; MATELLANA-GONZÁLEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MATA, M. C. Lactose malabsorption and intolerance: a review. **Food and Function**, v. 9, n. 8, p. 4056–4068, 2018.
- URRUTIA, P. et al. Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1081–1087, 2013.
- URRUTIA, P. et al. Influence of chitosan derivatization on its physicochemical characteristics and its use as enzyme support. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 8, p. 1–10, 2014.
- URRUTIA, P. et al. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization:  $\beta$ -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 182–193, 2018.
- VALERIO, S. G. et al. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 462–468, 2013.
- VAZ, R. P. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* An overview of

holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **“Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic”**, v. 133, p. 127–135, 2016.

VERA, C. et al. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, 2016.

VETERE, A.; PAOLETTI, S. Separation and characterization of three  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1380, n. 2, p. 223–231, 1998.

VIEIRA, D. C. et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54–64, 2013.

WAHBA, M. I. Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 877–886, 2016.

WAHBA, M. I. Porous chitosan beads of superior mechanical properties for the covalent immobilization of enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 894–904, 2017.

WAHBA, M. I.; SOLIMAN, T. N. Whey protein isolate for the preparation of covalent immobilization beads. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 328–337, 2018.

WANG, Q. Q. et al. Alginate/gelatin blended hydrogel fibers cross-linked by  $\text{Ca}^{2+}$  and oxidized starch: Preparation and properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, n. April 2018, p. 1469–1476, 2019.

WARMERDAM, A. et al. Characterization of  $\beta$ -Galactosidase Isoforms from *Bacillus circulans* and Their Contribution to GOS Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 340–358, 2013.

WENTWORTH, D. S. et al. Application of Chitosan-Entrapped  $\beta$ -Galactosidase in a Packed-Bed Reactor System. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n. 2, p. 1294–1299, 2004.

WINOTAPUN, W. et al. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 2, p. 92–96, 2013.

XAVIER, J. R.; RAMANA, K. V.; SHARMA, R. K.  $\beta$ -galactosidase: Biotechnological

applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1–15, 2018.

XING, Q. et al. Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.

YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

YANG, Y. S. et al. Transformation of geniposide into genipin by immobilized  $\beta$ -glucosidase in a two-phase aqueous-organic system. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 4295–4304, 2011.

YIN, H. et al. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 225, p. 230–238, 2017.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, 2015.

ZAZZALI, I. et al. Effects of pH, extrusion tip size and storage protocol on the structural properties of Ca(II)-alginate beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, n. ii, p. 749–756, 2019.

ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, C. Y. et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced  $\beta$  cell dysfunction in isolated pancreatic islets. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 417–427, 2006.

ZHANG, S.; GAO, S.; GAO, G. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1386–1393, 2010.

ZHAO, Y.; SUN, Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. S2822–S2832, 2017.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 33–40, 2001.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Recent progress in biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 16-18, p. 1081–1100, 2012.

ZHU, Y. et al. Characterization of a naringinase from *Aspergillus oryzae* 11250 and its

application in the debitterization of orange juice. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 114–121, 2017.

ZOHAR-PEREZ, C.; CHET, I.; NUSSINOVITCH, A. Irregular textural features of dried alginate-filler beads. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 2, p. 249–258, 2004.

**APÊNDICE A - BATCH SYNTHESIS OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES  
FROM CO-PRODUCTS OF MILK PROCESSING USING IMMOBILIZED  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE FROM *BACILLUS CIRCULANS***

Neste apêndice será apresentado o trabalho intitulado “**Batch synthesis of galactooligosaccharides from co-products of milk processing using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans***” que será submetido à publicação na revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.