



Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Programa de Ciências e Tecnologias em Saúde

IGOR ALBUQUERQUE DE SOUZA

**Processo de produção de amilases fúngicas
imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana na
produção de açúcares redutores**

TESE DE DOUTORADO

**Brasília
Março de 2020**

IGOR ALBUQUERQUE DE SOUZA

**Processo de produção de amilases fúngicas
imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana na
produção de açúcares redutores**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências e Tecnologias em Saúde, PPGCTS, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências e Tecnologias em Saúde

Orientadora: Claire Nain Lunardi Gomes
Coorientadora: Daniela Castilho Orsi

Brasília
Março de 2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AI24p Albuquerque de Souza, Igor
 Processo de produção de amilases fúngicas imobilizadas em
 microgéis de alginato-quitosana na produção de açúcares
 redutores / Igor Albuquerque de Souza; orientador Claire
 Nain Lunardi Gomes; co-orientador Daniela Castilho Orsi. --
 Brasília, 2020.
 127 p.

 Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências e Tecnologias em
 Saúde) -- Universidade de Brasília, 2020.

 1. Microgéis. 2. polímeros . 3. amido . 4. amilase . 5.
 Aspergillus oryzae. I. Nain Lunardi Gomes, Claire, orient.
 II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.

Tese de Doutorado

Igor Albuquerque de Souza

Título:

Processo de produção de amilase fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana na produção de açúcares redutores

Comissão Examinadora



Profa. Dra. Cláudia Nairi Lunardi Gomes

Profa. Dra. Cláudia Nairi Lunardi Gomes
Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Mestrado em 2007

Presidente Orientadora FCE / UnB

Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas
FCE/ UnB

Prof. Dr. Vinícius Ricardo de Souza
SEE / DF

Dr. Alessandro César de Oliveira Moreira
IBAMA

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes
FCE / UnB

“Dedico a Deus por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis desse trabalho”.

- À professora Claire Nain Lunardi, pela sua paciência conselhos e ensinamentos que foram essenciais para o desenvolvimento da Tese, juntamente as longas consultorias e acessórias para podermos levar o projetos das patentes desenvolvidas.*
- À professora Daniela Castilho Orsi, por seu apoio laboratorial, planejamento de experimentos, e consultoria referente aos métodos utilizados.*
- A todo o corpo docente que de forma direta ou indireta me fizeram concluir esse trabalho, com conversas potuais sobre os mais diversos temas, me dando clareza para poder abordar alguma questão de outra forma, fazendo com que pudesse chegar a resultados satisfatórios*
- A todo o corpo técnico que de forma direta ou indireta me fizeram concluir esse trabalho, me apoiando na utilização dos equipamentos, preparo dos experimentos e acesso aos mais diversos recursos necessários*

- Dedico este projeto à minha família e amigos que sempre estiveram presentes direta ou indiretamente em todos os momentos de minha formação, principalmente meus pais, pois eles nunca exitaram em me apoiar em nenhuma das minhas decisões.*
- Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com meu desenvolvimento. Principalmente aos irmãos que são sempre presentes, ao “Grupo dos Irmão”, “Grupo dos Mochilas de Criança”, em especial meus grande amigos; Nickolas Mendes Matos, Jorge Lucas Almeida, Ângelo Pereira, Cassiano Miguel Peixoto, Lia Josetti Fuenzalida e meu querido primo Jefferson Souza Gomes, que me ofereceu suporte para utilizar seu escritório para desenvolver a escrita.*

Resumo

O presente trabalho descreve a produção de um suporte polimérico de alginato e quitosana, formando microgéis utilizadas para imobilização das amilases fúngicas obtidas a partir de *Aspergillus oryzae*. As amilases imobilizadas nesse suporte polimérico podem ter diversas aplicações na indústria para hidrólise do amido em açúcares. Diferentes conformações entre os suportes de imobilização (alginato e quitosana) e as amilases foram testadas, avaliando a resposta dos sistemas imobilizados em relação à concentração de açúcares produzidos durante o processo de hidrólise enzimática do amido. Foram realizados teste de reuso das microesferas, testes de produção de açúcares redutores, quantificação de amido residual, todos esses testes avaliando a atividade enzimática. Adicionalmente foram feitos teste de estabilidade em pH e temperatura, colocando o suporte, com o extrato bruto enzimático em diferentes condições. De acordo com disposição das amilases nas microesferas: FI: Fase Interna (amilases situaram-se na fase interna do suporte); FIG: Fase Interna com agente ligante; FE: Fase Externa (amilases situaram-se na fase externa do suporte); FEG: Fase Externa com agente ligante; FU: Fase Interna e Externa (amilases situaram-se tanto na fase interna quanto na fase externa do suporte); FUG: Fase Interna e Externa com agente ligante; obteve-se resultados distintos em rendimento em massa, estabilidade em pH e temperatura distintas e reuso em ciclos. Desta maneira, partindo-se de mesmas matérias primas, em mesma condição quantitativa, obtem-se resultados ou faixas de aplicação a depender do ambiente de hidrólise. Os resultados de para a hidrólise do amido em açúcares redutores foram obtidos usando o suporte FI. O rendimento máximo em eficiência de imobilização alcançado foi de 97,38%, com imobilização geral de 17,18%. Durante três ciclos de reutilização da amilase imobilizada, as enzimas permaneceram ativas e ligadas ao suporte IP, convertendo eficientemente amido em açúcar. Os ensaios da avaliação de pH e temperatura em condições variadas demonstram que sa amilases imobilizada apresentava maior atividade a 45 °C e uma faixa de pH de 5,0 a 7,0, com maior atividade a pH 5,0. O sistema imobilizado pode ser melhorado aumentando a concentração de amilase no suporte à FI, o que provavelmente resultaria em maiores taxas de conversão de amido em açúcares redutores.

Palavras-chave: Microgéis, polímeros, amido, amilase, *Aspergillus oryzae*

Abstract

The present work describes the production of a polymeric support of alginate and chitosan, forming microgels used to immobilize fungal amylases obtained from *Aspergillus oryzae*. The immobilized amylases on polymeric support can have several applications in the industry for hydrolysis of starch in sugars. Different conformations between immobilization supports (alginate and chitosan) and amylases were tested, evaluating the response of immobilized systems in relation to concentration of sugars produced during enzymatic hydrolysis process of the starch. Microsphere reuse tests, tests for reducing sugar production, quantification of residual starch were carried out, all of these tests evaluating enzymatic activity. In addition, pH and temperature activity rate tests were carried out, placing the support with crude enzyme (EB) extract under different conditions. According to the arrangement of the amylases in the microspheres: FI: Internal phase (amylases were located in the internal phase of the support); FIG: Internal phase with binding agent; FE: External phase (amylases were located in the external phase of the support); FEG: External phase with binding agent; FU: Internal and External Phase (amylases were located both in the internal and external phases of the support); FUG: Internal and External Phase with binding agent; different results were obtained in mass yield, different pH and temperature activity rate and reuse in cycles. In this way, starting from the same raw materials, in the same quantitative condition, results or application ranges are obtained depending on the hydrolysis environment. Optimal results for the conversion of starch into reducing sugars were obtained using the IP support. The maximum immobilization efficiency yield achieved was 97.38%, with an overall immobilization of 17.18%. During three cycles of reuse of the immobilized amylase, enzymes remained active and bound to the IP support, efficiently converting starch into sugar. Assays of pH and thermal optimization found that immobilized amylase showed greater activity at 45 °C and showed a pH range of 5.0–7.0, with greater activity at pH 5.0. The immobilized system could be improved by increasing concentration of amylase in IP support, which would likely result in higher conversion rates of starch into reducing sugars.

Keywords: Microgels, polymers, starch, amylase, *Aspergillus oryzae*

Lista de ilustrações

- Figura 1 – O ancestral do milho moderno é o teosinto (visto aqui à esquerda). Algumas mutações causaram um aumento de tamanho, a bainha e uma camada dura que precisavam ser rachadas para acessar o endoesperma. Mutações posteriores eliminaram o revestimento duro, aumentaram o tamanho e o número de grãos. Todas essas mudanças são devidas a mutações genéticas que evoluíram como parte da seleção artificial e da diversidade genética. 15
- Figura 2 – Mosaico de uma vila romana, Corinto. Retratado é uma cena pastoral. (150-200 d.C) Museu Arqueológico de Corinto, demonstrando a prática de domesticação de animais selvagens para aplicações agropecuárias. 16
- Figura 3 – xilogravura medieval mostra muitos usos para leite e creme. O fromager central está lavando e coando a coalhada para fazer queijo; camponês bata creme na manteiga; grandes rodas de queijo envelhecem nas prateleiras ao fundo. 17
- Figura 4 – Tubos com os experimentos de cerca de um século atrás, em 1915, que Chaim Weizmann, inventou um processo de fermentação que converteu amido - um polícarbonato prontamente disponível a partir de milho e batatas - em acetona e álcool butílico, facilitado por uma bactéria, *Clostridium acetobutylicum*, que o Dr. Weizmann havia isolada anteriormente. 20
- Figura 5 – As ciências básicas são as bases ou “raízes” de todos os aspectos da biotecnologia. O foco central ou “tronco” para a maioria das aplicações biotecnológicas é a engenharia genética. Os galhos da árvore representam diferentes organismos, tecnologias e aplicativos que “se originam” da engenharia genética e bioinformática, aspectos centrais da maioria das abordagens biotecnológicas. 24
- Figura 6 – Evolução histórica do uso de enzimas a)Utilização de enzimas durante antiguidade b)Utilização de enzimas isoladas de animais c)Utilização de enzimas provenientes de microorganismos 26
- Figura 7 – Estrutura primária demonstrando a sequência de aminoácidos e a ligação peptídica entre eles. 27
- Figura 8 – a) Estrutura alfa-hélice b) Estrutura de Folha-beta. 29
- Figura 9 – Estrutura terciária, representando as principais interações que tem entre as estruturas secundárias, indicadas por interações hidrofóbicas, hidrofílicas, sulfídricas, ácidas e básicas, respectivamente. 30

Figura 10 – Integração de cadeias polipeptídicas, representando um estrutura proteica quarternária, constitída por quatro cadeias simétricas, separadas por quatro linhas tracejadas.	31
Figura 11 – Ilustração descrevendo e redução da energia de ativação mediada pelas enzimas	35
Figura 12 – emphAspergillus oryzae crescido no meio BD mostrando sua característica mais marcante que é sua coloração branca	37
Figura 13 – Sítios de ação de atividade enzimática indicadas nas ligações α -1,4, presentes entre uma glicose e outra, e ligações α -1,6 entre as cadeias de amilose, consituindo uma cadeia de amilopectina	38
Figura 14 – Estrutura molecular do Alginato	43
Figura 15 – Estrutura molecular da Quitosana	47
Figura 16 – Reação do glutaraldeído com cadeias polisacarídicas ligando-as as enzimas	50
Figura 17 – Esquema Experimental	54
Figura 18 – Esquema de caracterização	55
Figura 19 – Esquema da análise pelo método de ADNS	57
Figura 20 – Esquema de análise para a quantificação de amido residual	58
Figura 21 – Esquema da análise pelo método de Bradford	59
Figura 22 – Procedimento de inoculação do <i>Aspergillus oryzae</i> no arroz	61
Figura 23 – Esquema da obtenção de EB	62
Figura 24 – a) EB extraído do arroz junto ao substrato b) Centrifugação de EB c) EB centrifugado com so sobrenadante d) Sobrenadante utilizado para imobilização	63
Figura 25 – Esquema de síntese	64
Figura 26 – Unidade de atividade presente nos volumes de EB ao longo do procedimento de síntese para cada conformação	64
Figura 27 – Esquema de ilustrativo da síntese : O béque em que se fez o gotejamento, contendo CaCl_2 , quitosana, ácido acético e H_2O , ou EB, no método de síntese de FE e FEG. Na seringa que se fez o gotejamento, em FI e FIG se diluiu o alginato com EB, nas demais sínteses se fez a dissolução com H_2O . Em FU e FUG, ambos os polímeros foram solubilizados em H_2O e posteriormente, secos e intumescidos com EB	66
Figura 28 – emphAspergillus oryzae cultivado sobre o arroz, conhecido como <i>koji</i> , onde foi feita a extração das enzimas que foram difundidas no meio pelo fungo	69
Figura 29 – Extrato bruto, EB, após o processo de centrifugação, pronto para o processo de imobilização	71

Figura 30 – Imagens das seis conformações obtidas a) FI b) FIG c) FE d) FEG e) FU f) FUG	73
Figura 31 – Esquema ilustrativo das conformações obtidas pelas sínteses. As porções coloridas indicam a fase onde se encontra as enzimas	74
Figura 32 – Morfologia externa dos microgéis obtidos por MEV a 10–20 kV, com o detector de Back-scattered Electron – BSED. (A) FI-magnificação de 100×, (A1) FIG-magnificação de 1000×; (B) FE-magnificação de 100×, (B1) FEG-magnificação de 1000×;	76
Figura 33 – Espectros de FTIR obtido nas análises de Esquema da análise pelo método de FTIR ; EB :representado pela cor verde; FI representado pela cor azul; FIG representado pela cor vermelha	78
Figura 34 – Curva de calibração de açúcares redutores pelo método de ADNS	82
Figura 35 – Gráfico da produção de açúcares redutores pelo processo de hidrólise de diferentes conformações	83
Figura 36 – Concentração de açúcares redutores obtidos durante os ciclos de FI	84
Figura 37 – Concentração de açúcares redutores obtidos ao longo de sucessivos ciclos utilizando o suporte FIG	85
Figura 38 – Reação de ADNS	85
Figura 39 – Quantificação de amido residual em FI e FIG ao longo dos três ciclos de reuso dos microgéis. 1: primeiro uso das microgéis com amilases imobilizadas; 2: segundo reuso das microgéis com amilases imobilizadas;3: terceiro uso das microgéis com amilases imobilizadas.	87
Figura 40 – Curva de calibração do método do lodo	88
Figura 41 – Tubos de ensaio representado a a reação do iodo para a quatificação do amido	89
Figura 42 – Representação da reação de complexação das cadeias de amilose do amido com o lodo	91
Figura 43 – Teste da estabilidade dos microgéis e EB em diferentes pHs	92
Figura 44 – Teste da estabilidade dos microgéis e EB em diferentes temperaturas	92
Figura 45 – Imobilização obtida total de EB	94
Figura 46 – Taxa de imobilização total de enzimas ativas	96
Figura 47 – Curva de calibração para quantificação de proteínas no extrato bruto e para avaliação do método de síntese	98
Figura 48 – Concentração de açúcares redutores, obtidos pela hidrólise do amido, pelo sobrenadante recolhido após as sínteses dos microgéis	99
Figura 49 – Concentração proteica no sobrenadante proveniente da síntese	100
Figura 50 – Concentração proteica no sobrenadante ao longo dos ciclos em FI	101
Figura 51 – Tabela descritiva das médias e desvio padrão das concentrações de açúcares redutores obtidos	105

Lista de tabelas

Tabela 1 – Comparação da extração de EB em H ₂ O e Tampão Fosfato	72
--	----

Sumário

1	Introdução	14
1.1	O nascimento da Biotecnologia	14
1.2	O surgimento do termo biotecnologia	21
1.3	Biotecnologia industrial	23
1.4	Biotecnologia no Brasil e Inovações Tecnológicas	25
1.5	Enzimas	25
1.5.1	Estruturas proteicas	26
1.5.1.1	Estrutura primária	27
1.5.1.2	Estrutura Secundária	28
1.5.1.3	Estrutura terciária	29
1.5.1.4	Estrutura quaternária	31
1.6	<i>Aspergillus oryzae</i> e classificação GRAS	36
1.7	Imobilização enzimática	39
1.8	Alginato	43
1.9	Quitosana	46
1.10	Agentes Ligantes	49
1.11	Processo de Hidrólise	51
2	Objetivos	52
2.1	Objetivos Gerais	52
2.2	Objetivos Específicos	52
3	Materiais e Métodos	53
3.1	Reagentes e substratos	53
3.2	Equipamentos	53
3.3	Métodos	54
3.4	Métodos de Caracterização	54
3.4.1	Caracterização das microesferas	54
3.4.2	Caracterização Morfológica e Superficial utilizando Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	55
3.4.3	Caracterização dos Microgéis por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	55
3.4.4	Determinação espectrofotométrica na região do visível	56
3.4.4.1	Teste de quantificação de açúcares redutores pelo método de ADNS	56
3.4.5	Quantificação de amido residual	58
3.4.6	Quantificação de proteínas	59
3.4.6.1	Preparo do reagente de Bradford	59
3.4.7	Método de cultivo	60

3.4.7.1	Obtenção do Extrato Bruto (EB)	62
3.4.7.2	Testes de hidrólise em EB (Controle)	62
3.5	Método de Síntese e imobilização	63
3.5.1	Preparo das amilases imobilizadas nas microesferas de alginato- quitosana	63
3.6	Testes de reuso das microesferas	66
3.6.1	Teste de taxas de atividade sob variação de temperatura e pH . .	67
3.6.2	Taxa de imobilização através da Avaliação de atividade amilolítica do sobrenadante	67
3.6.3	Análise estatística	67
4	Resultados e Discussão	69
4.1	Método de cultivo e obtenção do Extrato Bruto (EB)	69
4.2	Metodologia na obtenção do extrato enzimático	70
4.3	Microgéis sintetizados	73
4.4	Caracterização Morfológica e Superficial dos microgéis utilizando Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	76
4.5	Caracterização dos microgéis por FTIR	77
4.6	Método de caracterização pelo teste de hidrólise	82
4.7	Análise de amido residual	86
4.8	Taxa de atividade em função da variação de pH e temperatura .	92
4.9	Taxa de imobilização através da Avaliação de atividade amilolítica do sobrenadante	94
4.10	Concentração de proteína no sobrenadante	97
4.11	Análise estatística	104
4.11.1	Teste de Confiabilidade nas conformações de Fase Interna . . .	104
5	Conclusão	106
	Referências	108
	 ANEXOS	 123

1 Introdução

1.1 O nascimento da Biotecnologia

O tipo menos refinado de biotecnologia foi o desenvolvimento de plantas e o preparo (especificamente a seleção) de animais. O melhoramento de seres vivos remonta mais de 10000 anos, quando os nossos antepassados também começaram a executar o cultivo de espécies de plantas, como uma fonte sólida de sustento. As espécies mais pontuais de tais plantas selecionadas são arroz e trigo. Os animais selvagens foram adicionalmente controlados para obtenção de leite ou carne. [1]

A transição das sociedades de caçadores-coletores para a agricultura colonizadora (a “revolução neolítica”; ocorreu independentemente mais de uma dúzia de vezes em diferentes regiões do mundo a partir de 10–12.000 anos antes da recentemente desenvolvida a 3000–4000, onde se caracteriza por uma miríade de métodos de cultivo bem caracterizado e utilização de ferramentas. Teorias para explicar as origens e o desenvolvimento da agricultura, consideraram fatores que variam de mudanças no clima e expansão da população a práticas culturais e crenças religiosas.[2]

Ao longo de milhares de anos, os agricultores selecionaram características desejáveis nas culturas e, assim, melhoraram as plantas para fins agrícolas(Figura 1).[3]

As características desejáveis incluem variedades de culturas (também conhecidas como cultivares, de “variedades cultivadas”) com estações de crescimento mais curtas, maior resistência a doenças e pragas, sementes e frutos maiores, conteúdo nutricional, prazo de validade e melhor adaptação às diversas condições ecológicas sob as quais as culturas foram cultivadas. [3]

Figura 1 – O ancestral do milho moderno é o teosinto (visto aqui à esquerda). Algumas mutações causaram um aumento de tamanho, a bainha e uma camada dura que precisavam ser rachadas para acessar o endoesperma. Mutações posteriores eliminaram o revestimento duro, aumentaram o tamanho e o número de grãos. Todas essas mudanças são devidas a mutações genéticas que evoluíram como parte da seleção artificial e da diversidade genética.



<https://imgur.com/gallery/bS5wu/comment/776885153>

De maneira distinta, os progenitores selvagens dos principais animais domésticos do Velho Mundo são endêmicos das regiões com clima mediterrâneo e estão adaptados para suportar secas prolongadas de verão quente e invernos suaves mas, úmidos. Desde a domesticação, os agricultores trouxeram ovelhas, cabras, porcos e gado para uma enorme variedade de ambientes, de semi-desertos a regiões subárticas (Figura 2). Sua distribuição atual, estendida para os limites do mundo habitável pelos seres humanos, era mediada pela proteção humana e criação de animais que prosperam sob condições muitas vezes não toleradas por seus ancestrais selvagens. Os primeiros passos desse processo remontam aos pioneiros agrícolas dos Balcãs que penetraram além das fronteiras da zona sub-mediterrânea da Europa nos primeiros séculos do sexto milênio aC. Como os primeiros pastores dos Balcãs conseguiram estender o habitat de seus animais é uma questão intrigante, de importância crucial para o início da história das relações homem-animal. [4]

Figura 2 – Mosaico de uma vila romana, Corinto. Retratado é uma cena pastoral. (150-200 d.C) Museu Arqueológico de Corinto, demonstrando a prática de domesticação de animais selvagens para aplicações agropecuárias.



https://www.ancient.eu/Animal_Husbandry/

Entre os animais domesticados estavam cabras, ovelhas e gado, cujo leite foi consumido pelo homem como nutriente de alta qualidade. O leite também é um substrato de crescimento muito bom para bactérias, algumas das quais produzem ácido láctico, o que causa a gelificação do leite. O leite acidificado foi consumido como leite cultivado ou convertido em requeijão ácido. Também foi descoberto que o leite pode ser coagulado por certas enzimas proteolíticas, por exemplo, quimosina do estômago de mamíferos neonatais; o coágulo foi convertido em queijo de coalho. O queijo é produzido desde as primeiras civilizações, por exemplo, Suméria e Egito, e foi bem estabelecido na Roma Clássica. A produção de queijos se espalhou por toda a Europa Figura 3 e Oriente Médio e, posteriormente, para as Américas do Norte e do Sul e Oceania, evoluindo para pelo menos 1000 variedades. [5]

Nos tempos pré-históricos, uma forma primitiva de biotecnologia era praticada por agricultores que criaram espécies de plantas e animais de melhor qualidade por métodos de polinização cruzada ou cruzamentos. As formas anteriores de biotecnologia incluem a formação e criação seletiva de animais, o cultivo de culturas e a utilização de microrganismos para produzir produtos como queijo, iogurte, pão, cerveja e vinho. [6]

Pode se evidenciar também criação arcaica de queijo tipo cheddar, demonstrando uma forma de refinamento do métodos de produção, juntamente a produção iogurte e pão, em pequena escala também se evidencia em registros remotos. [1] Muitos alimentos fermentados foram produzidos em todo o mundo. A fermentação é um pro-

cesso que transforma o material de partida em um produto que pode ter características nutricionais e / ou organolépticas aprimoradas. [7, 8]

Diferentes bebidas mistas, por exemplo, cerveja e vinho foram criadas durante a época do Egito Antigo(6500 a.C.), ficando mais evidenciadas na quando o processo de envelhecimento foi encontrado sistematizado pela primeira vez, em achados arqueológicos, destacando as propriedades que se tinha tais produtos após um determinado tempo, ou passados por algum processo específico. [1, 9]

Figura 3 – Xilogravura medieval mostra muitos usos para leite e creme. O *fromager* está lavando e coando a coalhada para fazer queijo; camponês batia o creme tornando-o manteiga; grandes rodas de queijo envelhecem nas prateleiras ao fundo.



<https://thecheesetraveler.com/tag/cheesemaking/>

A sistematização da química de forma, juntamente a evolução da biologia, se ramificando para a microbiologia, verificou-se que formas de vida em escala miniaturizada, microorganismos de forma geral, principalmente leveduras e/ou fungos, hidrolisam os açúcares quando precisam de oxigênio e finalmente são responsáveis pelo envelhecimento e degradação de produtos perecíveis. Este procedimento traz a disposição dos itens (nutrição e bebida).[8, 10]

Tradicionalmente, a arte da fermentação evoluía lentamente e, embora muitos têm tido uma participação em sua prática, poucos tinham interesse em mudanças nos métodos, havendo posteriormente momentos cruciais nos quais a interpretação científica e habilidades técnicas foram reintegradas para produzir técnicas inovadoras e diferentes abordagens. No final do século XVII, a era da revolução científica, novas habilidades de termometria e hidrometria, assim como Teorias químicas da fermentação foram introduzidas. O médico da corte prussiana Georg Ernst Stahl (1659–1734) foi pioneiro no conceito de uma tecnologia de fermentação específica, que ele chamou de “zimotecnologia” em seu livro *Zymotechnia Fundamentalis* (Fundamental Zymotechnology) publicado em 1697. Este texto influente pode ser visto como o documento fundador da biotecnologia.[11]

Juntamente ao marco das descobertas de Pasteur surgiam as pesquisas voltadas para genética, de Mendel (1822-1884), sugerindo as leis da hereditariedade. Em 1868 Casimir Joseph Davaine, reverteu infecções bacterianas advindas de bactérias por um novo método de tratamento por calor. Neste mesmo ano Johannes Friedrich Miescher separou a Nucléina (um composto constituído por ácidos nucleicos) de pus de células, obtidas a partir de bandagens usadas. [1]

Durante o período de 1873 a 1876, o interesse pela pesquisa em DNA começou. O DNA foi inicialmente derivado do esperma de truta (encontrado no rio Reno). Durante este período, Koch investigou o antraz e explorou certas técnicas para identificar, cultivar e corar microorganismos. Ele também levou imagens deles que foram posteriormente apoiados por Gram, Cohn e Weigart.[12, 8]

Em 1881 Koch estabeleceu técnicas de culturas bacterianas, levando a microbiologia a outro patamar, possibilitando estudos mais minuciosos, tanto na microbiologia aplicada, microbiologia clínica e imunologia. Ao mesmo tempo Pasteur estabelece as vacinas que já vinha desenvolvendo há algum tempo. Com os novos avanços e diversas técnicas em microbiologia, a genética de Mendel fica em evidência novamente, sendo aplicadas suas teorias por Vries, von Tschermak e Correns.[1]

O amplo escopo da zimotecnica foi reconhecido em 1913 em Copenhague, quando o professor de química agrícola e fisiologia de fermentação de Orla Jensen, ex-aluna de Jørgensen, foi renomeada como a cadeira de química biotecnológica. O curso de Jensen ligou tratamentos de proteínas, enzimas, e células com a análise de determinados alimentos como leite e margarina e com fabricação de chocolate. Uma nova disciplina estava surgindo. Jensen explicaria sua abordagem alguns anos depois que abordou a natureza da ciência de zimotecnica aplicada. Não era a mera aplicação da ciência pura, mas sim uma forma fundamental de conhecimento crescente fora da prática da experiência. Orla Jensen pode não aparecer nos anais dos grandes bioquímicos, mas na época em que ele retornou para a Dinamarca da Suíça, ele havia otimizado as condições para produzindo as cavidades no queijo Emmenthal.[10]

Assim, a maturação de alguns produtos, como alguns tipos de queijo, que nada mais é do que microorganismos se instalando e se propagando, sendo talvez tal fenômeno investigado pela primeira vez por alguma coincidência, já que em vezes não se sabia seus possíveis mecanismos de funcionamento. Durante a antiguidade, alguns grupos acreditavam que o envelhecimento era uma bênção de seres divinos. Prova lógica para a maturação foi descrita pela primeira vez por Louis Pasteur no final do século XIX. Ele ilustrou uma hipótese conhecida como hipótese germinativa, exibindo a sobrevivência de seres vivos de pequena escala o que é mais, suas consequências adicionais para o processo de maturação. [Steinberg and Raso]

Os esforços de Pasteur contribuíram para algumas partes da ciência. Em ocasiões anteriores, algumas poucas drogas foram utilizadas como itens de biotecnologia, por exemplo, o mel, que poderia ser usado para tratar alguns problemas respiratórios e como um bálsamo para feridas. Levando-se em conta que o mel contém algumas propriedades antimicrobianas, é visto como um agente anti-infecção e é adequadamente utilizado na recuperação de feridas. Da mesma forma, na China, já em 600 aC, utilizava a coalhada de soja, sendo utilizada no tratamento de bolhas. [13]

Rancheiros ucranianos utilizavam cheddar podre para tratar fermentos contaminados. Mais tarde foi descrito que agentes anti-infecciosos presentes em tais produtos eliminam microorganismos e afastaram a disseminação de contaminações. Em 1928, Alexander Fleming separou a penicilina, a principal anti-infecção, da forma. Esta divulgação perturbou os medicamentos acessíveis, com agentes anti-infecciosos com mais potencial e sendo mais poderosos do que medicamentos anteriores. O avanço da biotecnologia quanto à curva de rendimento (contando leguminosas culturas), inoculações e inovação desenhada pela criatura, foi reconhecido entre os século XVIII e início do século XIX. O atrasado o século XIX era conhecido por ser uma conquista na ciência.[1]

Os eventos citados anteriormente também foram impulsionados pela indústria da guerra. A ciência e a tecnologia também foram reunidas sob a pressão da 1ª Guerra mundial. Em Berlim, o fermento para ração animal foi cultivado em grande escala em substratos que tinham a nova amônia sintética de Fritz Haber, como nutriente. Na Grã-Bretanha, o judeu bielorrusso e futuro presidente de Israel, Chaim Weizmann, tendo com Auguste Fernbach no Instituto Pasteur, desenvolveu sua própria técnica para utilizar bactérias para produzir acetona, a partir do amido. [14, 10]

Weizmann primeiro queria encontrar um uso para os produtos agrícolas de baixo valor da Palestina, e mais tarde ele queria ajudar os Aliados a produzir pólvora sem fumaça, que dependia da acetona⁴. [10, 15]

Seria o método de seleção de indivíduos de uma espécie individualmente, se selecionando os com melhores desempenhos para determinada aplicação. Por exemplo, o trigo se parecia com a grama de jardim, assim como o arroz, e agora ambas espécies possuem cultivares de alto rendimento de matéria prima amilácea. [10]

O processo Weizmann também forneceu a inspiração para outras aplicações do que veio a ser chamado de microbiologia econômica. Foi outro desenvolvimento de guerra que inspirou a cunhagem da palavra “Biotecnologia”.

Figura 4 – Tubos com os experimentos de cerca de um século atrás, em 1915, que Chaim Weizmann, inventou um processo de fermentação que converteu amido - um polícarbonato prontamente disponível a partir de milho e batatas - em acetona e álcool butílico, facilitado por uma bactéria, *Clostridium acetobutylicum*, que o Dr. Weizmann havia isolada anteriormente.



<http://www.weizmann.ac.il/WeizmannCompass/sections/people-behind-the-science/chaim-weizmann%E2%80%99s-acetone-patent-turns-100>

O trabalho de Louis Pasteur reforçou a distinção entre criaturas vivas e entidades químicas, e até o final do século XIX vê-se tentativas de desenvolver um novo estudo científico da fermentação. Os centros de pesquisa de fermentação não eram os locais de grande referência ao longo revolução industrial como, o Ruhr ou Lancashire industrial; em vez disso eram metrópoles da agroindústria como Paris, Berlim, Copenhague e Chicago. O último era o centro do maior mercado agrícola do mundo; as pradarias próximas ao forneceu o mundo o trigo, enquanto o processamento de carne da linha de produção de Chicago foi o modelo para as linhas de montagem de carros da Henry Ford.[10]

Ao mesmo tempo, a Dinamarca era o centro mundial de de produção agrícola de produtos com maior valor agregado, sendo pioneiros nos métodos de, engorda de porcos e bacon, manteiga e produção de cerveja. Atribui-se a indústria dinamarquesa a inserção nos processos biológicos industriais, a integração, reintegração, conceituação e reconceituação de processos e técnicas em processos fermentativos e bioquímicos. [1]

1.2 O surgimento do termo biotecnologia

Durante o período entre guerra, filósofos, sociologias e o público intelectual iniciaram a reflexão relativa a crescente conexão entre a biologia e a tecnologia. Se iniciou o que a idéia de biotecnologia, e que a mesma poderia ser um meio para se mudar a natureza humana, para mudar a sociedade, gerando o primeiro embrião da eugenia, pelos novos conceitos que surgiam de genética e atingindo um patamar industrial de alta magnitude.[16]

A utilização desses diversos processos biológicos, organismos ou sistemas para produzir mercadorias que podem vir a melhorar o cotidiano de diversas formas, e são contemplados dentro biotecnologia. De forma abrangente, isso pode ser definido como a bioengenharia para fins de uso humano. Também pode ser definido como o conjunto de técnicas necessárias para a utilização de sistemas vivos ou a influência de processos naturais, de modo a produzir produtos, sistemas ou ambientes para ajudar o desenvolvimento. Atualmente, a biotecnologia dá mais ênfase ao estabelecimento de genes híbridos, seguidos de sua transferência para organismos nos quais alguns, ou todos, do gene geralmente não estão presentes. [6]

A biotecnologia é extensivamente caracterizada em um relatório do 1991 Office of Technology Assessment como “qualquer sistema que utiliza formas de vida (ou partes de seres vivos) para fazer ou alterar itens, para melhorar plantas ou criaturas, ou para criar microorganismos para empregos explícitos”. Esta inovação tem sido fundamental no avanço e execução de procedimentos para a montagem de agentes anti-infecciosos e diferentes fármacos, açúcares, álcoois, aminoácidos e outros ácidos orgânicos, prover itens de alto impacto, através do uso de microbiologia, maturação , compostos, inovação em células animais e tecnologias de separação. [17]

Especialistas, realizaram regularmente o scale-up para a geração moderna de tecnologias em períodos surpreendentemente breves. Um número moderadamente modesto catalisou, ao longo de um período de 50 anos, o desenvolvimento do manejo farmacêutico, de sustento e agrário, e reivindicou áreas de impacto da economia indiana a ponto dos negócios atualmente ultrapassarem US \$ 500 bilhões / ano. As décadas anteriores presenciaram uma tremenda melhora na biotecnologia, não apenas no que diz respeito à técnicas de separação, mistura, estrutura, testes diagnósticos e métodos de elucidação de atividade das biomoléculas, mas também à sua aplicação como instrumentos dentro das ciências da vida. As biomoléculas demonstraram-se amplamente complexas intrigando não somente a química orgânica, mas também as ciência, de forma geral, farmacologia, a terapêutica, biotecnologia e inovação da qualidade. Tal ciência se faz tão complexa que, independentemente do esforço de um grupo, seria complexo e extremamente difícil incorporar todas as partes da biotecnologia em um único livro. [3]

A palavra “biotecnologia” adquiriu significância e importância gigantescas durante as últimas duas décadas, o que é simplesmente excepcional. A probabilidade e os resultados concebíveis por trás desse tipo de consideração em relação à biotecnologia podem ser devido ao seu potencial ilimitado de servir e beneficiar a humanidade. Até este ponto, a biotecnologia entrou em contato com nossas vidas em todas as perspectivas, por exemplo, sustento, bem-estar e vida das criaturas. Vimos igualmente a importância e a capacidade da biotecnologia para a melhoria de nossa condição e para uma vida melhor, por exemplo, a capacidade da biotecnologia de se incorporar nas necessidades de produtos derivados de petróleo, substituindo-a por biocombustíveis, já que a acessibilidade de fontes não-renováveis de energia estão sendo restringidas para suprir a demanda devido a expansão da população. Em termos menos complexos, nossa vida começa com creme dental biotecnologicamente criado, para conduzir veículos com preenchimentos biotecnológicos, e também lançamos mão para fárcamos para nos manter saudáveis ou controlar doenças crônicas, semelhantes ao diabetes, que melhorando nossa vida. A palavra “biotecnologia” foi obtida a partir de dois termos básicos da ciência, ou seja, “Ciência” e “Inovação”. Na chance de tentarmos decodificar essas duas palavras, apenas recomenda, na linguagem de um leigo, que seja a inovação que torna a nossa vida útil e bem com o trabalho dos recursos naturais.[8]

Devido ao crescente entusiasmo dos governos no campo de criação rápida, aludido à como biotecnologia, numerosas associações e reuniões de trabalho distribuíram relatórios que incorporam significados da biotecnologia. Existe uma variedade impressionante de definições (e não inconsistentemente perplexidade) dependendo dos interesses e preferências daqueles incluídos.[6]

A biotecnologia está representada pelos avanços na engenharia genética com consequências tanto na produção de alimentos e no manejo da agricultura como nos caminhos para lidar com patologias de diversas naturezas. Trata-se nesse caso de processos físico-químicos e da produção de fármacos, enzimas e vacinas que levam a novas terapias e melhorias na saúde. Na área de energia, os biocombustíveis ganham espaço com o problema do aquecimento global e a necessidade de desenvolver fontes de energia renováveis que diminuam a dependência de combustíveis fósseis e reduzam a emissão de gases de efeito estufa. [18]

De fato, a biotecnologia pode ser vista como uma revolução científica que passa por várias disciplinas. Descrita como uma “constelação de revoluções científicas, que passa pelos campos da biologia, bioquímica, química, ciência da computação, bioinformática, matemática, física, engenharias e os vários campos da ciência médica (imunologia e oncologia, por exemplo)”. Estão envolvidas disciplinas distintas, as quais conecta diferentes ramos da biotecnologia.[18]

Com relação ao campo do bem-estar, a biotecnologia está confinada à criação de medicamentos de alto valor agregado, por exemplo, agentes anti-infecciosos, imuni-

zações e anticorpos,. Da mesma forma, não abrange as regiões de design terapêutico e inovação, regularmente aludidas como construção biomédica (ou parte do tempo de bioengenharia). A horticultura, a produção consuetudinária e a reprodução de animais são, na maioria das vezes, vistas como biotecnologia. Seja como for, partes desses exercícios devem ser consideradas, uma vez que as plantas fornecem os materiais brutos à maioria das formas biotecnológicas. Além disso, a biotecnologia, através da criação de pesticidas microbianos e a utilização dos atuais métodos de controle hereditário para o avanço *in vitro* de animais e a produção de variedades com melhores capacidades de fixação de nitrogênio, tendo um efeito significativo sobre o agronegócio no futuro. [16, 19]

1.3 Biotecnologia industrial

A biotecnologia industrial encapsula a aplicação de ferramentas baseadas nos processos industriais tradicionais (bioprocessos) e a manufatura baseada em bioprodutos (como, combustíveis, produtos químicos, e plásticos) a partir de matérias primas renováveis. Microrganismos, enzimas e sua engenharia genética constituem as bases de uma área de tecnologias e processos de diversas companhias, pesquisadores e cientistas que buscam do desenvolvimento para seu uso comercial.[20]

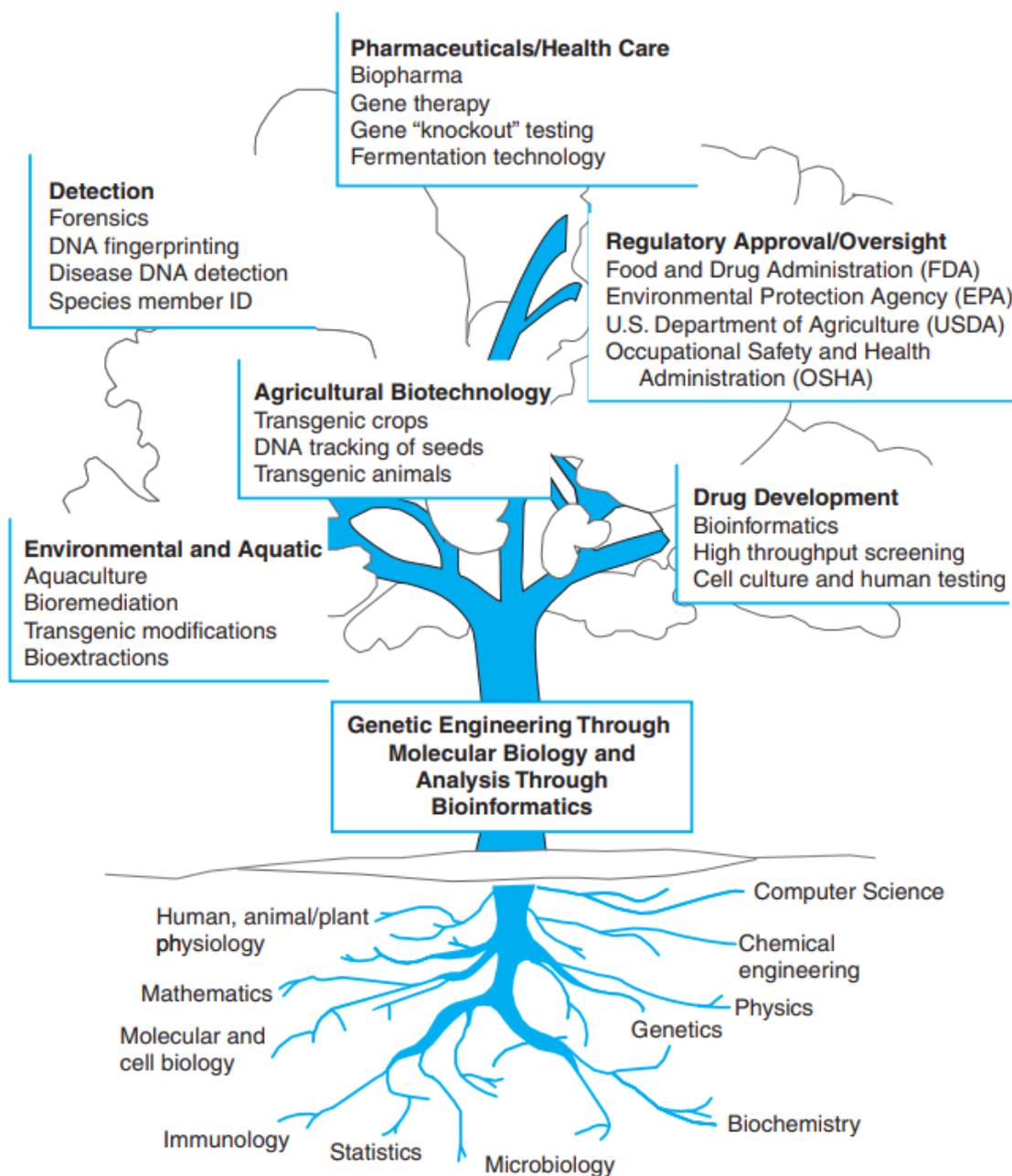
Novas aplicações de enzimas têm sido utilizadas em diversos, comida, alimentação animal, agricultura, papel e na indústria têxtil, resultando em reduções significantes g]de gastos. Ao mesmo tempo, o rápido desenvolvimento tecnológico tem estimulam as indústrias químicas e farmacêuticas a utilizarem a tecnologia enzimática, uma tendência fortalecida devido aos alertas referentes a saúde, energia, commodities e meio ambiente. [21]

Com a tecnologia de DNA recombinante, foi possível clonar genes que condicionam as enzimas microbianas e expressá-las em níveis 10 a 1000 vezes maior que as enzimas não modificadas de micro-organismos sem tais modificações. Por conta disso, a indústria de enzimas incorporou rapidamente a tecnologia e abandonou a produção por meio de cepas que não se encaixavam nas demandas dos níveis de produção industrial. A genômica, metagenômica, proteômica e a tecnologia de DNA recombinante, são utilizadas para facilitar a descoberta de novas enzimas de microorganismos na natureza e criar e desenvolver enzimas de maior atividade enzimática.[22]

Com uma ampla abordagem a biotecnologia se faz atualmente uma área que se expandiu em várias frentes, se expandiu e criou novas áreas do conhecimentos detido por ela. As classificações dessas diversas áreas são muito diversificadas (Figura 5). Tendo suas origens muito arraigadas a microbiologia, passando pela zimotecnologia e atualmente sendo uma disciplina que se permeou de forma agressiva na sociedade com toda a área de biologia molecular, sendo a área mais proeminente, dentro das

produções científicas atuais. As classificações das áreas contempladas são as mais diversas, sendo representada da melhor forma pela ilustração abaixo.

Figura 5 – As ciências básicas são as bases ou “raízes” de todos os aspectos da biotecnologia. O foco central ou “tronco” para a maioria das aplicações biotecnológicas é a engenharia genética. Os galhos da árvore representam diferentes organismos, tecnologias e aplicativos que “se originam” da engenharia genética e bioinformática, aspectos centrais da maioria das abordagens biotecnológicas.



1.4 Biotecnologia no Brasil e Inovações Tecnológicas

A Biotecnologia é considerada, no Brasil e no cenário mundial, como uma área estratégica para o desenvolvimento econômico e social, contribuindo fortemente para o desenvolvimento tecnológico do País e, conseqüentemente, para o seu bem-estar social e desenvolvimento socioeconômico. Dados recentes do Sistema Brasileiro de Inovação em Biotecnologia mostram que o país vem evoluindo e propondo ações que visam impulsionar o desenvolvimento da Biotecnologia, identificando os seus pontos positivos e aqueles que constituem gargalos nesta área. O país dispõe de uma forte e crescente competência científica nas universidades e nos institutos de pesquisa, estando atualmente situado entre os 13 maiores produtores de conhecimento. [23]

Entretanto, mesmo com a Lei de Inovação aprovada, a pouca proximidade Universidade-Bioindústria e a pouca cultura empreendedora não permitiram a agilidade necessária para transferir o conhecimento científico acumulado nas Instituições de Ciência e Tecnologia (ICT) para a indústria e convertê-lo em desenvolvimento tecnológico, que vem mudando ao longo dos anos, com a inclusão de disciplinas de empreendimento nos cursos de biotecnologia. Nesse contexto, a área tem como um importante desafio a promoção do comportamento empreendedor, transformando conhecimento em produtos e/ou processos que possam promover soluções e alimentar a cadeia produtiva. Ademais, o País também não dispõe de um sistema eficiente de investimentos privados, de financiamento e apoio às empresas startups, além de excesso de regulamentação na legislação, que dificultam a implantação de um setor industrial robusto. Os mecanismos de difusão da biotecnologia e percepção pública acerca de sua importância também não são eficientes. Esses fortes gargalos devem ser equacionados para que o País definitivamente atinja um patamar de desenvolvimento desejado na área de Biotecnologia. A proposição de ações estratégicas de inovação nas áreas de fronteira, como a genômica, pós-genômica, proteômica, metabolômica, neurociências, células-tronco, conversão de biomassa e nanobiotecnologia constitui hoje um ponto relevante à Biotecnologia no Brasil, uma vez que são áreas promissoras para inovações tecnológicas de alto valor agregado, com potencial de geração de novos mercados nacionais e internacionais.[23]

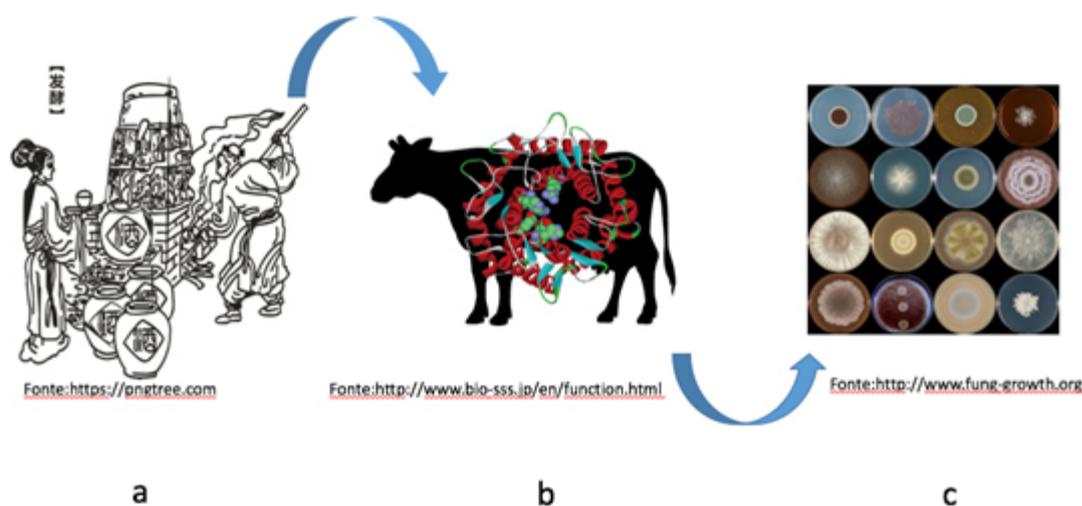
1.5 Enzimas

A indústria de enzimas como a conhecemos hoje é o resultado de um rápido desenvolvimento visto principalmente nas últimas quatro décadas, graças à evolução da biotecnologia moderna. Enzimas encontradas na natureza têm sido usadas desde a antiguidade na produção de produtos alimentícios, como queijo, massa fermentada, cerveja, vinho e vinagre, e na fabricação de mercadorias como couro, índigo e linho (Figura 6a). Todos esses processos dependiam de enzimas produzidas por microrganismos.

mos de crescimento espontâneo ou por enzimas presentes em preparações adicionais, como rúmen de bezerros ou mamão, portanto, usadas em nenhuma forma pura ou bem caracterizada (Figura 6b). O desenvolvimento de processos de fermentação durante a última parte do século passado, visando especificamente a produção de enzimas por meio de cepas de produção selecionadas (Figura 6c), tornou possível a fabricação de enzimas como preparações purificadas e bem caracterizadas, mesmo em larga escala. Este desenvolvimento permitiu a introdução de enzimas em verdadeiros produtos e processos industriais, por exemplo, nas indústrias de detergentes, têxteis e amido. [24]

Figura 6 – Evolução histórica do uso de enzimas

- a) Utilização de enzimas durante antiguidade**
- b) Utilização de enzimas isoladas de animais**
- c) Utilização de enzimas provenientes de microorganismos**



1.5.1 Estruturas proteicas

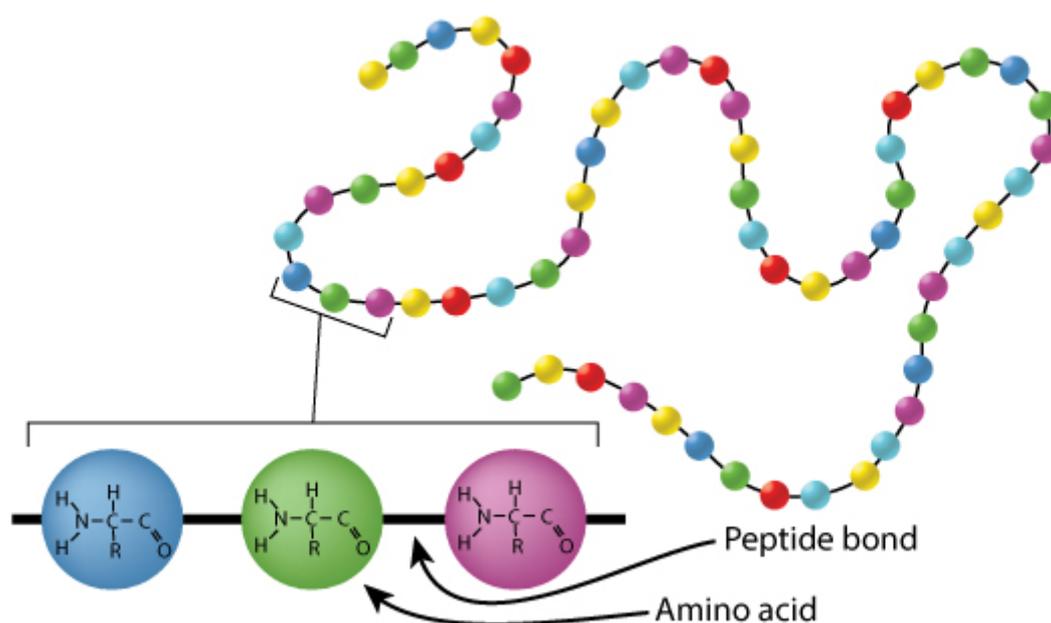
Por mais de meio século, a hierarquia estrutural originalmente criada pelos químicos de proteínas Karl Linderstroëm-Lang e John Schellman forneceu uma maneira útil de descrever a estas estruturas. Apesar do uso dos termos primário, secundário, terciário e quaternário para descrever vários níveis de organização estrutural de uma proteína totalmente dobrada, não se deve inferir erroneamente que a sequência ordenada no tempo para dobrar a proteína passa sucessivamente por sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.[25] De fato, locais dentro de muitas proteínas, sem dúvida, atingem seu arranjo quase dobrável muito antes de sua cadeia polipeptídica alongada ser liberada pelos ribossomos que os produzem. Em vez disso, o esquema proposto por Linderstroëm-Lang e Schellman pretende ajudar-nos a considerar as

amplas características estruturais das enzimas, em vez de um conjunto desconcertante de voltas, reviravoltas e dobras. [26]

1.5.1.1 Estrutura primária

O nível mais simples da estrutura da proteína lida com a sequência linear de aminoácidos a unidos por ligações amida covalentes de uma cadeia polipeptídica⁷. A estrutura primária é codificada como a sequência desoxirribonucleotídica linear do DNA, mediada por sua transcrição nas sequências ribonucleotídicas do RNA mensageiro (ou mRNA), o último direcionando a síntese de polipeptídeos nos ribossomos. Transcrição e tradução são necessariamente processos de alta fidelidade, caracterizados por taxas de erro extremamente baixas associadas às atividades de edição da RNA polimerase, aminoacil-tRNA ligase e ribossomos. [27, 26][28]

Figura 7 – Estrutura primária demonstrando a sequência de aminoácidos e a ligação peptídica entre eles.



<https://content.byui.edu/file/a236934c-3c60-4fe9-90aa-d343b3e3a640/1/module3/readings/proteins.html>

As sequências de DNA não especificam completamente as estruturas proteicas finais, que também são determinadas por splicing alternativo ou por reações de modificação covalente pós-tradução. O *splicing* permite um repertório de sequências de proteínas alternativas, incluindo ou excluindo seletivamente as informações contidas nas sequências de DNA (exons) que codificam sequências polipeptídicas que são separadas umas das outras por sequências de DNA reguladoras e não codificadoras

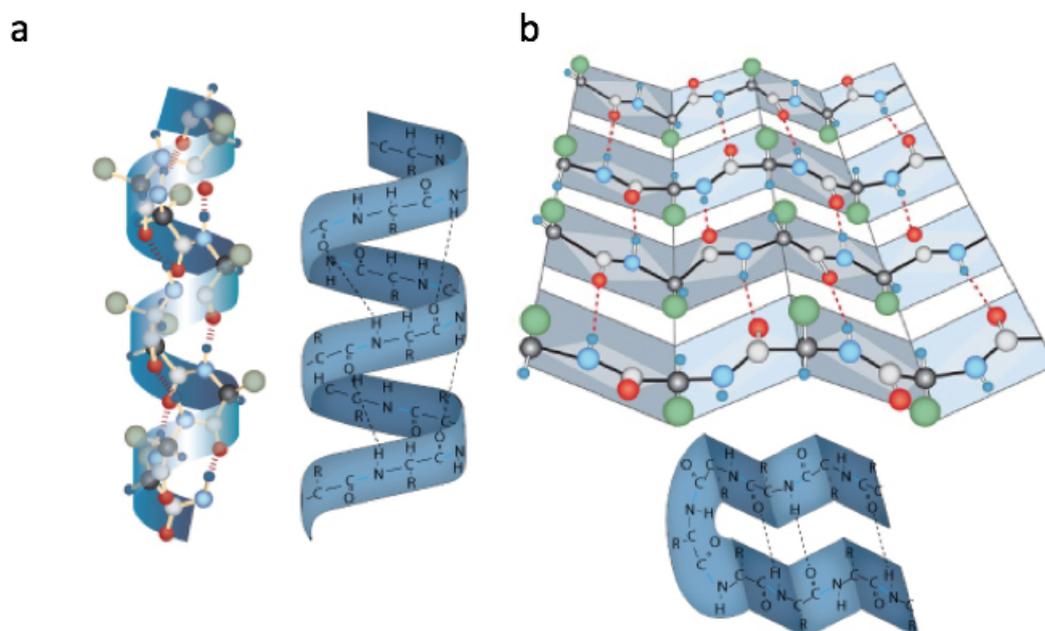
(íntrons). Alguns argumentaram que a estrutura primária de uma proteína também deve incluir modificações covalentes pós-traducionais.[27, 26][28]

Isso faz sentido para o processamento proteolítico de enzimas, porque a sequência de aminoácidos é alterada. Outras reações incluem fosforilação, nucleotidilação, acilação, glicosilação, ADP-ribosilação, hidrólise de ligação peptídica, etc.). A ubiquitinação é uma reação pós-tradução especializada que incorpora um pequeno polipeptídeo de 76 resíduos (ubiquitina) em proteínas mal dobradas ou desnaturadas para direcioná-las para os proteossomos onde são proteolisados.[28]

Com o tempo, a sequência de aminoácidos biologicamente especificada de algumas proteínas pode sofrer alterações como consequência de reações não enzimáticas. As reações não enzimáticas incluem racemização de resíduos de L-aspartil, transferência de cadeias polipeptídicas para grupos serina-hidroxila nos chamados desvios N-O-O-acil, oxidação e peroxidação de polipeptídeos, etc.[28]

1.5.1.2 **Estrutura Secundária**

Esse nível de estrutura proteica refere-se a qualquer estrutura de chapa helicoidal (alfa-hélice)8a ou plissada (folha-beta)8b , que maximiza a ligações de hidrogênio interamida dentro de redes na alfa-hélice, beta-folha e estruturas especializadas, como 3,10- hélice dos trechos poli-L-prolina e a hélice tripla do colágeno. Essas interações ajudam a excluir moléculas de água do interior da maioria das proteínas e portanto, contribuem apenas modestamente para a estabilidade estrutural geral de uma proteína. A a-helix também possui um momento dipolo geral significativo que, em alguns casos, desempenha um papel significativo na ligação ao substrato e / ou coenzima. [29]

Figura 8 – a) Estrutura alfa-hélice b) Estrutura de Folha-beta.

<https://content.byui.edu/file/a236934c-3c60-4fe9-90aa-d343b3e3a640/1/module3/readings/proteins.html>

1.5.1.3 **Estrutura terciária**

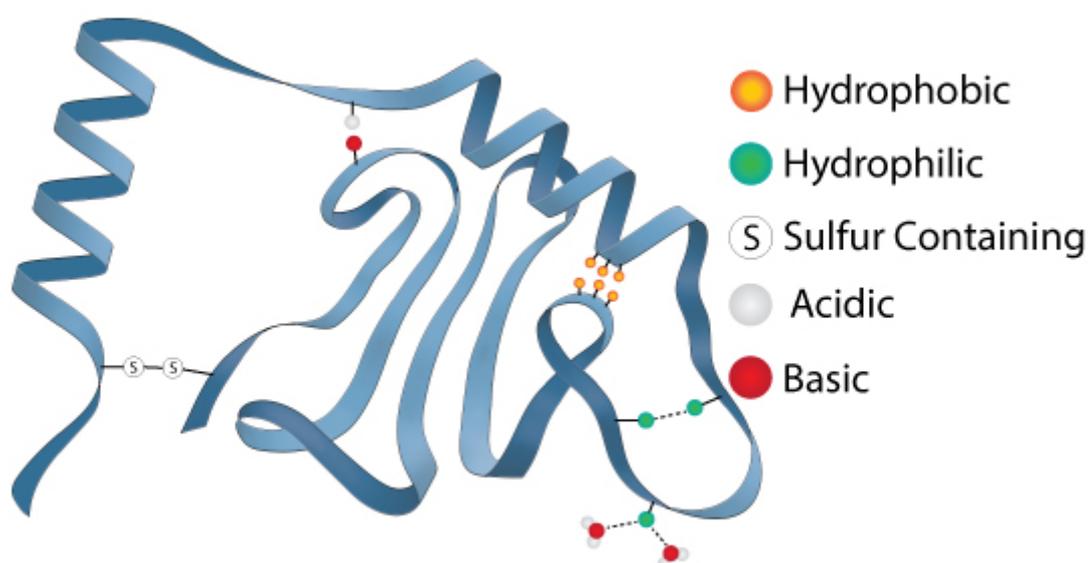
Este nível de estrutura proteica descreve as posições tridimensionais detalhadas dos átomos de proteína em uma proteína totalmente dobrada, incluindo: (a) o caminho tortuoso seguido por uma cadeia polipeptídica na estrutura dobrada; (b) quaisquer regiões compactas localmente dobradas (ou domínios); e (c) a posição de todos os grupos de cadeias laterais. Estruturas terciárias refletem a tendência de grupos polares e carregados de se situarem na ou perto da superfície, onde podem se ligar a grupos funcionais carregados de maneira oposta ou a moléculas de água. Da mesma forma, a estrutura terciária das proteínas globulares explica como os grupos apolares são enterrados, geralmente em suas conformações estáveis estendidas⁹. [28]

Constituindo quase metade dos átomos nas enzimas proteicas, os átomos de hidrogênio contribuem para o complexo cenário energético que determina a estabilidade da enzima, o reconhecimento do substrato e a catálise. Os átomos de hidrogênio ligados covalentemente contribuem fortemente para as interações hidrofóbicas e van der Waals, enquanto os hidrogênios ionizáveis refletem a força das interações ácido / base e das ligações de hidrogênio. Como é especialmente evidente na espectroscopia de RMN, as posições de hidrogênio nas ligações não polarizadas (ligações C-H) fora do centro ativo também fornecem informações valiosas sobre a dinâmica das proteínas. Embora outros átomos (por exemplo, C, O, N, S e P), bem como a maioria dos íons metálicos, possam

ser inequivocamente estabelecidos por difração de raios-X, os átomos de hidrogênio são muito pequenos e apenas difratam fracamente os raios-X incidentes. Portanto, as posições dos átomos de hidrogênio são difíceis de determinar apenas pelos raios X, exceto quando a resolução no nível atômico ($<1,2 \text{ \AA}$) pode ser alcançada. Embora as abordagens computacionais de minimização de energia representem uma maneira poderosa de inferir as posições mais prováveis de hidrogênio de proteínas, a difração de nêutrons se tornou um método de escolha para posições diretamente de átomos de hidrogênio e seus deslocamentos médios quadrados. [22]

Finalmente, a estrutura terciária da proteína é determinada principalmente pela sequência da cadeia polipeptídica, através da qual as interações locais da cadeia lateral guiam o dobramento local, que por sua vez determina interações de longo alcance. Em alguns casos, substratos, coenzimas, íons metálicos e modificações pós-traducionais também influenciam a estrutura tridimensional final e, como era de se esperar, o pH é um fator poderoso que afeta a estabilidade das estruturas terciárias das proteínas. [30]

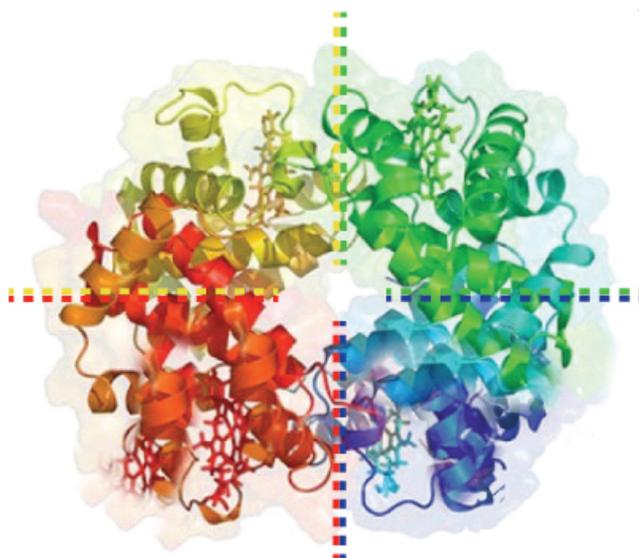
Figura 9 – Estrutura terciária, representando as principais interações que tem entre as estruturas secundárias, indicadas por interações hidrofóbicas, hidrofílicas, sulfídicas, ácidas e básicas, respectivamente.



1.5.1.4 **Estrutura quaternária**

Embora as enzimas sejam frequentemente monoméricas, muitas são montadas de uma ou mais cadeias polipeptídicas que podem ou não ser idênticas. Como as proteínas contêm exclusivamente L-aminoácidos assimétricos, não pode haver pontos ou planos de simetria dentro das cadeias polipeptídicas, não importa como elas sejam dobradas.[25] Por esse motivo, as proteínas de várias subunidades são organizadas de maneira a permitir que as subunidades interajam: (a) pelas interações cabeça a cauda; (b) através de eixos rotacionais de simetria; ou (c) por alguma combinação de (a) e (b)10. Um subconjunto significativo dessas enzimas (talvez ~ 15% de todas as enzimas) pode se dissociar e se associar reversivelmente em resposta a um efector metabólico (isto é, um ligante de ocorrência natural que se liga a um local regulador estereoquimicamente definido). Essa mudança no conjunto das subunidades geralmente é acompanhada por uma mudança na atividade enzimática, proporcionando assim um mecanismo de regulação. [22]

Figura 10 – Integração de cadeias polipeptídicas, representando um estrutura proteica quaternária, constituída por quatro cadeias simétricas, separadas por quatro linhas tracejadas.



<https://content.byui.edu/file/a236934c-3c60-4fe9-90aa-d343b3e3a640/1/module3/readings/proteins.html>

Devido a essa especificidade, as enzimas geralmente foram nomeadas adicionando o sufixo “-ase” ao nome do substrato (como na urease, que catalisa a decomposição da ureia). Nem todas as enzimas foram nomeadas dessa maneira, entretanto,

e para sanar a confusão envolvendo a nomenclatura das enzimas, um sistema de classificação foi desenvolvido com base no tipo de reação que a enzima catalisa. [31]

Existem seis categorias principais e suas reações: oxidorreduções, que estão envolvidas na transferência de elétrons; transferases, que transferem um grupo químico de uma substância para outra; hidrolases, que clivam o substrato pela captação de uma molécula de água (hidrólise) liases, que formam ligações duplas pela adição ou remoção de um grupo químico; isomerases, que transferem um grupo dentro de uma molécula para formar um isômero; e ligases, ou sintetases, que acoplam a formação de várias ligações químicas à quebra de uma ligação de pirofosfato em trifosfato de adenosina ou um nucleotídeo semelhante.[12, 26]

As enzimas são eficientes catalisadores naturais, oferecendo muitas vezes processos mais competitivos em comparação com os catalisadores químicos. Na maioria das reações químicas, existe uma barreira de energia que deve ser superada para que a reação ocorra.[32] Essa barreira impede que moléculas complexas, como proteínas e ácidos nucleicos, se degradem espontaneamente e, portanto, é necessário para a preservação da vida. Quando as alterações metabólicas são necessárias em uma célula, no entanto, algumas dessas moléculas complexas devem ser quebradas, e essa barreira de energia deve ser superada. O calor poderia fornecer a energia adicional necessária (chamada energia de ativação), mas o aumento da temperatura mataria a célula.[32] A alternativa é diminuir o nível de energia de ativação através do uso de um catalisador. Este é o papel que as enzimas desempenham. Eles reagem com o substrato para formar um complexo intermediário - um “estado de transição” - que requer menos energia para a reação prosseguir. O composto intermediário instável decompõe-se rapidamente para formar produtos de reação, e a enzima inalterada fica livre para reagir com outras moléculas de substrato. [31]

Por serem catalisadoras, uma enzima traz a reação catalisada para sua posição de equilíbrio com uma velocidade maior do que ocorreria de outra forma; uma enzima não pode desencadear uma reação com uma mudança desfavorável na energia livre, a menos que essa reação possa ser acoplada a uma cuja mudança de energia livre seja mais favorável. Essa situação não é incomum nos sistemas biológicos, mas o verdadeiro papel das enzimas envolvidas não deve ser confundido. [26]

As atividades das enzimas são reconhecidas há milhares de anos; a fermentação de açúcar em álcool por levedura está entre os primeiros exemplos de um processo biotecnológico.[31]

O químico sueco Berzelius (1779-1848) propôs o nome catálise (do grego kata, totalmente e lyein, para afrouxar) em 1836. Quando Berzelius invocou o termo “catálise” pela primeira vez, ele não fez nenhuma distinção entre a catálise química e catálise em (ou por) sistemas biológicos. Ele usou um termo genérico “substância de contato” para um catalisador. A origem da palavra “enzima” dedicada aos catalisadores biológicos tem uma história complicada. Grande parte desse drama foi encenada durante um

vigoroso debate sobre se existe força especial (a “força vital”) associada a reações que ocorrem em sistemas vivos. Desde que Payen e Persoz (1833) introduziram esse nome para a atividade hidrolítica do amido, a “diastase” tem sido frequentemente usada para significar geralmente um catalisador de origem biológica. De fato, Victor Henri em seu livro *Enzyme: Conceptual Origin* 1903, sobre cinética enzimática (um clássico antigo sobre ação enzimática) usou diastase para significar uma “enzima”. Muitos outros cientistas franceses, incluindo Pierre Duclaux e Gabriel Bertrand, usaram a diastase para significar o que agora chamamos de enzimas. O sufixo “ase” - resultante da diástase - foi subsequentemente recomendado para todos os nomes de enzimas (por Duclaux em 1898).[27]

Outro termo amplamente utilizado na enzimologia é a palavra “fermento”, sendo o termo utilizado para descrever leveduras vivas e a ação de seu conteúdo celular. A extração de Berthelot de “fermento” (1860) a partir de células de levedura marca o início da ação de enzimas fora de uma célula viva. Primeiramente Berthelot fez um experimento demonstrando que o ácido succínico, possuía baixo rendimento para se inverter a sacarose em todas as condições semelhantes a uma fermentação. Dessa forma ele passou a conduzir testes com levedura cervejeira, e por meios de avaliações do comportamento óptico das soluções testadas. Ao continuar os estudos foram feitos procedimentos de dissolução, obtendo um material filtrado proveniente das leveduras, obtendo com isso um solução que se performava com maior eficiência a conversão da sacarose. Com isso se tem uns dos primeiros processos de isolamento de enzimas, que no caso era a invertase. [33] [34]

Isso também afetou o pensamento vitalista da bioquímica. A analogia entre a hidrólise do amido catalisada por fermentação e catalisada por ácido foi bem reconhecida pelas sucessivas contribuições de Kirchhoff, Payen e Persoz e Berzelius. Schwann havia usado uma analogia semelhante para a pepsina. Willy Kuhne, em 1867, estendeu isso ainda mais à digestão pancreática de proteínas e chamou essa atividade de tripsina em 1877. O significado essencial de “fermento” foi consolidado por Kuhne; posteriormente, a palavra enzima (em levedura) foi usada pela primeira vez por ele em 1877. De fato, a tripsina foi o primeiro candidato a “fermentar” a ser chamado de enzima. A evolução e aceitação da palavra enzima levaram um tempo. Ambas as descrições - “diástase” (principalmente na literatura científica francesa) e “fermento” - foram usadas ocasionalmente até o início do século XX. A teoria vitalista foi firmemente estabelecida para apoiar a demonstração conclusiva de Eduard Buchner de que extrato adequado de células de levedura poderia converter sacarose em álcool. Isso foi revolucionário em 1897, pois a fermentação foi mostrada “sem fermento vivo” pela primeira vez. A atividade foi atribuída a uma única substância denominada “zymase” (e alcoholase por Emile Roux).[34] Agora é histórico que essa atividade de fato represente toda a sequência glicolítica das reações. Fora da controvérsia sobre a natureza da fermentação alcoólica, nasceu a palavra “enzima”. Esta palavra nos lembra

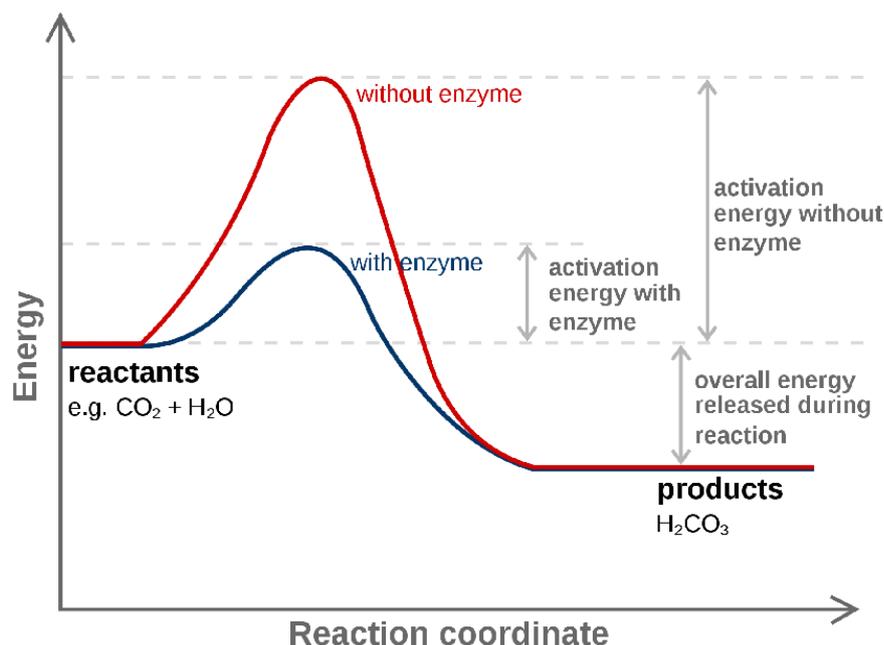
que o fermento (“zyme”) e suas atividades foram resolvidas através dos prismas da biologia e da química para criar o rico domínio da enzimologia. [27]

Como declarado por Silverman, “as enzimas são químicos orgânicos altamente eficientes”. Durante muitas décadas, os enzimologistas coletaram dados sobre diferentes aspectos da química das enzimas e relataram seus achados na literatura primária: reações bioquímicas, uso de cofatores, dados cinéticos e interpretações mecanicistas. [35]

No entanto, apenas recentemente as propriedades das enzimas foram bem compreendidas. De fato, a pesquisa sobre enzimas entrou agora em uma nova fase com a fusão de ideias da química de proteínas, biofísica molecular e biologia molecular. Com a ajuda de estudos estruturais, os pesquisadores revelaram que a catálise enzimática ocorre em um bolso enterrado dentro da estrutura da enzima conhecida como o sítio ativo. Evidências experimentais da cristalografia de raios-X sugeriram um modelo para explicar como esse processo ocorre: a enzima e os substratos inicialmente formam um complexo no sítio ativo que pode induzir grandes mudanças conformacionais em suas estruturas. Primeiro sugerido por Linus Pauling, a ligação do substrato é seguida pela estabilização do estado de transição. [35]

As enzimas diminuem a energia de ativação da reação porque são complementares em forma e propriedades eletrostáticas ao estado de transição limitante da taxa, o que explica a aceleração da taxa em comparação com as reações não-catalisadas (Figura 11). Um ou mais intermediários de reação são gerados, que então se transformam em produtos e são finalmente liberados do sítio ativo. [26]

Figura 11 – Ilustração descrevendo e redução da energia de ativação mediada pelas enzimas



<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1407225>

A especificidade, no nível molecular, é a marca registrada da maioria das interações biológicas.[28] Moléculas como receptores e anticorpos interagem especificamente com suas contrapartes cognatas.[36] Mas a discriminação ao realizar a catálise é de suma importância para a biologia e é exclusiva das enzimas! A especificidade é uma virtude quando duas reações semelhantes devem ser mantidas separadas, às vezes no mesmo compartimento. A maioria das reações biossintéticas são catalisadas pelo NADP + que requer enzimas, enquanto as reações catabólicas usam o NAD +. Por exemplo, são conhecidas glutamato desidrogenases (GDHs) com duas especificidades distintas para o nucleotídeo da piridina - o NADPGDH biossintético (EC 1.4.1.4) e o NAD-GDH catabólico (EC 1.4.1.2). [37]

Um aspecto interessante da especificidade é a interação seletiva do componente polipeptídico com seu cofator cognato. Cada apoenzima fornece um ambiente químico único ao cofator, modulando assim sua reatividade. Por exemplo, o potencial redox para a redução de dois elétrons do FAD livre é de cerca de 200 mV. Este valor medido para flavoenzimas varia de 450 mV a +150 mV. O potencial redox da flavina é assim ajustado no local ativo. O meio da proteína catalítica consegue isso (a) colocando carga positiva adequada (aumenta o potencial redox) ou carga negativa (diminui o potencial redox) e (b) possivelmente forçando o FAD (sistema de anel isoalloxazina tricíclico) a adotar uma conformação plana ou não plana. [38]

Outros exemplos de ajuste fino das propriedades químicas incluem cofatores como íons metálicos e heme. A reatividade do cofator heme comum (protoporfirina

de ferro IX) é modulada e ajustada para funções biológicas específicas por ligação covalente, ligação axial, ligação de hidrogênio e distorção da planaridade imposta por diferentes ambientes proteicos. Citocromos de vários potenciais redox (participando do transporte enzimático de elétrons) são uma manifestação desse ajuste fino proposital por natureza.[39] As proteínas enzimáticas controlam a reatividade do íon metálico do local ativo, fornecendo seletivamente o número e a natureza dos ligantes coordenadores. [27]

O número de aplicações industriais das enzimas cresceu muito nos últimos anos, devido principalmente aos avanços na biotecnologia que permitiram a obtenção de processos eficientes e estáveis e ao apelo ecológico e ambiental. Os processos enzimáticos são considerados sustentáveis (com utilização de recursos renováveis e de tecnologia limpa). Os processos industriais que utilizam enzimas geralmente implicam em danos mínimos ao meio ambiente e em condições quase isentas de subprodutos indesejáveis (diminuem a geração de resíduos)[40]

1.6 *Aspergillus oryzae* e classificação GRAS

Enzimas microbianas são aplicadas na indústria de alimentos[41], em sabão em pó e detergentes[42], na fabricação de papel e tecidos[43], em sínteses orgânicas[44] e diagnósticos[45]. Apesar das enzimas industriais de origem microbiana serem produzidas, principalmente por fermentação submersa (FSm), a fermentação no estado sólido (FES) representa um método tradicional e favorável em alguns países. A fermentação no estado sólido é cada vez mais, considerada como uma alternativa da fermentação submersa para a produção de enzimas para aplicações industriais e em aplicações agrobiotecnológicas, pois requerem baixa tecnologia e maior economia de processo quando comparada ao processo de fermentação submersa.[46] [Pandey et al.]

As enzimas utilizadas para a hidrólise do amido (amilases ou enzimas amilolíticas) têm recebido uma grande atenção por causa de sua importância tecnológica e benefícios econômicos. Existem vários tipos de amilases, sendo as mais usadas na indústria: α -amilases, β -amilases e glicoamilases.[46]

Dentre as amilases existentes naturalmente, as amilases fúngicas obtidas a partir de *Aspergillus oryzae* (Figura 12 e *Aspergillus niger* são fontes microbianas mais adequadas devido à sua classificação, GRAS (generally recognized as safe ou geralmente considerado como seguro para uso em alimentos). Fatores como a tolerância à baixa atividade da água e condições de elevada pressão osmótica tornam os fungos filamentosos mais eficientes que as bactérias para o crescimento e a produção de enzimas em substratos sólidos umedecidos, e assim, esse método tem atraído atenção crescente como fonte de produção de enzimas amilolíticas adequadas para diversas aplicações industriais. [47]

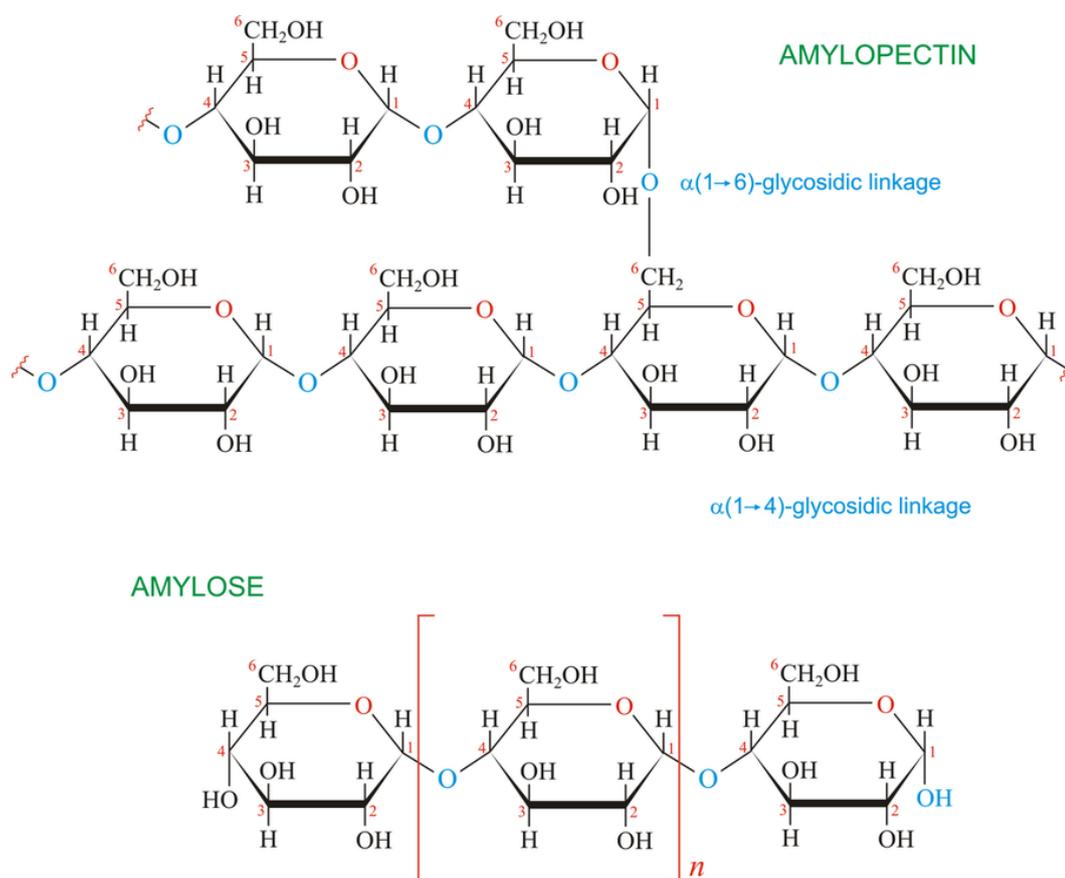
Figura 12 – *Aspergillus oryzae* crescido no meio BD mostrando sua característica mais marcante que é sua coloração branca



<http://2018.igem.org/Team:DTU-Denmark/Results-choosing-organism>

As α -amilases (endo-1,4- α -D glucano gluco-hidrolase, EC 3.2.1.1) são enzimas que clivam aleatoriamente as ligações 1,4- α entre as unidades de glicose da cadeia linear do amido (amilose), liberando açúcares de vários tamanhos para o meio reacional. As β -amilases (exo- β -1,4-glucano malto-hidrolase, EC 3.2.1.2) são enzimas que clivam as extremidades não redutoras da amilose e da amilopectina do amido, liberando unidades de maltose para o meio reacional. [48] Essas duas enzimas não atuam nas ligações 1,6- α -glicosídicas do amido e, portanto não podem hidrolisar completamente a molécula de amido a unidades de glicose. [49] A glicoamilase ou amiloglicosidase (exo-1,4- α -D-glucano glucano-hidrolase, EC 3.1.2.3) hidrolisa tanto as ligações 1,4- α -glicosídicas quanto às ligações 1,6- α -glicosídicas do amido, liberando unidades de glicose a partir das extremidades não redutoras da amilose e da amilopectina do amido (Figura 13). [47]

Figura 13 – Sítios de ação de atividade enzimática indicadas nas ligações α -1,4, presentes entre uma glicose e outra, e ligações α -1,6 entre as cadeias de amilose, constituindo uma cadeia de amilopectina



<https://starchhydrolysis.weebly.com/starch.html>

As amilases podem ser obtidas de várias fontes, como plantas, animais e microrganismos, mas as fontes microbianas geralmente são as que mais atendem às demandas industriais. Através da biotecnologia existe a possibilidade de aumentar a produção das enzimas microbianas com o uso de técnicas como melhoramento genético das cepas microbianas e otimização das condições do processo para indução de maior produção das enzimas de interesse. [47]

Amilases são enzimas relevantes para seu uso específico na conversão de amido em açúcar. As enzimas amilolíticas atuam no amido e oligo e polissacarídeos relacionados. A pesquisa global sobre enzimas hidrolisantes de amido com base na sequência de DNA, análise estrutural e mecanismo catalítico levou ao conceito de uma família de enzimas – glicosil hidrolases. As enzimas amilolíticas e relacionadas foram classificadas como hidrolases glicosídicas. As enzimas têm sido produzidas por uma ampla gama de microrganismos e classificadas exo-, endo-[50], des-ramificantes[51] e produtoras de ciclodextrinas[52]. A aplicação destas enzimas tem sido utilizada na liquefação de amido, papel, alimentos, açúcar e indústrias farmacêuticas. Em alimentos, as enzimas amilolíticas industriais têm uma larga escala de aplicações, como a produção de xaropes de glicose, xaropes de milho com alto teor de frutose, xarope de

maltose, redução da viscosidade dos xaropes de turvação para produzir suco de fruta, clarificando dando maior prazo de validade, solubilização e sacarificação do amido na indústria cervejeira. A indústria de panificação utiliza amilases para retardar o endurecimento do pão e outros produtos assados; a indústria de papel faz a utilização de tais enzimas, para a redução da viscosidade do amido para obter a cobertura apropriada de papel. Amilases também tem seu uso na indústria têxtil para processo de tecelagem de fibras têxteis e utilizadas como auxiliar de digestão na indústria farmacêutica. [30]

As α -amilases e enzimas amilolíticas relacionadas estão entre as enzimas mais importantes e de grande importância na biotecnologia atual. Podem ser potencialmente úteis na química semi-sintética para a formação de oligossacarídeos por transglicosilação.

Tradicionalmente, a hidrólise do amido foi realizada usando ácido e altas temperaturas. A hidrólise enzimática do amido substituiu agora a hidrólise ácida em mais de 75% dos processos de hidrólise do amido devido a muitas vantagens, e não menos importante aos seus rendimentos mais elevados. A hidrólise do amido dá origem a pequenos maltooligosacarídeos e glicose. A composição de sacarídeos obtida após a hidrólise do amido é altamente dependente do efeito da temperatura, das condições de hidrólise e da origem da enzima. Especificidade, termoestabilidade e resposta de pH das enzimas são propriedades críticas para uso industrial. [53]

As enzimas em seu estado natural são usualmente instáveis. Como biocatalizadoras e precisam de modificações para seu uso industrial. A produção de cepas que são mortificadas por manipulação genética, para ganhar propriedades [22]

1.7 Imobilização enzimática

A principal demanda atual da indústria biotecnológica é o aumento da produtividade enzimática e desenvolvimento de novas técnicas para aumentar sua estabilidade. [54] Estes requisitos são fundamentais para viabilizar o uso de biocatalisadores em larga escala.

A imobilização enzimática pode ser uma excelente técnica para aumentar a estabilidade enzimática e possibilitar o seu reuso, gerando uma economia no processo. As forças motrizes para a imobilização enzimática são a melhoria da estabilidade enzimática, o aumento da carga enzimática e a simplificação da reciclagem do biocatalisador. [55]

O termo “enzimas imobilizadas” refere-se a “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser usadas repetida e continuamente.”[55] Além de um manuseio mais conveniente da enzima, também simplifica substancialmente a manipulação com o biocatalisador e o controle do processo de reação, enquanto aumenta a estabilidade da enzima sob ambas as condições de armazenamento e operação.[56] A imobilização

proporciona uma fácil separação da enzima do produto, e, portanto, a contaminação proteica do produto é minimizada ou evitada.[57] Além da fácil separação da enzima da mistura de reação, a imobilização enzimática também reduz notavelmente o custo da enzima e dos produtos enzimáticos.[58] A insolubilização da enzima por ligação a uma matriz também confere vários benefícios adicionais, tais como parada rápida da reação pela remoção da enzima da solução de reação e melhora da estabilidade da enzima contra temperatura, solventes, pH, contaminantes e impurezas. [59]

As características da matriz do suporte enzimático a ser selecionado para a imobilização são de suma importância na determinação do desempenho do sistema enzimático imobilizado. As propriedades ideais de suporte incluem resistência física à compressão, hidrofília,[60] inércia para enzimas, facilidade de derivação, biocompatibilidade,[61] resistência a ataque microbiano e disponibilidade a baixo custo.[56]

A maioria das enzimas naturais isoladas é solúvel em água. Tais proteínas não podem ser armazenados em solução tampão ou água por muito tempo, geralmente devido à instabilidade.[62] A imobilização é uma maneira de melhorar sua vida útil.[63] Além do mais, enzimas imobilizadas são fáceis de recuperação, garantido também reuso .[64] Tais considerações são importantes quando o custo da enzima é muito alto. As características das matrizes são muito críticas na determinação do desempenho dos sistemas enzimáticos. Esses suportes podem ser inorgânicos ou orgânicos de acordo com a natureza de sua composição química. As características físicas, como tamanho médio de partícula, comportamento de *swelling*, resistência mecânica, etc. decidem as condições técnicas em que o sistema é usado.[60] As enzimas podem ser colocadas em longos períodos na matriz irreversivelmente (por ligação covalente, aprisionamento, microencapsulação, reticulação etc.) ou reversivelmente (por adsorção, ligação iônica, ligação por afinidade, ligações dissulfeto ou quelato / ligação de metal). O custo associado ao processo de imobilização determina se é economicamente viável fazê-lo. Diferentes meios são adotados para a imobilização enzimática na prática, e apenas uns poucos estão bem caracterizados, demonstrando seu potencial dentro da indústria biotecnológica. O campo da tecnologia de imobilização enzimática e suas aplicações cresceram muito ao longo dos anos. [65]

A ampla utilização de biocatalisadores nas indústrias se deve ao fato de serem altamente específico, ambientalmente correto e pode ser produzido facilmente. Como biocatalisadores, enzimas pode acelerar várias reações químicas e bioquímicas em plantas, animais e bactérias.[22, 24] As enzimas, no entanto, apresentam certa incorrigibilidade de suas propriedades, que limitaram seus usos em processos práticos. As questões incluem estreitas faixa de pH[66], atividade do ambiente aquoso[67], baixa estabilidade térmica[68] e perda de atividade após um ciclo de reações[64]. Usar enzimas com todo o seu potencial para várias conversões, é um grande desafio, e apresenta-se como um dos meios de viabilizar os processos enzimáticos. Assim, o conceito de

enzimas imobilizadas, que foi introduzida no início do século 20, é aparentemente o mais utilizado atualmente. [69]

A escolha do método de imobilização depende do tipo de enzima e da natureza das aplicações em questão. Confinamento não covalente (como aprisionamento físico, métodos de microencapsulação ou adsorção eletrostática) às vezes podem levar a lixiviação enzimática durante a operação.[60] Ancoragem covalente de enzimas requer reagentes de reticulação bifuncional e grupos funcionais adequados a superfície da enzima, e/ou suporte. Esses grupos funcionais não devem ser críticos para a atividade enzimática. Contudo uma grande quantidade de reações químicas e bioquímicas sofisticadas se desenvolveram para ativar polímeros orgânicos e inorgânicos inertes para posterior imobilização enzimática.

A penicilina acilase ligada covalentemente foi altamente eficaz preparação de 6-APA (Ácido 6-aminopenicilânico) tornou possível alto um aproveitamento do processo de hidrólise dos grupamentos amida, presentes na penicilina.[70] A penicilina acilase imobilizadas em cassetes funcionam com > 99% de eficiência de conversão mesmo após 1500 ciclos de uso. Para se imobilizar outro tipo de enzima, o glutaraldeído é usado para fazer o processo de *cross-linking* da glicose isomerase, o material reticulado pode ser reutilizado várias vezes no processo para produção de xaropes de frutose a partir de glicose.[71] Analogamente, a protease presente em detergentes agem como alérgenos, e esse problema pode ser revertido através da microencapsulação; as preparações sem protease isenta de seus resíduos no produto final, reduziram esse risco.[65]

A matriz ou suporte ideal deve ter as seguintes propriedades: (i) ser econômica, (ii) inércia, (iii) estabilidade, (iv) força física, (v) capacidade de aumentar a especificidade enzimática / (vi) regenerabilidade, (vii) capacidade de reduzir a inibição do produto, e (viii) capacidade de prevenir adsorção inespecífica e contaminação bacteriana. A maioria das matrizes possui apenas algumas das propriedades; portanto, a seleção da matriz carreadora para imobilização enzimática deve ser escolhida com base nas propriedades e limitações das matrizes. [72]

O processo imobilização produz operações econômicas contínuas, automação, alta relação investimento / capacidade e recuperação de produto com maior pureza. Existem diferentes métodos de imobilização enzimática e vários fatores afetam o desempenho das enzimas imobilizadas. Os diferentes métodos de imobilização enzimática são agrupados da seguintes formas e Método de adsorção / ligação ao fraco suporte. Ligação covalente / reticulação; Método de aprisionamento ou entrapment; Confinamento por membrana.[73]

Os suportes podem ser classificados como inorgânicos e orgânicos de acordo com sua composição química. Os suportes orgânicos podem ser subdivididos em polímeros naturais e sintéticos.[74]

Vários polímeros de origem natural e sintética foram utilizados para uma variedade de aplicações biomédicas[45], incluindo preparações farmacêuticas[75], direcionamento de medicamentos [12], administração de medicamentos [76], próteses e estruturas de engenharia de tecidos. [77]Devido às suas características reproduzíveis em termos de peso molecular, degradação e propriedades mecânicas, os polímeros sintéticos são atraentes para uma variedade das aplicações mencionadas acima. No entanto, polímeros sintéticos do ponto de vista biológico, polímeros sintéticos geralmente carecem de bioatividade e biocompatibilidade muito desejadas, o que pode se traduzir em efeitos colaterais adversos. Por outro lado, os polímeros naturais são abundantes e se assemelham aos componentes presentes nas matrizes extracelulares biológicas. Assim, polímeros naturais são facilmente aceitos pelo organismo e possuem alta bioatividade e biocompatibilidade. Os polímeros naturais podem ser divididos em três classes principais de acordo com sua estrutura química: (i) polissacarídeos, (ii) proteínas e (iii) poliésteres. Ênfase particular nos últimos anos foi dada aos polissacarídeos como (i) ácido hialurônico (HA), (ii) sulfato de condroitina, (iii) quitina e quitosana, (iv) alginatos,(v) celulose e suas mais diversas modificações. Esses polímeros e seus derivados também apresentam-se no contexto de suas propriedades químicas e biológicas, aplicações no campo da enzimologia.[72]Os polissacarídeos em sua forma nativa podem não ser capazes de fornecer todas as propriedades desejadas para uma aplicação biomédica específica. [78]

Sabe-se que algumas das características estruturais dos polissacarídeos e seus derivados, como grau de substituição (DS) e peso molecular etc., governam amplamente suas propriedades, como solubilidade, atividades fisiológicas, reatividade química e biodegradabilidade. Os polissacarídeos podem ser modificados fisicamente, quimicamente ou bioquimicamente. Em algumas modificações, os processos de polissacarídeos envolvem agentes reativos tóxicos ou produtos químicos para iniciar a reação (por exemplo, solventes, iniciadores, etc.). Portanto, é essencial remover esses agentes tóxicos por processo de purificação, a fim de garantir a regulamentação de segurança e a biocompatibilidade do produto final.

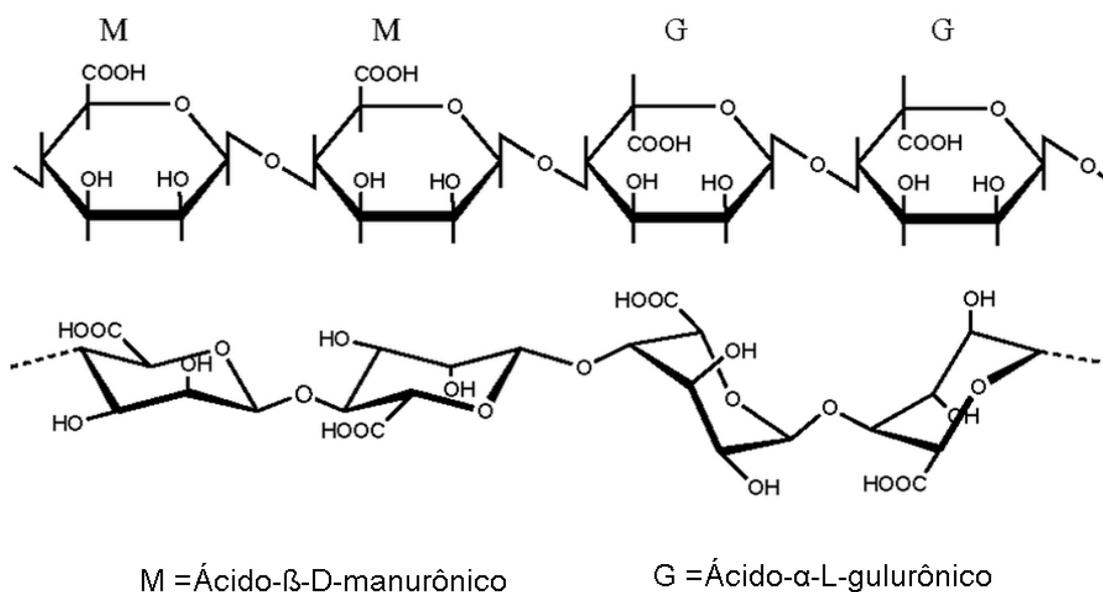
Esses polímeros são obtidos principalmente de plantas, animais e fontes microbianas que são novamente classificadas com base em sua química em polímeros à base de polissacarídeos, proteínas, poliéster e poliamidas. As pesquisas aprofundadas desses polímeros revelam que sua natureza maleável deve ser modificada para várias aplicações. Além disso, suas ligações químicas responsivas fornecem facilidade de biodegradabilidade, o que, por sua vez, os torna biocompatíveis. Suas características desejáveis de ampla abundância, biocompatibilidade e biodegradabilidade os tornam material potencial para vários usos. O fato do biopolímeros serem *ecofriendly*, trás a comunidade científica grandes interesses e empenho atraindo-os para a desenvolver um ampla gama de estudo com os polímeros naturais. Já foi descrito que tais polímeros podem ser obtidos de diferentes fontes, suas propriedades químicas, principais recur-

sos, aplicações e produtos comercializados de polímeros naturais que estão sendo explorados como materiais adaptáveis em áreas multifacetadas.[79]

1.8 Alginato

O alginato é um polissacarídeo derivado da alga marrom conhecida como Phaeophyceae, considerado um poliurônico ligado (1->4), contendo três tipos de estrutura de blocos: M bloco (ácido β -D-manurônico), bloco G (ácido poli α -L-gulurônico) e bloco MG (contendo ambos os ácidos poliurônicos)A composição estrutural é mostrada na Figura 14. Os monômeros do alginato são distribuídos em blocos de contínuos. [80]

Figura 14 – Estrutura molecular do Alginato



<https://www.semanticscholar.org/paper/3D-Cell-Culture-in-Alginate-Hydrogels-Andersen-Auk-Emblem/c4a6a7ed8970a66b1767081f7599fc48fbd1dc35>

Os alginatos são polissacarídeos não ramificados produzidos por algas e bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*. Basicamente, a estrutura dos alginatos consiste em dois resíduos de ácido urônico, incluindo o ácido β -D-manurônico (M). Ocorre nas formas filamentosas, granuladas, granulares ou em pó, de branco a marrom amarelado. Pode ser usado como estabilizador, espessante,

gelificante, emulsificante. Dissolve-se lentamente na água, formando uma solução viscosa; insolúvel em etanol e éter. [81]

Polieletrólitos naturais, como alginato que podem ser derivados de certos tipos de plantas e fontes animais, são alternativas viáveis aos polieletrólitos sintéticos ou alúmen. As vantagens desses polieletrólitos naturais sobre os sintéticos incluem segurança à saúde humana, biodegradabilidade e uma faixa de dose efetiva mais ampla de floculação para vários colóides suspensão. [82]

Atualmente existem várias substâncias de origem natural usadas como polieletrólitos, majoritariamente suas estruturas constituem-se de um precursor de polissacarídeos com propriedades aniônicas devido à presença de grupos carboxila. As principais vantagens dos polieletrólitos naturais, especialmente para seu uso no tratamento de água potável, é que, em geral, é o fato de que são praticamente atóxicos. Considerando a quantidade potencial disponível como recurso natural e reprodutibilidade do ácido algínico, ocorreu a pesquisadores e biotecnologistas que seria significativo o desenvolvimento de alginato como fonte de filmes biodegradáveis ou comestíveis. [77]

O alginato microbiano foi descoberto, mais de 80 anos depois, ao isolar e caracterizar parcialmente o exopolissacarídeo de uma cepa mucóide de *Pseudomonas aeruginosa* isolada do escarro de um paciente com fibrose cística. [83]

No ano de 1966 Gorin e Spencer demonstraram que o alginato acetilado também poderia ser produzido pela bactéria do solo *Azotobacter vinelandii*. [84] O termo algas refere-se a um conjunto grande e diversificado de organismos que contêm clorofila e realizam fotossíntese oxigênica. É importante notar que as algas marrons também são fototróficas oxigênicas, mas são eubactérias (bactérias verdadeiras) e, sendo assim, são evolutivamente distintas das algas. Embora a maioria das algas seja microscópica e, portanto, seja considerada microrganismo, várias formas são macroscópicas na morfologia. Essas formas coloniais de algas ocorrem como agregados de células. [85]

Por sua vez, cada uma dessas células compartilha funções e propriedades comuns, incluindo os produtos de armazenamento que utilizam, bem como as propriedades estruturais de suas paredes celulares. As algas marrons são uma importante assembléia de plantas classificadas em cerca de 265 gêneros com mais de 1500 espécies. Eles derivam sua cor característica das grandes quantidades de fucoxantina carotenóide (que produz uma cor marrom) contida em seus cloroplastos. Eles ocorrem principalmente no ambiente marinho, onde aparecem como um componente interno da parede celular das algas. Uma parede celular típica de algas marrons é representada na estrutura da parede celular das algas. [77]

O alginato é de interesse como um potencial filme biopolimérico, também podendo ser um componente de revestimento devido às suas propriedades coloidais, que incluem espessamento, estabilização, suspensão, formação de filme, produção de gel e estabilização de emulsão. É um carboidrato coloidal hidrofílico extraído com álcalis diluídos de várias espécies de algas marrons. Em termos moleculares, é uma família de

copolímeros binários não ramificados de resíduos de ácido β -D-manurônico 1-4 e ácido α -L-gulurônico de composição e estrutura seqüencial amplamente variadas. [83][86]O ácido algínico é o único polissacarídeo, que naturalmente contém grupos carboxila em cada resíduo constituinte e possui várias habilidades para materiais funcionais. A propriedade única e mais útil dos alginatos que é sua capacidade reagir com cátions metálicos polivalentes, especificamente íons cálcio para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis. [87]

Esses géis de alginato de cálcio são usados na indústria de processamento de alimentos para a produção de alimentos reestruturados, como produtos à base de carne, anéis de cebola, recheios de pimentão, caranguejos e bagas de coquetel, e na indústria de biotecnologia para a produção de contatos para imobilização de células ou enzimas. Devido à sua disponibilidade e reprodutibilidade, parecia significativo o desenvolvimento de ácido algínico como fonte de filmes biodegradáveis ou comestíveis. Embora os filmes comestíveis preparados a partir de hidrocolóides, como o alginato, constituam filmes de alta resistência, tendem a exibir baixa resistência à água devido à sua natureza hidrofílica. A capacidade do alginato de produzir géis fortes e insolúveis com íons cálcio foi utilizada para melhorar essas propriedades do alginato. No entanto, a formação de gel de alginato com íons cálcio é tão instantânea que evita vazamentos na água.[88]Atualmente, os alginatos comercialmente disponíveis são isolados de algas marinhas marrons. A descoberta de alginatos bacterianos, estrutura irregular dos polímeros, composta por ácido D-manurônico e ácido L-gulurônico, resultou em várias propostas que poderiam substituir os produtos de algas. [77]

Até o momento, as algas são os únicos e relativamente baratos produtores de alginato para todos os fins comerciais. Esses recursos naturais são principalmente algas marrons dos gêneros *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Ecklonia*, *Lessonia* e *Durvillaea*. A composição variável dos alginatos está ligada ao seu papel biológico natural para produtor. Portanto, as condições sazonais e de crescimento, bem como as condições geográficas e distribuição é crítica para determinar a composição de alginatos, bem como a percentagem de alginatos em várias partes das algas. [77]

O aprisionamento nas esferas do gel de alginato de cálcio tornou-se a técnica mais utilizada para imobilizar células vivas (algas, células animais, bactérias, cianobactérias, fungos, células vegetais e protoplastos, leveduras e enzimas). Os sistemas celulares imobilizados com alginato são usados como biocatalisadores em vários processos industriais, variando da produção de etanol por células de levedura, até a produção de anticorpos monoclonais a partir de células de hibridoma. O alginato também tem várias aplicações diversas, como em preparações farmacêuticas (para formar emulsões estáveis), em materiais dentários impressionáveis, no revestimento das raízes das árvores antes do plantio (para garantir um revestimento hidrofílico para as raízes durante o transporte do viveiro até o plantio local) e como adjuvante pesticida inerte no revestimento de frutas cítricas frescas. Todos os alginatos usados para fins

comerciais estão sendo produzidos atualmente pela colheita de algas marrons; e no mercado global, os preços de venda estão na faixa de US \$ 5 a 20 por kg para a maioria das aplicações. [89] Como os preços desses alginatos são geralmente baixos, parece ser uma tarefa difícil estabelecer um processo competitivo de produção bacteriana nessa faixa de preço. No entanto, devido às preocupações ambientais associadas à colheita e processamento de ervas daninhas do mar e à possibilidade de produzir alginato de alta qualidade, é provável que o alginato bacteriano também possa se tornar um produto comercial. [90]

É utilizado como gelificante, estabilizante e espessante, com ampla aplicação industrial. Apresenta as características de ser mucoadesivo, biodegradável e biocompatível. Todos esses fatores contribuem para a popularidade do uso deste polissacarídeo nos processos de imobilização enzimática. [91]

O alginato tem a capacidade de formar gel em baixas concentrações e é termoestável, podendo ser esterilizado. O gel é formado pela ligação cruzada dos íons, cátions divalentes, com os resíduos de ácido gulurônico adjacentes ao longo de sua cadeia. Geralmente as enzimas são homogeneizadas com a solução de sua solução polissacarídica e depois gotejadas em solução contendo cátions multivalentes tais como cálcio, bário, estrôncio ou alumínio. Por gelatinização, as esferas (*beads*) são instantaneamente formadas ao entrarem em contato com a solução catiônica, retendo as enzimas dentro da estrutura tridimensional do gel. [92]

1.9 Quitosana

Outro suporte que também tem sido bastante utilizado nos processos de imobilização é a quitosana. Definida como um polissacarídeo linear, constituída por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina. A quitosana, assim como o alginato, também possui as propriedades de ser biocompatível, biodegradável e não tóxica. [93] É de grande efeito e impacto, com diversas aplicações. A descoberta da quitosana remonta a 1859 por Rouget, quando ele fervia a quitina em hidróxido de potássio concentrado e o produto obtido apresentou comportamento de solubilidade em ácidos. A quitina natural é um precursor para a preparação de quitosana. A quitosana é um biopolímero linear composto de glucosamina e N-acetil glucosamina que pode ser isolado por desacetilação termo-química da quitina. [94]

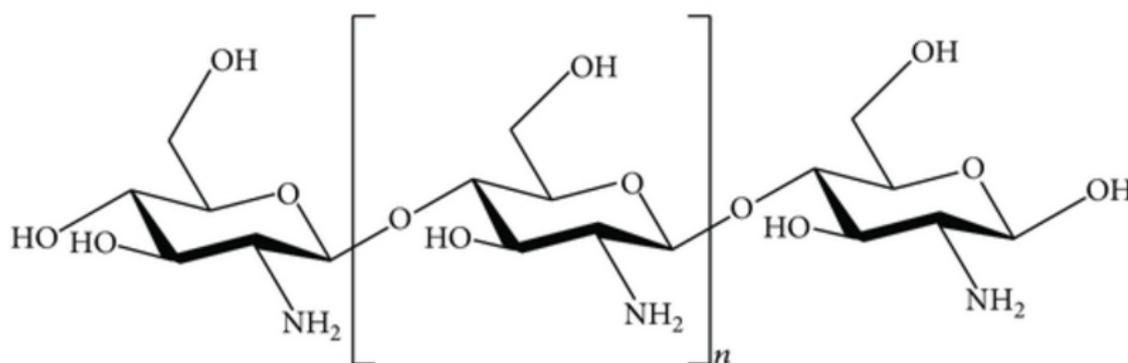
A quitosana é um biopolímero de polissacarídeo linear heterogêneo com alto peso. É derivado da desacetilação da quitina, que é uma extração de algumas espécies animais, especialmente do esqueleto de animais vivos do mar, como lagostins, lagostas, camarões, caranguejos e camarões. A forma mais comum de produto final do processo de produção de quitosana são os flocos de quitosana, que possuem propriedades únicas de adsorção em espécies como cátions e corantes metálicos. A outra forma de quitosana é a conta de quitosana. Através da reação de “inversão de fase”, a quitosana

dissolvida pode sofrer separação de fases devido à coagulação em meio aquoso para formar as esferas de quitosana. Pesquisas sobre biopolímeros, como a quitosana, estão em andamento, por ser um material abundante e renovável. A quitosana pode ser modificada para produzir tipos únicos de materiais adsorventes com propriedades físico-químicas ajustáveis. [95]

A desacetilação parcial da quitina produz quitosana, em que n indica o grau de polimerização. A quitosana é um polímero estável no ar e permanece inerte na maioria dos solventes. A quitosana sofre degradação em condições extremas, como ácidos concentrados que despolimerizam a quitosana. O pKa dos grupos amina protonada na quitosana está na região de pH 5,5 - 6,5, dependendo do grau de desacetilação. O peso molecular médio da quitosana pode variar de 1525.5g/mol, onde o processo de fabricação pode levar à degradação da quitosana quando condições de tratamento severas aplicadas. [93]

É um polímero com uma estrutura química de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose, enquanto CS, no entanto, é o derivado mais importante (um desacetilado de N) da quitina que contém frações variáveis dos dois resíduos¹² distribuídos aleatoriamente β -(1-4) D -glucosamina ligada (unidade desacetilada) e N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada)(Figura 15). A quitosana é obtida por desacetilação (parcial) da quitina no estado sólido sob condições alcalinas (isto é, NaOH concentrado) ou por hidrólise enzimática na presença de quitina desacetilase. [79]

Figura 15 – Estrutura molecular da Quitosana



https://www.researchgate.net/publication/236084986_Chitin_Chitosan_and_Glycated_Chitosan_Regu

A quitosana pode sofrer alterações físicas ou químicas em diferentes condições de pH. No pH valores abaixo de 3, ocorre despolimerização na quitosana por hidrólise. A quitosana se dissolve em soluções aquosas ácidas e esse comportamento único distingue suas propriedades da quitina. Esse comportamento está relacionado à protonação do grupo amina da quitosana. Em condições de pH neutras e básicas, a quitosana pode ser precipitada quando $\text{pH} > \text{pKa}$ devido à diminuição da polaridade em relação à condição em que a quitosana contém formas de protonação de

amônio. Embora a quitosana seja solúvel em condições de pH ácido, a hidrólise e a despolimerização podem formar monômeros diminuindo o pH abaixo de 3. Isso faz da quitosana um candidato atraente para a indústria farmacêutica como desintegrante ou transportador. [95]

A solubilidade da quitosana também é um fator importante que pode ser afetado pelo peso do polímero, o tipo e a concentração do ácido utilizado. A solubilidade da quitosana na maioria dos solventes não aquosos é muito baixa, a menos que haja uma pequena quantidade de ácido para alterar o estado de protonação dos monômeros de quitosana. A solubilidade da quitosana depende do peso molecular, do grau de desacetilação, do tipo de ácido e da força do ácido. Por exemplo, a quitosana é solúvel em soluções de ácido acético a 2% e ácido cítrico a 10%. [79]

O efeito da adição de ácido para aumentar a solubilidade é entendido pela protonação de grupos amina. A quitosana tem um pKa próximo a 6,2, portanto é solúvel em valores de pH próximos e abaixo do pKa, onde grande parte dos grupos amina está em sua forma protonada. A valores de pH ácido, um aumento na repulsão de carga entre os grupos amina aumenta o volume do polímero à medida que um maior número de grupos de amônio será exposto ao solvente. A interação íon-dipolo refere-se à formação de interações favoráveis entre grupos de amônio e água. [93]

Várias características da quitosana incluem o grau de desacetilação, o peso molecular do polímero e a cristalinidade. Essas características têm influência significativa nas propriedades físico-químicas da quitosana. O grau de desacetilação da quitosana [95]

Em produtos comerciais de quitosana é variável com valores típicos de 75% a 80%. O grau de desacetilação governa a fração de grupos amina livres que estarão disponíveis para interações com íons variáveis, que podem reagir em diferentes condições de pH com vários íons através de um mecanismo de quelação ou interação eletrostática. Por exemplo, os grupos amina podem ser facilmente protonados em solução ácida para criar atração por compostos aniônicos. De fato, além do número de grupos amina livres disponíveis para absorção de adsorvido, a acessibilidade dos grupos amina livre desempenha um papel importante. Sem dúvida, nem todos os grupos amina estão disponíveis para interagir com adsorbatos, mas alguns deles estão envolvidos na ligação de hidrogênio. [91]

Infelizmente, existem muitas desvantagens (por exemplo, baixa estabilidade química e baixa resistência mecânica) para o uso de quitosana pura na forma de flocos e pós. As propriedades aprimoradas da quitosana normalmente requerem modificações químicas e físicas para melhorar sua capacidade de adsorção. [95]

A presença de abundantes grupos hidroxil e amina na quitosana fornece um polímero semicristalino. Ambos os grupos têm a capacidade de participar de ligações de hidrogênio, o que pode aumentar a cristalinidade do material. Reticuladores como glutaraldeído e epícloridrina foram empregados para a reticulação dos pós de

quitosana e materiais de esferas. A reticulação da quitosana pode aumentar a área superficial do material, pois o processo leva à exposição de grupos funcionais, como os grupos amina e hidroxila.[59]

As microestruturas preenchem as escalas molecular e macroscópica. As microestruturas com padrão de disco obtidas a partir de microcápsulas neste trabalho são montadas camada por camada, o que permitiu depositar os polissacarídeos naturais quitosana e alginato de sódio em micropartículas porosas.[91]

Os suportes descritos anteriormente, possuem desvantagens no seu uso, a depender de condições experimentais. No que se refere aos constituídos de alginato de cálcio, apresentam instabilidade em soluções tampão com alta concentração de íons fosfato ou citrato, pois esses compostos podem quelar os íons Ca^{2+} do alginato e liquefazer o sistema imobilizado. Já a quitosana tem como desvantagem principal a completa falta de solubilidade perto do pH 7,0. Uma vez que o pKa do resíduo de d-glucosamina é cerca de 6,5, a quitosana é solúvel apenas em soluções ácidas (ácido acético ou ácido clorídrico diluído). Esta propriedade da quitosana poderia limitar o seu emprego na imobilização enzimática, uma vez que muitas enzimas não são estáveis a valores de pH ácidos. Para utilizar tais suportes de forma que se mantenham estáveis, realiza-se a complexação iônica da quitosana (com carga positiva) com o alginato (com carga negativa) para formar um gel ou um sistema de microcápsulas para imobilização de proteínas. [91]

A vantagem de desenvolver um suporte polimérico de alginato-quitosana existe porque o gel formado apresenta maior capacidade de fazer ligações com as enzimas e assim prender as enzimas no suporte, de forma que elas não sejam liberadas para o meio reacional durante o processo de hidrólise enzimática. [96]

Os principais componentes de um sistema enzimático imobilizado são: a enzima, o suporte e o modo de ligação da enzima com o suporte. Os métodos de imobilização exploram o fato de que as proteínas têm aminoácidos com características diferentes, assim, os grupos funcionais situados nas cadeias laterais destes aminoácidos podem ser envolvidos nas ligações com o suporte através de vários tipos de interações. As enzimas podem ser ligadas por interações que vão desde a adsorção física reversível, ligações iônicas e por afinidade até ligações covalentes irreversíveis (mas estáveis), presentes através de ligações de éter, tioéter, amida ou carbamato.[59]

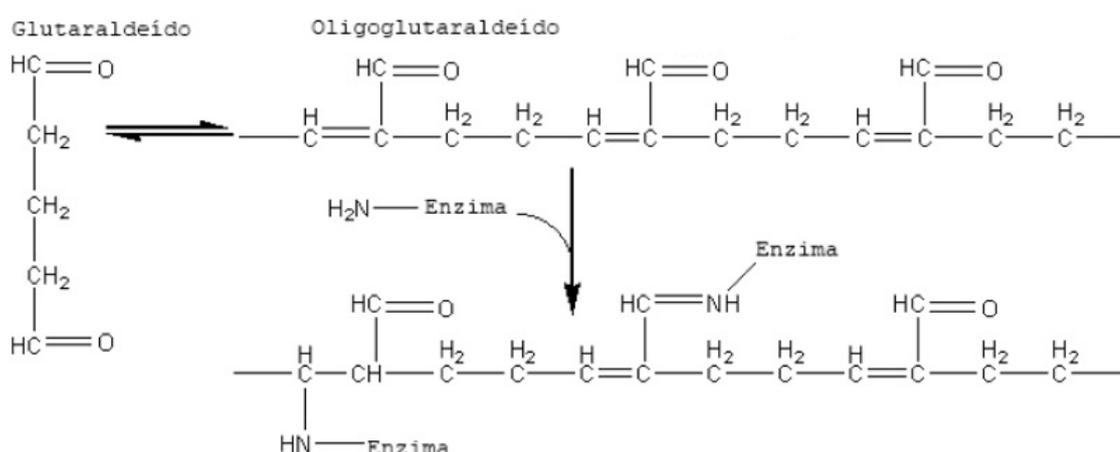
1.10 Agentes Ligantes

As interações feitas entre o suporte e enzima podem não ser suficientes para mantê-la ligada, dessa forma, agentes ligantes bi/multifuncionais são utilizados. No método de ligação cruzada, reagentes como o glutaraldeído, bisdiazobenzidina e hexametileno diisocianato, de forma que mantenha a ligação ao suporte após o processo de hidrólise enzimática. O glutaraldeído é amplamente utilizado como um agente ligante

para a imobilização de enzimas. Neste tipo de imobilização, as moléculas proteicas são covalentemente ligadas umas às outras e ao suporte por meio de reagentes bifuncionais. Neste caso, o reagente bifuncional, glutaraldeído, estabelece uma ponte de união entre a enzima e o suporte, com os quais forma ligações covalentes análogas. O reativo bifuncional pode ser adicionado tanto à enzima previamente adsorvida no suporte, quanto à enzima livre com posterior adsorção ao suporte. Outra possibilidade seria misturar primeiro o suporte com o reagente bifuncional, seguida da adição da enzima.

A quitosana, quando submetida à reação com um reagente que possui dois ou mais grupos funcionais reativos carbonílicos (grupos aldeído) pode formar ligações entre os grupos amino do polímero e aldeído do reagente, formando o polímero reticulado (ou com ligações cruzadas), de estrutura tridimensional. O material resultante passa a ser insolúvel, característica principal de materiais desta natureza (reticulados). As ligações covalentes entre os grupos amino e os grupos aldeído terminais do agente reticulante são irreversíveis e resistentes a valores de pH extremos. Assim, o reticulante bifuncional glutaraldeído (1,5-pentanodial) pode ser usado para inibir a solubilização através da formação de uma base de Schiff com os grupos amino livres da unidade glucosamina do polímero. O processo de reticulação ao ocorrer confere a quitosana características que melhoram a resistência à degradação química e biológica, aumenta a força mecânica e a resistência à abrasão. [97]

Figura 16 – Reação do glutaraldeído com cadeias polisacarídicas ligando-as as enzimas



1.11 Processo de Hidrólise

A hidrólise do amido por amilases é um dos processos enzimáticos comerciais mais importantes comércio global de enzimas e cada vez mais demonstra-se competitiva frente a hidrólise química, por gerar menos resíduos, e sendo mais eficiente quando aplica-se o produto da hidrólise em alimentos. Estes produtos são utilizados em indústrias de panificação e panificação, têxteis, papel, indústria de detergentes e aplicações clínicas e medicinais. Mas uma vez utilizado, as amilases não podem ser facilmente recuperadas a partir dos sistemas de reação. Por conseguinte, é muito importante utilizar amilases imobilizada em vez de amilase livre. Houveram muitos relatos sobre a imobilização de amilases, entretanto, as enzimas imobilizadas se apresentavam em sua forma pura ou ultrapura, sendo um limitante para sua aplicação em larga escala. [98]

Atualmente as amilases comerciais disponíveis no mercado estão na forma livre, sem nenhum revestimento ou imobilizadas, e são apresentadas na forma líquida ou em pó. [99] Após o uso das amilases livres no processo industrial, geralmente essas são inativadas, necessitando de reposição das enzimas para realizar um novo processo. O uso de amilases imobilizadas apresenta vantagens em relação ao uso de amilases livres, entre as quais podem ser citadas a possibilidade de reutilizar o biocatalisador por mais de um ciclo e também uso de um biorreator de processo contínuo. Outro ganho obtido por meio do uso de enzimas imobilizadas é o aumento da estabilidade do biocatalisador em relação às variações de pH, temperatura e concentração de nutrientes no meio de reação. Facilidade de separação e recuperação do biocatalisador e do produto. [100]

A quitosana tem sido usada em combinação com o alginato, onde as enzimas revestidas de quitosana tiveram menos efeito de lixiviação em comparação ao alginato, devido às interações físicas e iônicas entre a enzima e o suporte. Da mesma forma, um compósito úmido de quitosana e argila mostrou-se mais confiável para o aprisionamento enzimático, pois possui grupos hidroxila e amino, que se ligam facilmente a enzimas, juntamente com boa hidrofiliabilidade e alta porosidade. A quitosana na forma de *beads*(microgéis) pode ligar-se ao dobro das enzimas. [55]

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo foi desenvolver um processo de imobilização de amilases contidas no extrato bruto (EB) (obtidas a partir de *Aspergillus oryzae*) imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana, estando o alginato recoberto pela quitosana.

2.2 Objetivos Específicos

- Variar as condições de imobilização.
- Medir a atividade dos diferentes métodos de imobilização, se quantificando a atividade de hidrólise do amido.
- Quantificar as proteínas adsorvidas e não adsorvidas nos microgéis.
- Verificar a taxa de atividade em diferentes condições de pH e temperatura.
- Avaliar as modificações da estrutura polimérica, por FTIR.
- Observar por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) possíveis alterações morfológicas nas estruturas dos microgéis.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e substratos

Meio Sabourand Dextrose

Glucose d(+) Anidra – Vetec Química Fina ®;

Agar Bacteriológico Frasco Kasvi®;

Peptona Bacteriologica Oxoid®;

Arroz – Mercado local

Alginato de Sódio Sigma-Aldrich®

Quitosana de baixo peso molecular Sigma Chem. Aldrich®;

Cloreto de Cálcio - Vetec Química Fina®;

Ácido acético - Dinâmica®;

Brometo de potássio, KBr, - Sigma-Aldrich®

Iodeto de potássio – Vetec Química Fina ®

Iodo Ressublimado - Dinâmica®;

Ácido 3,5-dinitrosalicílico - Sigma-Aldrich®

Hidróxido de sódio - Vetec Química Fina ®

Tartarato duplo de sódio e potássio - Vetec Química Fina ®

Azul de Coomassie G-250 - Sigma-Aldrich®

Ácido ortofosfórico – Merck®

Etanol - Vetec Química Fina ®

3.2 Equipamentos

Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco® modelos CFLV09 e CFLV12;

Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific® modelo LS61-220;

Espectrofotômetro UV-vis marca Hitachi High-Tecnologies Coporation®, modelo U-3900H;

Micropipeta automáticas com escala variável de 100-1000 µL, marca CAP®, modelo Bravo;

Micropipeta automáticas com escala variável de 1-5 mL, marca Kasvi®, modelo Plus;

Microscópio Eletrônico de Varredura FEI QUANTA 250 A®;

Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, marca Shimadzu®, modelo IRPrestige-21;

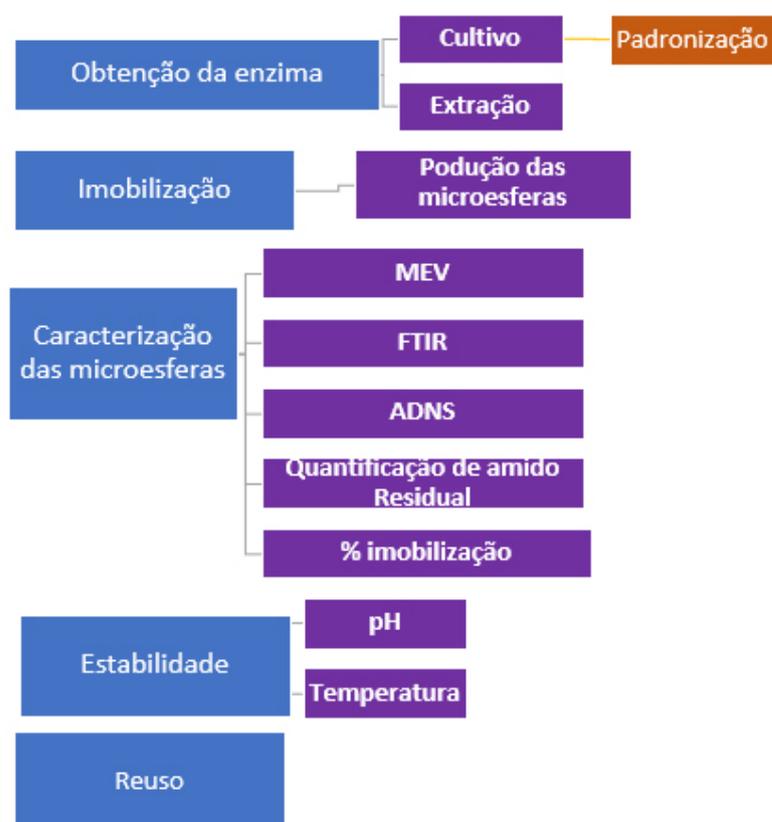
Centrífuga Novatécnica®, modelo NT810

3.3 Métodos

A metodologia foi dividida da seguinte forma:

- Métodos de Caracterização
- Método de extração
- Método de Síntese e imobilização
- Método de Cultivo

Figura 17 – Esquema Experimental

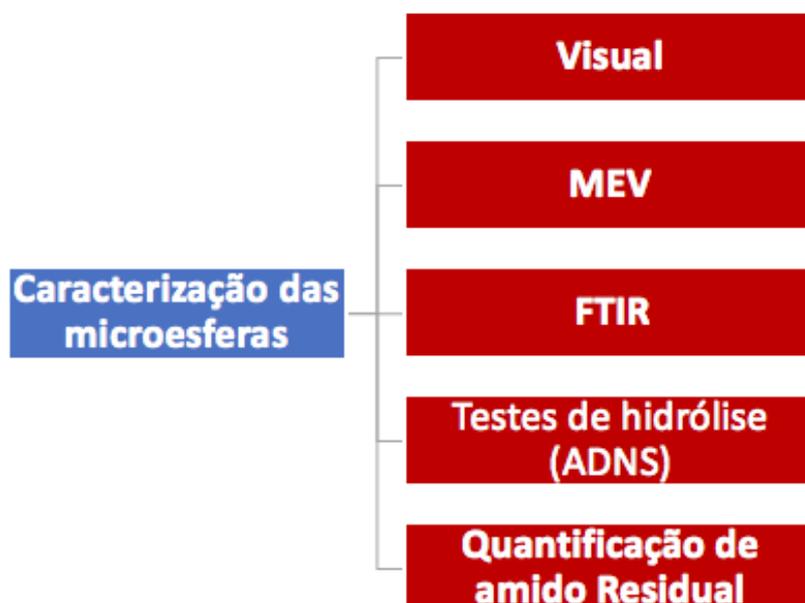


3.4 Métodos de Caracterização

3.4.1 Caracterização das microesferas

As formulações produzidas foram caracterizadas quando as diversos aspectos, sendo apresentados de maneira sintetizada na Figura 18.

Figura 18 – Esquema de caracterização



3.4.2 Caracterização Morfológica e Superficial utilizando Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

As medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foram feitas utilizando ($2,00 \pm 0,60$ mg) de microesferas secas por 7 dias em um dessecador à vácuo. Após a desidratação, a lâmina foi fixada com fita adesiva condutora dupla-face sobre o suporte de alumínio (stub). A baixa condutividade elétrica é uma propriedade inerente aos biopolímeros, dessa forma, revestiu-se a amostra com uma fina camada de ouro pelo processo de metalização em atmosfera de argônio e paládio. Tal procedimento foi feito utilizando o equipamento revestidor Balzers, modelo SCD-050. As amostras foram examinadas e fotografadas nos aumentos entre 250 a 30.000 vezes, operado em tensão de aceleração de 20,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários. Para aquisição das imagens dos microgéis, utilizou-se dois detectores distintos EBSD (Electron BackScatter Diffraction) ou difração de elétrons retroespalhados e o ETD (Everhart-Thornley Detector).

3.4.3 Caracterização dos Microgéis por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

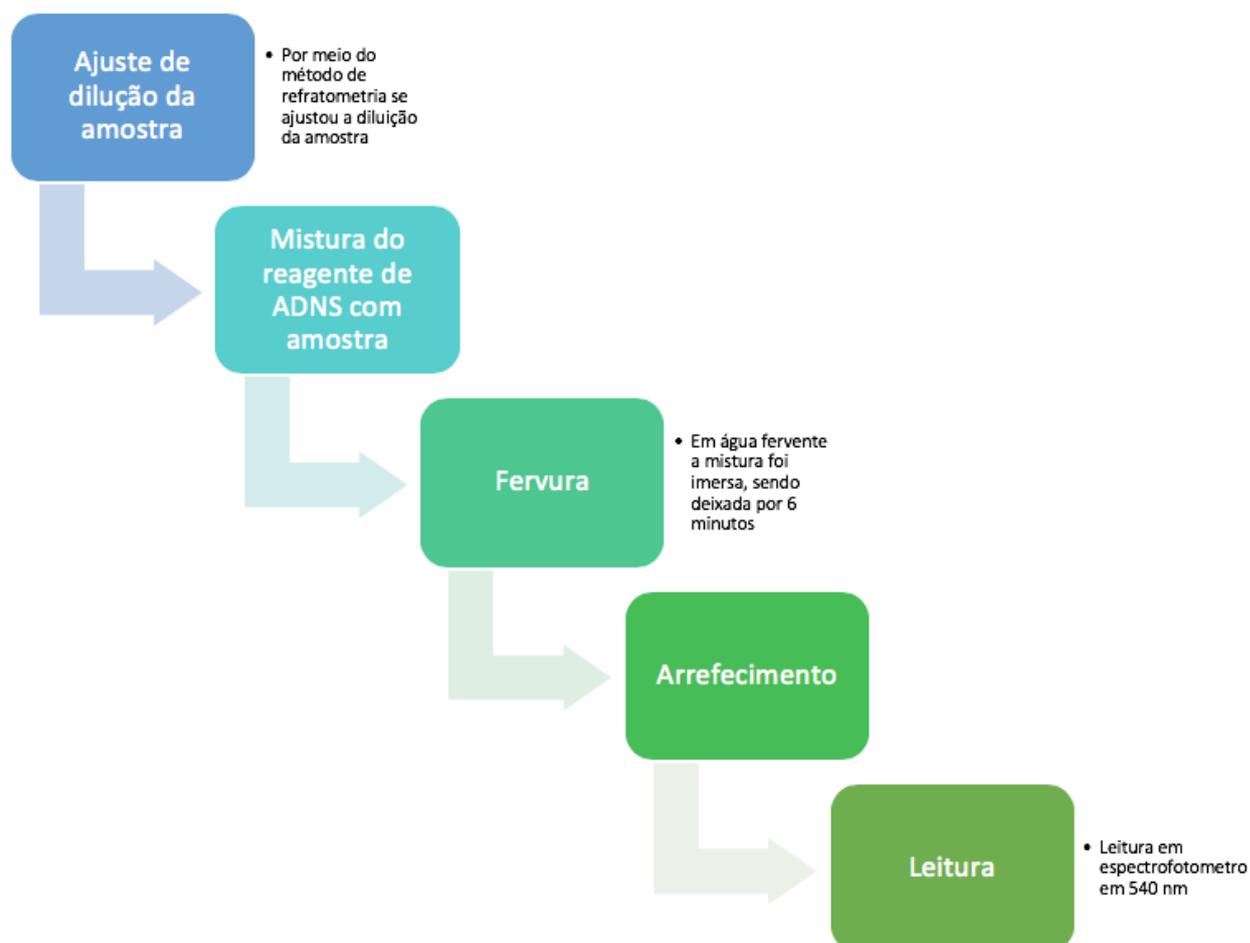
O método de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado para se identificar alterações químicas por meio da adição do glutalderido, e se a interação entre os grupos funcionais da cadeia polisacáridica com as proteínas contidas em EB, podem ser detectadas por meio do dessa.

Espectros de infravermelho de todas as amostras produzidas e reagentes utilizados foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FTIR, modelo IR Prestige 21 da marca Shimadzu. Para leitura foram utilizadas pastilhas de KBr com massa média de (50,00 mg \pm 1,0mg) preparadas com 1% de amostra, prensadas a 80,00 KN pelo período de 3,0 minutos. Para cada leitura foram obtidos 40 registros, com resolução de 4,00 cm^{-1} na região compreendida entre 400,00 e 4.000,00 cm^{-1} no modo de porcentagem de transmitância. Os dados foram tratados com o software IR Solution 1.50 e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism (Versão 8.0.1).

3.4.4 Determinação espectrofotométrica na região do visível

3.4.4.1 Teste de quantificação de açúcares redutores pelo método de ADNS

A atividade hidrolítica do EB em sua forma livre e encapsulada foram realizados com todas as formulações produzidas. A metodologia recomendada na literatura [101], para esta avaliação é baseada no teste colorimétrico conhecido como teste de hidrólise por ADNS (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico). Neste teste, utiliza-se uma quantidade de amostra de microgéis ($m=0,22\text{g}$), que é adicionada a um tubo de ensaio contendo 4ml de solução de amido 1%. Após esta etapa, os microgéis/solução de EB são aquecidas em banho-maria por 45°C no tempo de 1 hora. A seguir foram retiradas alíquotas de cada tubo de ensaio, ajustando a diluição pelo método de refratometria, para obtenção de valores adequados e de acordo com a curva de calibração, e adicionado a outro tubo contendo a solução de ADNS de concentração 1%. Novamente estes novos tubos são aquecidos a ebulição por 5-6 minutos [102]. Após o resfriamento, observou-se uma mudança na coloração da solução e as mesmas são analisadas pelo método de espectroscopia no Uv-vis (no comprimento de onda de 540nm), como ilustrado na Figura 19

Figura 19 – Esquema da análise pelo método de ADNS

Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

O teste de hidrólise por ADNS, permite calcular a concentração de grupos redutores totais (GRT), que significa a quantidade de açúcares produzidos por EB livre e EB microencapsulado. O cálculo da concentração de grupos redutores totais (GRT), em mg mL^{-1} foi realizado de acordo com a Equação 1:

$$GRT = abs \times f \times d$$

(Eq.)

em que:

abs é média das absorbâncias lidas.

f é fator de concentração.

d é inverso da diluição da amostra

3.4.5 Quantificação de amido residual

Um método mais eficiente para quantificar a as cadeias de amilose é o método iodométrico, que é baseado na complexação de inclusão helicoidal, gerando um complexo azul, formado devido à afinidade do iodo com as cadeias de amilose, uma das cadeias polisacarídicas constituintes do amido.[103]

Esta quantificação é importante pois pode-se avaliar o quanto a enzima está ativa em cada formulação ou mesmo livre de maneira indireta. O protocolo padrão desta análise é baseado na leitura espectrofotométrica da resultante da reação de solução de iodo com a amostra analisada na relação 1:1. Após a mistura de ambas as soluções, é adicionado 10 vezes o volume em água, seguido de agitação e análise no espectrofotometro (Comprimento de onda de 620nm). [104]

O amido residual foi determinado nas amostras anteriormente incubadas com o substrato, de forma a determinar a quantidade de amido que não hidrolisado. Tal teste, complementa ou demonstra a hidrólise parcial do substrato, não detectável pelo método de ADNS. O método utilizado foi o baseado na literatura onde uma solução de iodo.

Figura 20 – Esquema de análise para a quantificação de amido residual



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

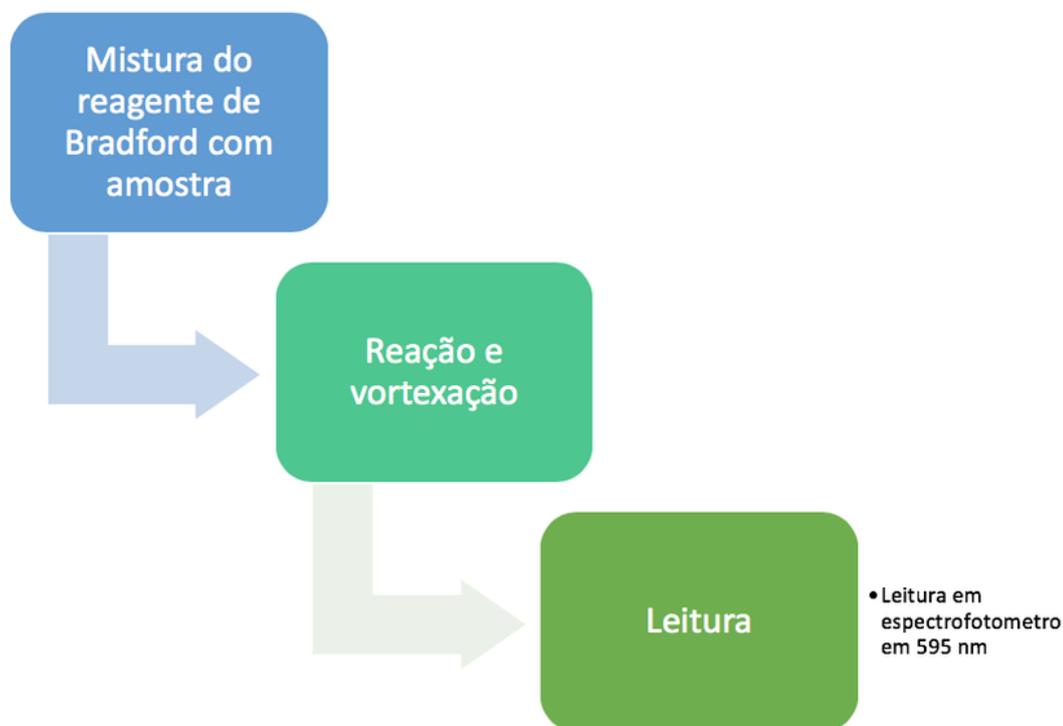
3.4.6 Quantificação de proteínas

O teste de quantificação de proteínas (Método de Bradford) foi utilizado para se estabelecer as diferenças entre a concentração de proteína em EB e a concentração de proteína nos sobrenadantes provenientes da síntese dos microgéis, para se determinar a quantidade de proteína total adsorvidas.

3.4.6.1 Preparo do reagente de Bradford

Para o preparo do reagente de Bradford foi dissolvido 100,00 mg de Azul Brillhante de Comassie G 250 em 50 mL etanol e acidificado com 100,00 mL de ácido fosfórico 85% e posteriormente completou-se o volume para 1,00 L. Para a se fazer a curva de calibração, foi utilizado BSA. Para cada amostra foram utilizados 100,00 μ L em 5,00 mL de reagente, incubados por 5 minutos, após serem vortexados em tubos de ensaio.[105]

Figura 21 – Esquema da análise pelo método de Bradford

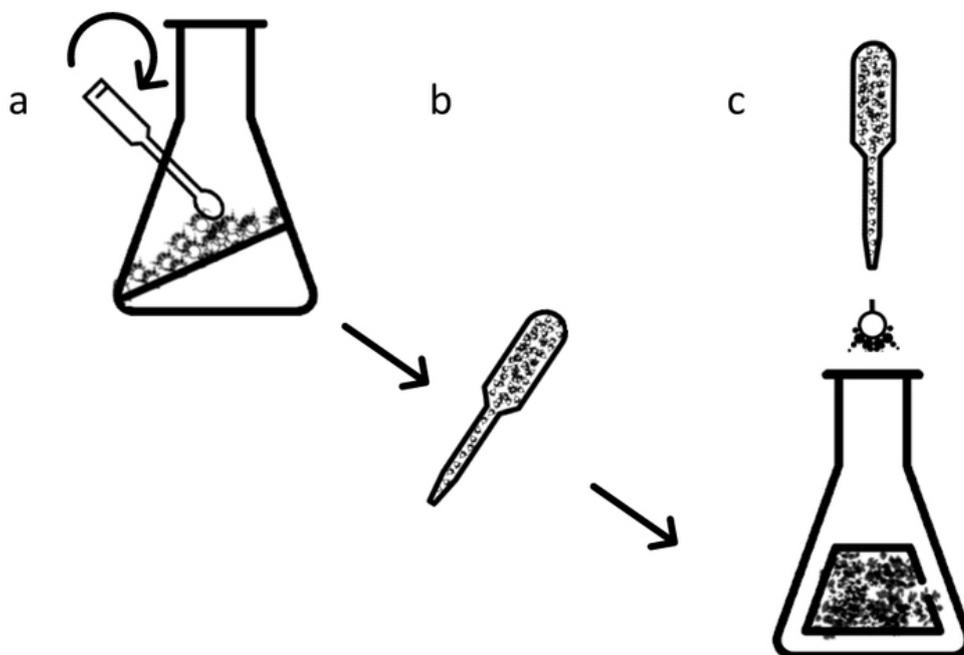


Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

3.4.7 **Método de cultivo**

A metodologia para a obtenção do extrato enzimático é baseada no crescimento do *Aspergillus oryzae* em fermentação em estado sólido, utilizando o arroz como meio de cultivo. [106][107]

A cepa do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 1011 foi adquirida na Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais). O meio para produção inicial dos fungos foi constituído por 25,00 mL do Agar Sabouraud dextrose distribuído de forma inclinada em frascos erlenmeyers de 50 mL. Após solidificação do meio, o microrganismo *Aspergillus oryzae* foi repicado no meio. Após o crescimento do fungo, incubado a 27,00 °C, por um período de 7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula (Figura 22a), adicionando-se de 30,00 mL de água destilada estéril, para obter uma solução de esporos, sendo pitetada posteriormente (Figura 22b) para o cultivo em fermentação em estado sólido (FES), em frascos erlenmeyers de 500,00 mL, contendo arroz umicecido e esterelizado (Figura 22c). As proporções de substrato e água foram testadas nas seguintes proporções de ; 1:1; 2:1; 3:1 e 4:1, se determinando o teor de umidade ideal para o cultivo do fungo, garantindo sua melhor propagação no meio, para obtenção do extrato enzimático (EB) bruto contendo as amilases.

Figura 22 – Procedimento de inoculação do *Aspergillus oryzae* no arroz

Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

No esquema abaixo é ilustrado (Figura 23) a sequência de etapas realizadas na obtenção do extrato bruto enzimático (EB).

Figura 23 – Esquema da obtenção de EB



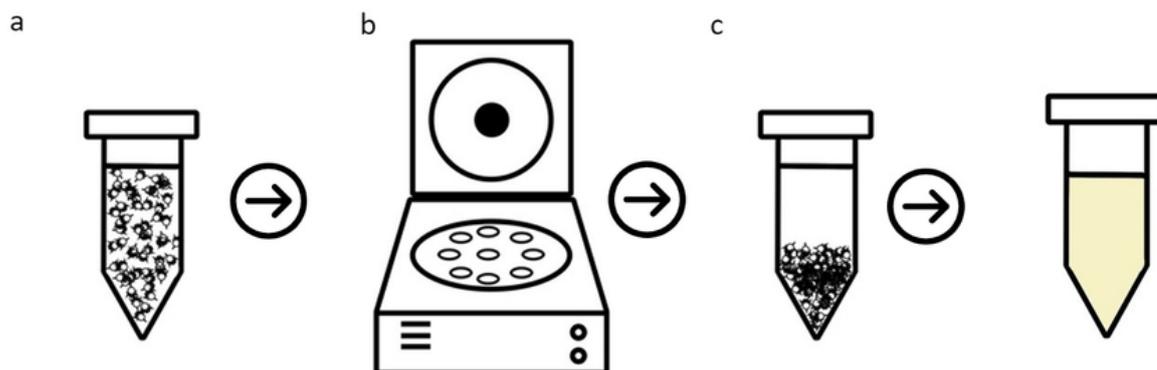
3.4.7.1 Obtenção do Extrato Bruto (EB)

A massa fúngica obtida foi adicionada em 40,00 mL de tampão acetato 0,10 M, pH 5,00 e homogeneizada em liquidificador por 1 minutos. A massa foi centrifugada a 6000 rpm por 4 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman Nº 1 e novamente centrifugado a 6000 rpm por 4 minutos, obtendo o extrato enzimático bruto (EB) contendo as amilases Figura 24. Este EB não sofreu nenhum processo de purificação ou isolamento das enzimas contidas na solução.

3.4.7.2 Testes de hidrólise em EB (Controle)

Para a caracterização de EB foram feitos os testes de hidrólise e quantificação de proteína, se determinando a quantidade de enzimas amilolíticas, em UI (Unidade internacional). Pelo processo de hidrólise foram avaliadas as atividades após a exposição da enzima a diferentes pH e temperaturas. 500 μ L de extrato foi pipetado em 4,00 mL de amido 1% preparados em soluções tampão com pHs variando de 3,00 a 8,00 na sendo então os tubos deixados em banho-maria a 45 °C por uma hora. Para o teste de temperatura, o procedimento de hidrólise foi feito com amido a 1% preparado com água destilada, mantendo-se os tubos em banho-maria por 1 hora, nas temperaturas variando de 30,00 a 80,00 °C, e nas temperaturas de 10,00 e 20,00 °C em câmara climática.

**Figura 24 – a) EB extraído do arroz junto ao substrato
b) Centrifugação de EB
c) EB centrifugado com so sobrenadante
d) Sobrenadante utilizado para imobilização**



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

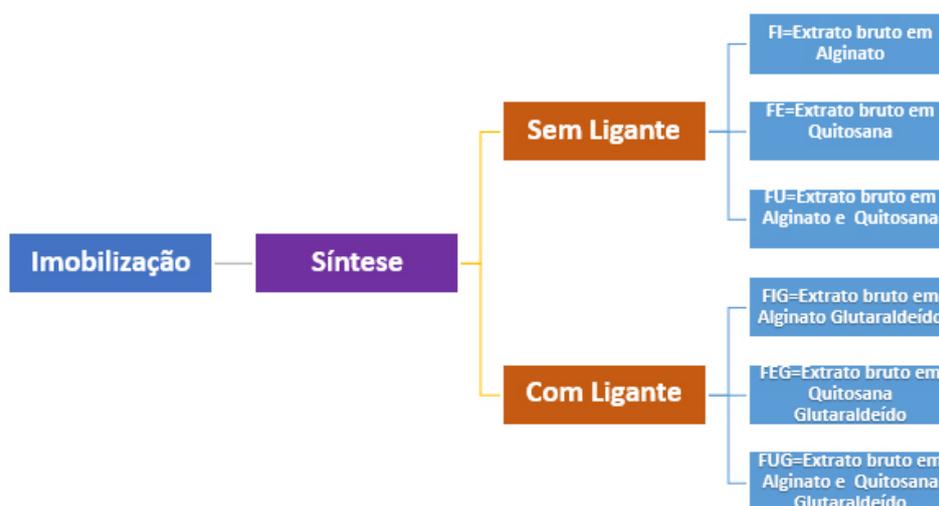
3.5 Método de Síntese e imobilização

3.5.1 Preparo das amilases imobilizadas nas microesferas de alginato-quitosana

Para o preparo das amilases imobilizadas, diferentes combinações entre os suportes poliméricos de alginato e quitosana, bem como a proporção de EB foram testada. A resposta destes sistemas obtidos em relação à concentração de açúcares produzidos durante o processo de hidrólise enzimática do amido foi utilizada para a escolha da formulação mais adequada, de acordo com a literatura.[108] [109]

Na Figura 25 é apresentado o esquema ilustrativo do método de gotejamento utilizado para a produção das microesferas.

Figura 25 – Esquema de síntese



No tabela abaixo (Figura 26) , estão descritos os volumes as quantidade de enzimas amilolíticas presentes em EB, correspondentes a síntese de cada conformação.

Figura 26 – Unidade de atividade presente nos volumes de EB ao longo do procedimento de síntese para cada conformação

Extrato Bruto utilizado em síntese	
Amostra	Unidade de Atividade (U)
FI	168,93 ± 6,30
FIG	167,48 ± 6,21
FE	240,07 ± 6,30
FEG	238,80 ± 8,94
FU	89,50 ± 3,33
FUG	88,80 ± 3,30

A produção das microesferas de conformação de fase interna(FI) constituiu-se da seguinte forma:

Inicialmente, foi misturado 19,00 mL do EB ao polímero natural alginato de sódio (0,36 g) formado a solução de gotejamento. Em um béquer contendo uma solução de quitosana (0,12 g mL) de concentração , e contendo nesta solução ácido acético e CaCl_2 , foi gotejado lentamente com o auxílio de seringa com agulha, um volume variando de 10,00-40,00 mL da solução gotejante, de forma a obteve-se microgéis de alginato contendo EB no núcleo das partículas formadas e revestida de quitosana. O procedimento para se preparar a microesfera FIG ocorreu por meio da adição de glutaraldeído 25% na solução de gotejamento de alginato solubilizado em EB, mantendo os outros procedimentos semelhantes ao de FI. Após 2 horas, da reação do glutaraldeído com o alginato, foi realizado o processo de gotejamento na solução de quitosana com cloreto de cálcio. Dessa forma as enzimas situaram-se na fase interna (FIG) da microesfera de alginato que foi revestida externamente pela quitosana e o sistema imobilizado teve a adição do ligante glutaraldeído (G).

A produção dos microgéis de conformação de fase externa (FE) constituiu-se da seguinte forma :

Neste protocolo, a ordem em que os reagentes foram utilizados foi invertida, adicionando água destilada na fase interna, ($v=19,00$ mL) misturado ao polímero natural alginato de sódio (0,36 g) formado a solução de gotejamento. Em um béquer contendo uma solução de quitosana (0,12 g mL) e EB contendo nesta solução ácido acético e CaCl_2 , foi gotejado na solução de alginato lentamente com o auxílio de seringa com agulha, um volume variando de 10,00-40,00 mL da solução gotejante, de forma a obteve-se microgéis de alginato contendo EB na camada externa de quitosana.

Em FEG foi feita a adição de solução de glutaraldeído 25% na quitosana, solubilizando todos os componentes em EB. Após 2 horas se fez o processo de gotejamento na solução de quitosana com cloreto de cálcio. Dessa forma as enzimas situaram-se na fase interna (FEG) da microesfera de alginato que foi revestida externamente pela quitosana e o sistema imobilizado teve a adição do ligante glutaraldeído.

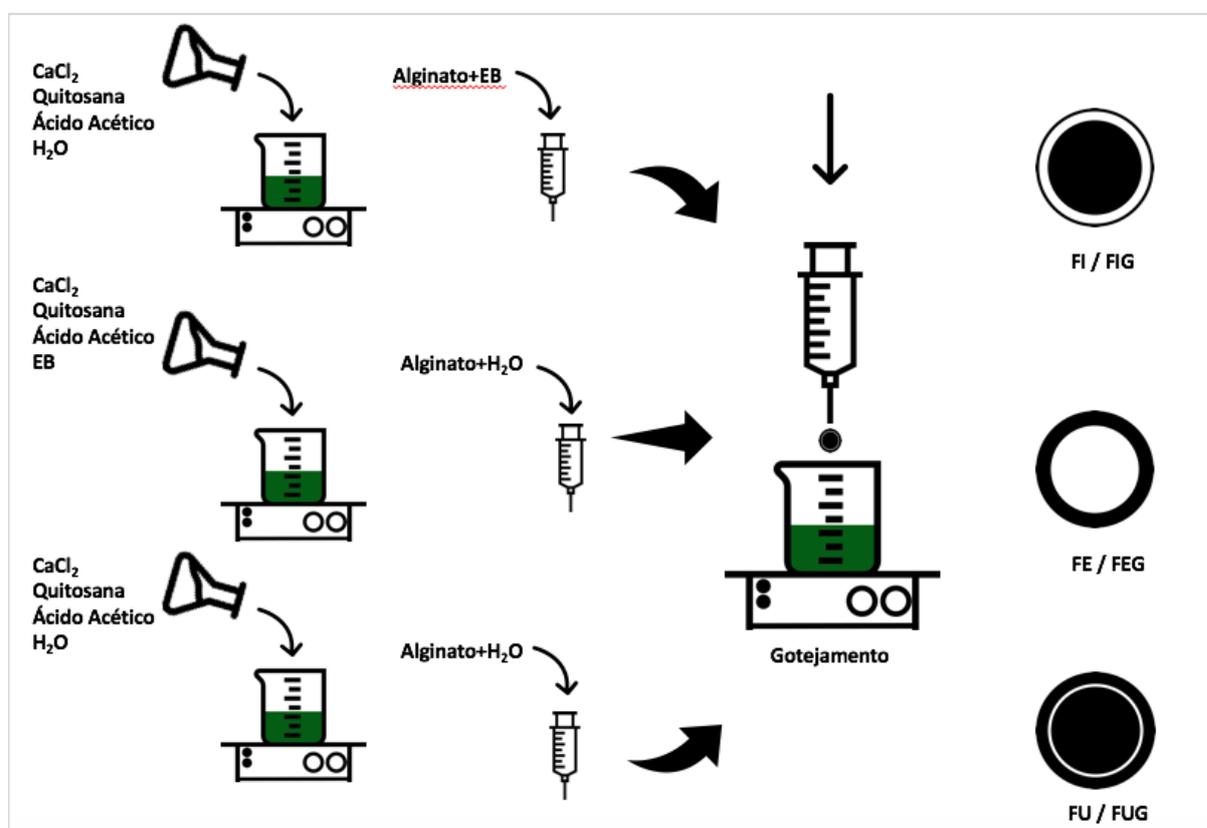
O procedimento para se confeccionar FU, EB foi adicionado posteriormente a secagem dos microgéis, mantendo para a solução de alginato água destilada($v=19,00$ mL) misturada ao polímero natural alginato de sódio (0,36 g) formado a solução de gotejamento. Em um béquer contendo uma solução de quitosana (0,12 g ml) juntamente a água destilada ($v=27,00$ mL), contendo nesta solução ácido acético e CaCl_2 , foi gotejada solução de alginato lentamente com o auxílio de seringa com agulha, um volume variando de 10,00-40,00 mL da solução gotejante, de forma a obter-se microgéis de alginato contendo EB no núcleo das partículas formadas e revestida de quitosana.

Independente dos métodos acima descritos, o EB foi adicionado nos microgéis prontos, que foram preparados da seguinte maneira, os microgéis obtidas foram secos por 72h a 20,00 °C. Após a secagem dos microgéis, forma imersos em EB para obtenção da configuração FU e EB com glutaraldeído a 1% para obtenção de FUG por 24 horas,

até o intumescimento máximo das esferas. Nessa conformação as enzimas encontram-se nas duas fases de polisacarídeos do suporte. A partir destas formulações foram obtidas microgéis de conformação distintas em relação a fase em que foram incluídas EB.

No esquema ilustrativo a seguir Figura 27, é apresentada todas as formulações que foram produzidas neste trabalho.

Figura 27 – Esquema de ilustrativo da síntese : O béque em que se fez o gotejamento, contendo CaCl_2 , quitosana, ácido acético e H_2O , ou EB, no método de síntese de FE e FEG. Na seringa que se fez o gotejamento, em FI e FIG se diluiu o alginato com EB, nas demais sínteses se fez a dissolução com H_2O . Em FU e FUG, ambos os polímeros foram solubilizados em H_2O e posteriormente, secos e intumescidos com EB



Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

3.6 Testes de reuso das microesferas

As conformações mais ativas, conforme o teste de hidrólise, tiveram sua atividade testadas consecutivamente, a cada uma hora para se determinar sua atividade, adicionando amido 4 ml de amido 1%.

3.6.1 **Teste de taxas de atividade sob variação de temperatura e pH**

Para se estabelecer as diferenças entre EB e as enzimas encapsuladas os teste de estabilidade foram feitos de acordo com o procedimento descrito: O microgéis foram deixadas em banho-maria, nos tubos de ensaio juntamente com tampão acetato pH 5,00 em temperaturas variando de 10,00 a 80,00 °C, sendo deixadas por 1 hora a essa temperatura, e posteriormente foi feito o procedimento de hidrólise assim como no teste do item 3.4.

3.6.2 **Taxa de imobilização através da Avaliação de atividade amilolítica do sobrenadante**

O processo de entrapamento das enzimas pelas cadeias polisacarídicas foi medido pela avaliação da atividade amilolítica do sobrenadante proveniente da síntese. As proteínas que não se ligaram a matriz, podem se manter, no exterior das beads, permitindo o cálculo indireto da eficiência de imobilização.[110]

Após todo o processo de imobilização, o sobrenadante presente no meio reacional, onde as beads encontravam-se imersas, foram retiradas alíquotas, repetindo-se o procedimento de hidrólise.

3.6.3 **Análise estatística**

Para se determinar a consistência dos dados dentro das amostras sintetizadas, e sua repetibilidade ao longo das sínteses, foram avaliadas as quantidades de açúcares redutores, como parâmetro principal, mais especificamente a resposta, sendo tais medidas submetidas a teste de confiabilidade por meio do cálculo de alfa de Cronbach, descrito na equação abaixo. Dentro de cada síntese feita, as medidas foram submetidas a tal análise em triplicata, constituindo-se de três sínteses para tal avaliação, e dentro de cada síntese mais três amostras foram avaliadas, constituindo um N experimental de 9. [111]

$$\alpha = \frac{k*avgC}{var+(k-1)avgC}$$

k = Número de itens

avgC = variância média entre os pares

var = variância média

O alfa de Cronbach é, foi utilizado como uma função do número de itens em um teste, a covariância média entre pares de itens e a variação da pontuação total.

O procedimento para o cálculo do Alfa de Cronbach no programa SPSS
CONFIABILIDADE

/ VARIÁVEIS = Q1 Q2 Q3 Q4 Q5 Q6 Q7 Q8 Q9

/ ESCALA ('TODAS AS VARIÁVEIS')

/ MODELO = ALFA.

A sintaxe acima produz apenas uma saída resumida; além do coeficiente α , o SPSS, versão 22, também forneceu o número de observações válidas usadas na análise e o número de itens de escala especificadas.

As demais análises conduzidas, foram feitas a partir dos testes feitos em triplicata, avaliando a média e desvio padrão por meio do programa Graph prism®, versão 8.01, avaliando posteriormente a distinção entre as amostras pelo teste de ANOVA one way, para, evidenciar e confirmar a validade dos resultados.

4 Resultados e Discussão

4.1 Método de cultivo e obtenção do Extrato Bruto (EB)

Foram testadas 4 proporções, entre 1:1 a 1:4, do material amiláceo (arroz) e água destilada, mantendo a técnica tradicional de cultivo para obtenção de produtos fermentados, adaptando a técnica para se obter quantidades efetivas de enzimas amilolíticas para a imobilização posterior. A proporção 1:3 foi a que resultou melhores quantidades de enzima e melhor crescimento fúngico (Figura 28). [107]

Figura 28 – *Aspergillus oryzae* cultivado sobre o arroz, conhecido como *koji*, onde foi feita a extração das enzimas que foram difundidas no meio pelo fungo



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

A. oryzae é um fungo filamentoso, capaz de secretar grandes quantidades de enzimas hidrolíticas. É amplamente utilizado na fabricação de molho de soja fermentado tradicional na Ásia. As proteínas extracelulares no koji de soja inoculadas com *A. oryzae* contêm diferentes perfis de proteínas, incluindo protease neutra e alcalina, amilase, glutaminase e metalopeptidase. Além disso, *A. oryzae* é genomicamente bem caracterizado e considerado um organismo seguro para a produção de enzimas alimentares porque não possui marcadores de sequência expressos para os genes responsáveis pela produção de aflatoxina.[46][46]

Esse fungo, tem sido utilizado na produção de alimentos fermentados tradicionais como saquê (vinho de arroz), misô (pasta de soja) e shoyu (molho de soja) há mais de 1.000 anos. Devido ao seu longo uso na produção de alimentos, *A. oryzae* é listado como status GRAS (isto é, geralmente considerado seguro) pela Food and Drug Administration dos EUA. A segurança de *A. oryzae* também é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde. [112]

Aspergillus niger, *A. oryzae* e *A. terreus* na indústria de enzimas. Já é relatado que essas cepas produzem quantidade substancial de amilases em fermentação submersa e fermentação em estado sólido. [112]

Na fermentação tradicional, a fermentação em estado sólido (FES) é adequada para o crescimento de fungos, devido ao seu baixo teor de umidade e permitindo a penetração do micélio de fungos através dos substratos sólidos. O micélio fúngico pode penetrar no substrato sólido como 4 camadas de penetração do micélio. A primeira camada é a hifa areal, seguida pela hifa aeróbica e hifa anaeróbica, a última camada é a hifa penetrante. A baixa umidade em uma fermentação no estado sólido torna os microrganismos mais capazes de produzir certas enzimas e metabólitos que geralmente não serão produzidos em uma fermentação submersa.[113]

Os substratos para FES são, em geral, subprodutos da agroindústria farelos, cascas, bagaços e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação. São recursos naturais renováveis e produzidos em grandes quantidades, o que, algumas vezes, faz com que se tornem um problema ambiental. Uma das maiores vantagens deste método é que, ao invés de produzir apenas uma enzima, permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas, específico para os substratos encontrados nos alimentos. [114]

A estrutura desses materiais tem como seus principais componentes, celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano. [106]

O teor de umidade do meio muda durante a fermentação como resultado das atividades metabólicas e de evaporação e, portanto, o nível ideal de umidade do substrato é o fator mais importante na produção de enzimas. [115][116]

4.2 Metodologia na obtenção do extrato enzimático

A massa fúngica após propagado no arroz, foi triturado junto a massa de arroz hidrolisada, por meio de um liquidificador, adicionando para a extração das enzimas tampão fosfato 5.0, se extraíndo as enzimas liberadas no meio, obtendo-se por fim EB.

Figura 29 – Extrato bruto, EB, após o processo de centrifugação, pronto para o processo de imobilização



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

A fermentação de substrato sólido é geralmente definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos ou algumas vezes denominada fermentação em estado sólido já que o processo está ocorrendo na ausência ou quase ausência de água livre no sistema. O substrato, no entanto, deve conter umidade suficiente, que existe na forma absorvida dentro da matriz de substrato sólido e simula a reação de fermentação que ocorre na natureza. Estes substratos sólidos úmidos são insolúveis em água e de natureza polimérica, são uma fonte de carbono e energia, vitaminas, minerais, nutrientes e também fornecem sua água absorvida para crescimento microbiano, bem como ancoragem.

Fermentação em estado sólido ou em substrato sólido significa que o substrato é umedecido, frequentemente com uma fina camada de água na superfície das partículas, mas não há água suficiente presente para fazer a mistura fluida. Proporções de peso de água para substrato no FES geralmente estão entre 1: 1 e 1:10.

As enzimas secretadas pelo fungo *Aspergillus oryzae* no presente trabalho, no meio da fermentação, foi solubilizada somente com água destilada sendo o protocolo estabelecido inicialmente. Como descrito por meio da FES as enzimas junto com o corpo celular fúngico, permeia o material de fermentação, possibilitando o crescimento e o máximo de desenvolvimento do microrganismo, estando inúmeras enzimas dispersas no meio, principalmente as enzimas amilolíticas.

Posteriormente se testou com tampão fosfato 5.0 melhorando a atividade enzimática das enzimas imobilizadas. A atividade amiloítica presente As enzimas apresentam atividade moderada em soluções aquosas, ou água pura, sendo utilizadas com soluções tampão para mante-la em seu pH ideal.[117]

Tabela 1 – Comparação da extração de EB em H₂O e Tampão Fosfato

Amostra	Açúcares redutores produzidos por EB extraído sem tampão	Açúcare redutores produzidos por EB extraído em Tampão
EB extatído com H ₂ O	7,36±0,35	—
EB extatído com Tampão fosfato 5.0	7,05±0,12	—
FI	0,41±0,02	0,98±0,03
FIG	0,83±0,05	
FE	0,09±0,007	0,98±0,01
FEG	0,18±0,01	0,25±0,003
FU	0,34±0,02	0,36±0,01
FUG	0,68±0,04	0,20±0,005

Apesar de não haver diferença entre as médias, na perspectiva estística (Tukey $p < 0,05$) a tabela demonstra o aumento da taxa de conversão em 4 conformações testadas, FI, FE, FEG, FU, sendo a diferença ínfima. Diversos fatores podem ser considerados para ocorrer tal diferença. O principal pode ser o fato de que a ligação das enzimas com o suporte não são orientadas por grupamentos específicos na superfície dos polímeros, fazendo com que o sítio ativo enzimático, fique exposto de forma que favoreça a hidrólise. [58] A força iônica do meio pode ser considerada também um fator que pode gerar a alteração e diferença dentro das respostas obtidas, tais diferenças não chegam a dar a amostra uma característica para ser avaliada por teste paramétricos mas, se faz necessário fazer um teste de avaliação da consistência das médias obtidas.

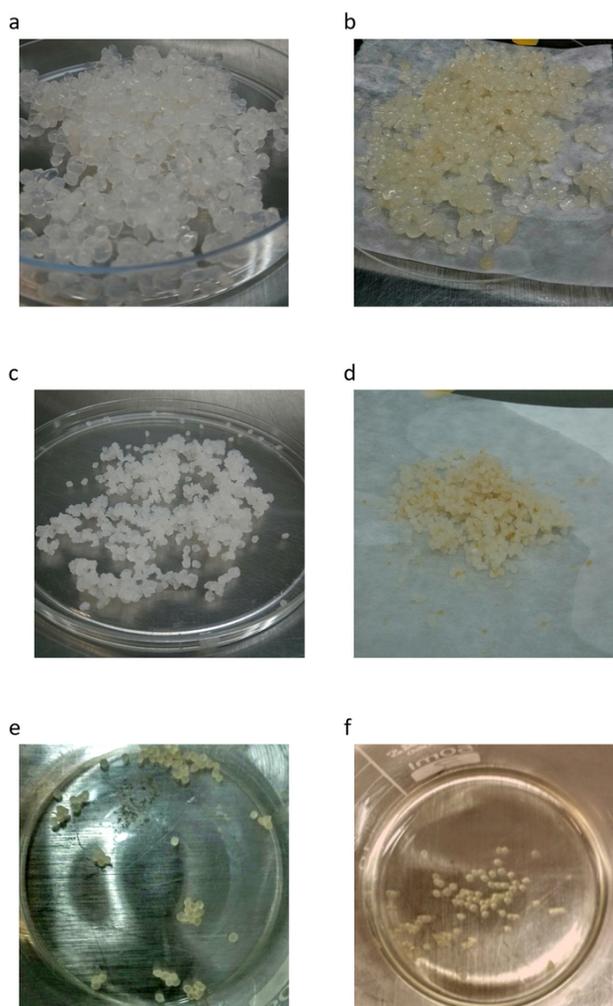
Normalmente, a enzima é razoavelmente estável em seu próprio pH ideal, e isso é recomendado não apenas para testes, mas também para armazenamento. Isso também é de alguma importância para a realização de ensaios enzimáticos, uma vez que a adição de uma alíquota da solução estoque de enzimas à mistura de ensaios não afetará o pH do ensaio. [115]

4.3 Microgéis sintetizados

Microgéis recém sintetizados Figuras 30 a e b tinham formato redondo com uma superfície lisa e homogênea. Ambas as esferas FI e FIG foram semelhantes em cor e tamanho. O método de gelificação ionotrópica usada neste estudo para encapsular o EB através de uma agulha não perfurante resultou em um tamanho regular, com aparência esférica e matriz externa lisa. A redução dos microgéis de fase externa (FE e FEG) Figuras 30 c e d, torna as conformações um pouco mais enrugadas e de superfície totalmente irregular, com uma superfície mais áspera. Em Figuras 30 e e f estão as fotos de FU e FUG, respectivamente após o processo de intumescimento de 24 horas.

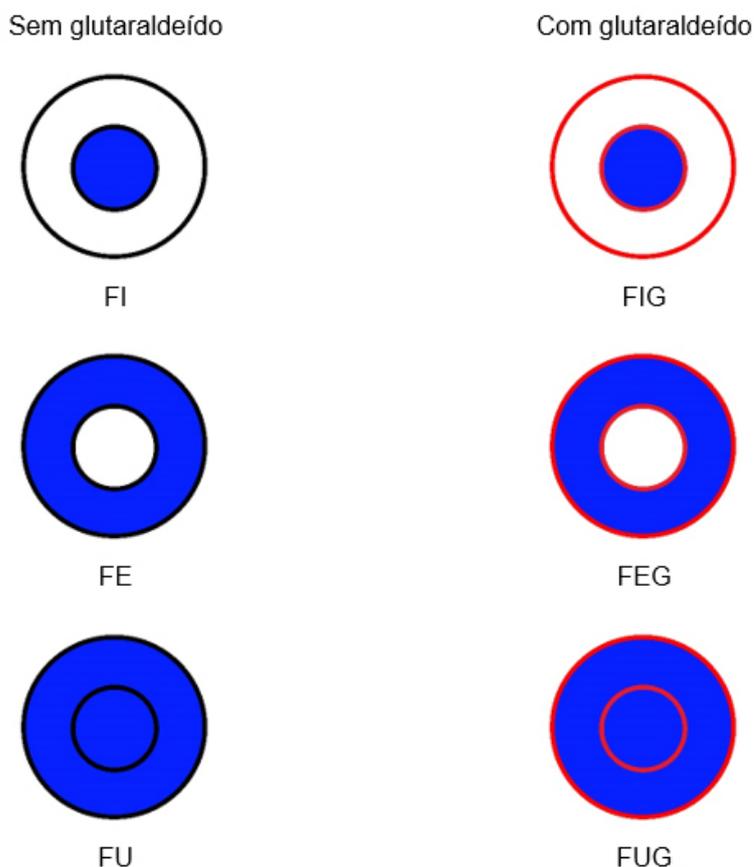
Figura 30 – Imagens das seis conformações obtidas

- a) FI b) FIG
- c) FE d) FEG
- e) FU f) FUG



Esquema das microesferas produzidas com as diferentes combinações entre alginato, quitosana e amilases (com adição e sem adição do agente ligante glutaraldeído).

Figura 31 – Esquema ilustrativo das conformações obtidas pelas sínteses. As porções coloridas indicam a fase onde se encontra as enzimas



Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

O interesse pelo alginato com uma matriz tem aumentado devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e a facilidade de formação de beads utilizando gelificação ionotrópica. Juntamente a todas essas características, é solúvel e degradável nas condições fisiológicas normais.[118]

O estado dobrado é estabilizado principalmente pela inserção e empacotamento de mais de 80% dos grupos peptídeos e cadeias laterais não polares. Se a vida como a conhecemos existir em um solvente que não seja a água, o estado dobrado deve ser estável e solúvel no novo solvente.

As proteínas serão instáveis na maioria dos solventes polares, como o etanol, extremamente estáveis em solventes não polares, como o ciclohexano, e ainda mais estáveis no vácuo.[119]

Uma propriedade importante do alginato é a gelificação ionotrópica, pelo fato de que o polímero é carregado negativamente, sendo tal processo induzido por cations divalentes (ex. Ca^{2+}). Tais soluções de reticulação podem incluir cátions como Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} , enquanto cátions monovalentes e Mg^{2+} não induzem gelificação, e os íons Ba^{2+} e Sr^{2+} produzem géis de alginato muito fortes (Clark e Ross-Murphy 1987). Inúmeros outros cátions, incluindo Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , induzirão a gelificação, mas devido à sua toxicidade, raramente são utilizados. [120]

Estrutura do modelo de 'caixa de ovos', representa as ligação de cátions divalentes a blocos homopoliméricos de resíduos de α -L-guluronato. A quitosana adere facilmente a polímeros naturais, como cabelo e pele, que são compostos de mucopolissacarídeos e proteínas com carga negativa, representando o arranjo dos microgéis. [120]

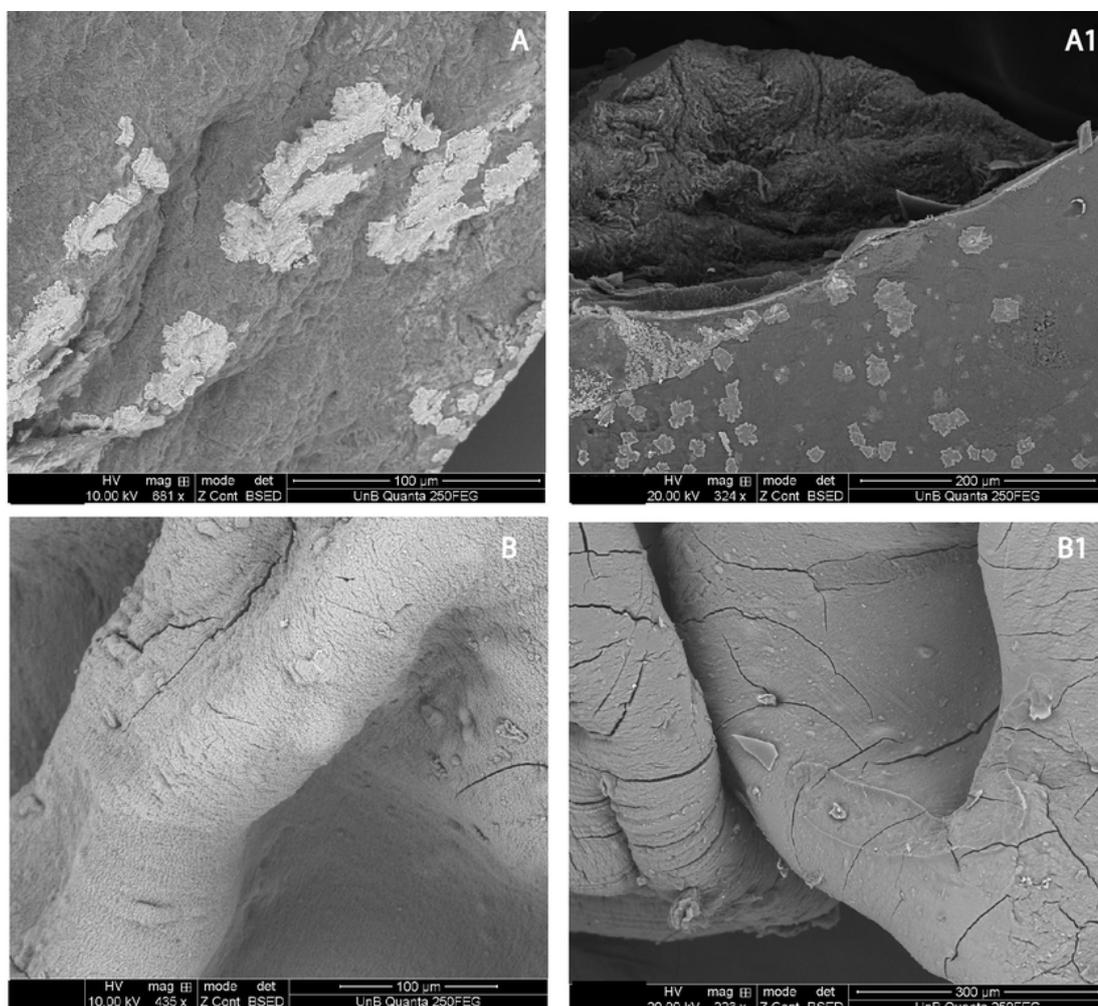
Atualmente, os sistemas complexos de polieletrólitos de quitosana-alginato (PEC) têm sido amplamente utilizados. Comparado com os polímeros constituintes, o PEC apresenta vantagens quando aplicado como membranas de revestimento e sistemas de liberação controlada. Polissacarídeos carregados de maneira oposta em soluções aquosas interagem espontaneamente para formar complexos de polieletrólitos (PECs) quando são misturados. Os complexos polieletrólíticos de quitosana e alginato são formados principalmente por meio de interações coulômbicas entre grupos amino carregados positivamente de quitosana e grupos carboxilatos carregados negativamente de alginato. As propriedades do PEC são determinadas principalmente pelo grau de interação entre os polímeros. Isso depende essencialmente de suas densidades globais de carga e determina sua proporção relativa no PEC. [119]

As proteínas interagem fortemente com os polieletrólitos sintéticos e naturais. Existe ampla evidência para a ligação de poliânions e policátions a proteínas abaixo e acima de seus pontos isoelétricos, respectivamente. Essas interações podem resultar em complexos solúveis, coacervação complexa ou na formação de precipitados amorfos. As consequências práticas dessas mudanças de fase podem incluir o uso de polieletrólitos para separação de proteínas e imobilização ou estabilização de enzimas em complexos de polieletrólitos. Nessas duas aplicações, os estados físicos ideais do sistema são diferentes. No caso de imobilização enzimática, estados altamente desagregados podem ser menos ativos. Nos processos de purificação ou separação envolvendo sedimentação ou filtração, a agregação é desejável. Para uma sedimentação eficiente, os agregados compactados são preferidos, enquanto nos processos de filtração são necessários mais agregados de textura aberta para permitir a penetração adequada do solvente. No entanto, em ambos os casos, a agregação deve ser essencialmente reversível. [118]

O método de imobilização e as propriedades mecânicas da matriz são, portanto, fatores significativos que afetam a estabilidade operacional do biocatalisador. Entre diferentes técnicas de imobilização, o aprisionamento em gel de alginato de cálcio oferece muitas vantagens devido à sua simplicidade e caráter não tóxico. Além disso, alterando as condições de gelificação, é possível controlar facilmente algumas das características da matriz, como espessura ou permeabilidade a diferentes substratos da membrana do gel. Este método leve e barato envolve a adição gota a gota das enzimas em solução de alginato de sódio ou quitosana em uma solução de CaCl_2 , na qual as enzimas são imobilizadas em gel de alginato de cálcio precipitado na forma de microgéis.[118]

4.4 Caracterização Morfológica e Superficial dos microgéis utilizando Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Figura 32 – Morfologia externa dos microgéis obtidos por MEV a 10–20 kV, com o detector de Back-scattered Electron – BSED. (A) FI-magnificação de 100×, (A1) FIG-magnificação de 1000×; (B) FE-magnificação de 100×, (B1) FEG-magnificação de 1000×;



Os resultados demonstram que as diferenças entre os microgéis feitos é nítida. Demonstrando a geometrificação das formas nos métodos de imobilização onde se utilizou-se glutaraldeído. Tais resultados demonstram que o polímero por se tornar mais rígido devido as interações entre suas próprias cadeia mas também a maior insolubilização das proteínas pode reduzir a interação entre os polímeros e as proteínas, mais especificamente as enzimas, levando a uma menor atividade, quando se compara a quantidade de enzima retida.

Em FI, FIG, FE e FU, se teve a atividade enzimática preservada, e apesar de que em FIG, se tem uma redução devido aos fatores acima citados. As demais conformações por terem seus grupamento amino e hidroxila não sujeitados a ação do agente ligante, tiveram maior interação com as proteínas presentes em EB, gerando assim então conversões enzimáticas de acordo com sua respectiva técnica de imobilização.

A microscopia eletrônica é a técnica disponível para obter informações estruturais sobre materiais em resolução em escala nanométrica. A microscopia eletrônica de varredura fornece informações da superfície com informações limitadas sobre a estrutura interna. O MEV é uma técnica analítica na qual uma imagem é formada em um tubo de raios catódicos cuja varredura é sincronizada com a varredura de um feixe pontual de elétrons digitalizados sobre a superfície de uma amostra. O dispositivo rebate elétrons na superfície de uma amostra para produzir uma imagem. A técnica fornece duas melhorias notáveis em relação ao microscópio óptico: ela estende os limites de resolução de até 30.000x ou tão altos quanto 60.000x e melhora a profundidade de campo em um fator aproximado de 300. O MEV é uma técnica altamente implementada para caracterizar a superfície morfológica da enzima, bem como o suporte à imobilização. Amostras MEV são comumente usadas para observar a morfologia para confirmar o sucesso da imobilização enzimática. [121]

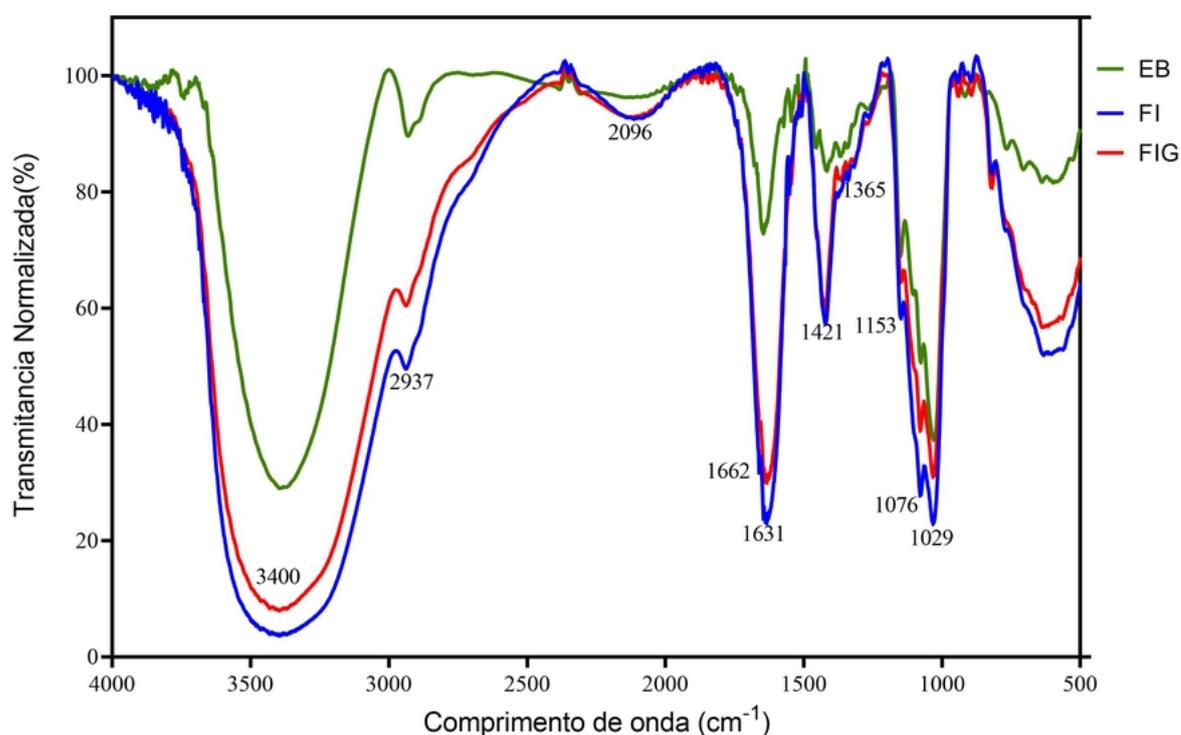
4.5 Caracterização dos microgéis por FTIR

O uso da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem sido considerada uma das técnicas mais eficazes para estudar e entender a química e a química da superfície em vários tipos de compostos, como polisacarídeos.

Sem conhecer o grupo funcional específico, que alterou o comportamento de uma macromolécula, não é possível explicar as diferentes propriedades físico-químicas que alteraram significativamente o desempenho da dos polisacarídeos contituíntes dos microgéis. Além disso, as técnicas de FTIR também podem ser usadas para monitorar a estabilidade e a durabilidade específica dos microgéis em relação ao seu desempenho. Em geral, o uso da análise FTIR no campo da aplicação de polisacarídeos é crucial para apoiar a demonstrar das alterações em suas propriedades e desempenho em várias aplicações.[122]

No presente trabalhos os microgéis obtidos foram secos durante uma semana e posteriormente deixados em dessecador e posteriormente integrados ao KBr para se obter os discos para análise de FTIR. Os demonstrados obtidos são demonstrados abaixo onde a cada linha do gráfico está distinta por cores, sendo a verde o padrão, EB, azul FI, e vermelho FIG (Figura 33).

Figura 33 – Espectros de FTIR obtido nas análises de Esquema da análise pelo método de FTIR ; EB :representado pela cor verde; FI representado pela cor azul; FIG representado pela cor vermelha



A espectroscopia FTIR é tipicamente usada para análise qualitativa de grupos funcionais orgânicos. Como mostrado na Figura 33, as amostras FI, (azul) e FIG (vermelho) exibiram um pico de absorção amplo significativo entre 3000 e 3700 cm^{-1} , que foi atribuído à vibração de alongamento dos grupos de quitosana e / ou a presença de água e se sobrepôs ao pico de vibração de estiramento -NH_2 da quitosana. O pico de aproximadamente 2930 cm^{-1} foi atribuído à vibração de alongamento sp_3 C-H do esqueleto de quitosana. A eficiência dos procedimentos de imobilização em relação à incorporação de enzimas na matriz / quitosana pode ser confirmada pela presença de picos característicos de 1665 cm^{-1} , indicando um grupo amida (CONH). Os picos em 1631 foram atribuídos às bandas de absorção mais típicas da quitosana, relacionadas às vibrações de flexão de N-H e ao alongamento de C = O, enquanto a banda de 1602 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de flexão de C = C. A região da banda de 1345-1421 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração de flexão dos grupos metil C-H.

De acordo com Simsek-Ege et al. a banda observada em 1420 cm^{-1} na mistura pode ser atribuída à interação de -NH^{+3} de quitosana com -COO^{-} de. Eles também exibiram uma banda específica de 1030 a 1240 cm^{-1} , dominada pelas vibrações dos anéis sobrepostas às vibrações de alongamento dos grupos laterais (C-O-H) e a vibração da banda (C-O-C). O pico a 1082 cm^{-1} foi devido ao alongamento da ponte C-O-C assimétrica no anel da quitosana. Com a incorporação da enzima, o espectro dos microgéis foi semelhante em *beads* de quitosana em branco, exceto por uma mudança em comprimentos de onda específicos. As mudanças no comprimento de onda em aproximadamente 2929 cm^{-1} (alongamento CH), 1642 cm^{-1} (alongamento C = O da amida secundária) e 1080 cm^{-1} (alongamento COC de éter cíclico) podem ser explicadas pela interação de com quitosana. Mesmo após a lavagem em série com água destilada, as enzimas foram mantidas, embora qualquer sinal de ligação específica, indicando ligação entre o suporte e as ligações N-N, se formou, que é a principal reação mediada pela fase principal nas enzimas de conformação representadas.

A rede de polieletrólitos é formada pela interação entre os grupos funcionais dissociados: um grupo carboxi aniônico de alginato e um grupo amino catiônico da quitosana, ligação de hidrogênio intra e inter-cadeia entre diferentes partes das estruturas dos polissacarídeos e entre agregados já criados de partículas de alginato–quitosana. A complexação de polieletrólitos leva à formação ou precipitação de coacervados e hidrogéis. A ocorrência desses processos depende da concentração do reagente, força iônica, pH, temperatura, ordem de mistura, flexibilidade dos polímeros e composição química dos polímeros. Os complexos de polieletrólitos da quitosana e do alginato de sódio podem ser formados por vários métodos; um processo de uma etapa envolve a adição gradual de solução de quitosana ao alginato. Um método alternativo é produzir um revestimento multicamada (camada por camada, bicamada): a solução de quitosana é derramada / pulverizada sobre um revestimento de alginato seco, ou o alginato é imerso em uma solução de quitosana e lavado com água destilada após um certo tempo de interação.[123]

Em um trabalho onde se avaliou a interação entre os dois polímeros se alterando suas concentrações, um pico em 1730 cm^{-1} possivelmente correspondia ao alongamento assimétrico dos grupos -COO , o que confirma a formação do complexo polieletrólítico. No entanto, quando a proporção de polímeros foi de $\pm 0,6$, a intensidade do pico foi observada a 1398 cm^{-1} , confirmando maior interação eletrostática em amostras com uma proporção de polímero mais próxima do balanço estequiométrico ($R < 1,0$). A presença das bandas acima mencionadas na mistura polimérica de ACH indica o aparecimento de ligações iônicas entre os grupos quitosana amina e o grupo carboxila do alginato.[124]

Como as interações entre polímeros e proteínas podem ser avaliadas pelo FTIR, no entanto, no presente trabalho não foi evidenciado nenhuma alteração que se mostre conformações distintas entre si.[124]

As caracterizações por FTIR pode se dar se avaliando a inserção de materiais inorgânicos determinando sua interação entre os polímeros, e tais compostos. Em um trabalho foram feitas avaliações nas alterações nos materiais, tendo principalmente seu o diâmetro médio das beads de alginato e alginato-argila como principal parâmetro, obtendo-se um diâmetro final após o encapsulamento de 2,6 mm.[124]

As interações de da quitosana com proteínas foram feitas para investigar a interação entre moléculas de quitosana e proteína de soro de leite em termos de pH e aquecimento. As medidas de FTIR, análise reológica, turbidez e potencial zeta foram usadas para avaliar essa interação. A pH 4,0, a adição de quitosana de baixa quantidade com a proporção de 1: 5 de quitosana / isolado de proteína de soro de leite (C / WPO) impediu efetivamente a desnaturação das proteínas de soro de leite após o aquecimento, enquanto a alta quantidade de quitosana (C / WPO de 1: 2) levou ao esgotamento da floculação. A combinação de quitosana e proteínas de soro de leite foi atrativa eletrostática a pH 5,5 e 6,0. Com baixa adição de quitosana, os complexos formados em pH 5,5 apresentaram maior viscosidade e os complexos formados em pH 6,0 apresentaram comportamento de afinamento por cisalhamento. Com alta adição de quitosana, os complexos apresentaram alta viscosidade a pH 6,0. O aquecimento levou à diminuição da viscosidade e aumento da turbidez. Os resultados demonstraram que a quitosana e a proteína do soro de leite formaram complexos diferentes a pH 5,5 e 6,0, e a complexação da C / WPO foi influenciada pelo aquecimento e pela proporção de proteínas da quitosana e do soro de leite. Esse fenômeno ocorreu devido à combinação de quitosana com moléculas de proteína, que restringiram o movimento de flexão dos grupos NH^{3+} . Esta banda desapareceu com alta adição de quitosana (C / WPI de 1: 2) após o aquecimento, indicando que o aquecimento promoveu o comportamento de complexação da proteína do soro de leite e da quitosana. Por meio da espectroscopia de infravermelho, determinando exatamente a reação ocorrida, devidos as variações de pH. [125]

As misturas à base de proteína de soja foram processadas por extrusão com parafuso duplo e os efeitos de diferentes tipos e conteúdos de polissacarídeos foram analisados. Embora a extrusão não tenha sido amplamente utilizada para esse tipo de blendas, neste estudo observou-se que o aumento do conteúdo de polissacarídeos nas blendas causou uma diminuição da energia mecânica específica, facilitando o processo de extrusão e mostrando o potencial desse processo, o que é mais econômico em escala industrial. Para explicar esse comportamento, foi realizada análise espectroscópica no infravermelho, principalmente nas regiões amida I e II. Além disso, a análise de ajuste de curvas mostrou as alterações conformacionais produzidas nas blendas devido à adição de polissacarídeos, que afetaram a desnaturação da proteína. Essas mudanças também afetaram propriedades como o teor de umidade e a matéria de solubilidade total. No entanto, as alterações conformacionais não mostraram efeitos significativos em relação à densidade da peça ou na taxa de expansão dos grânulos. A

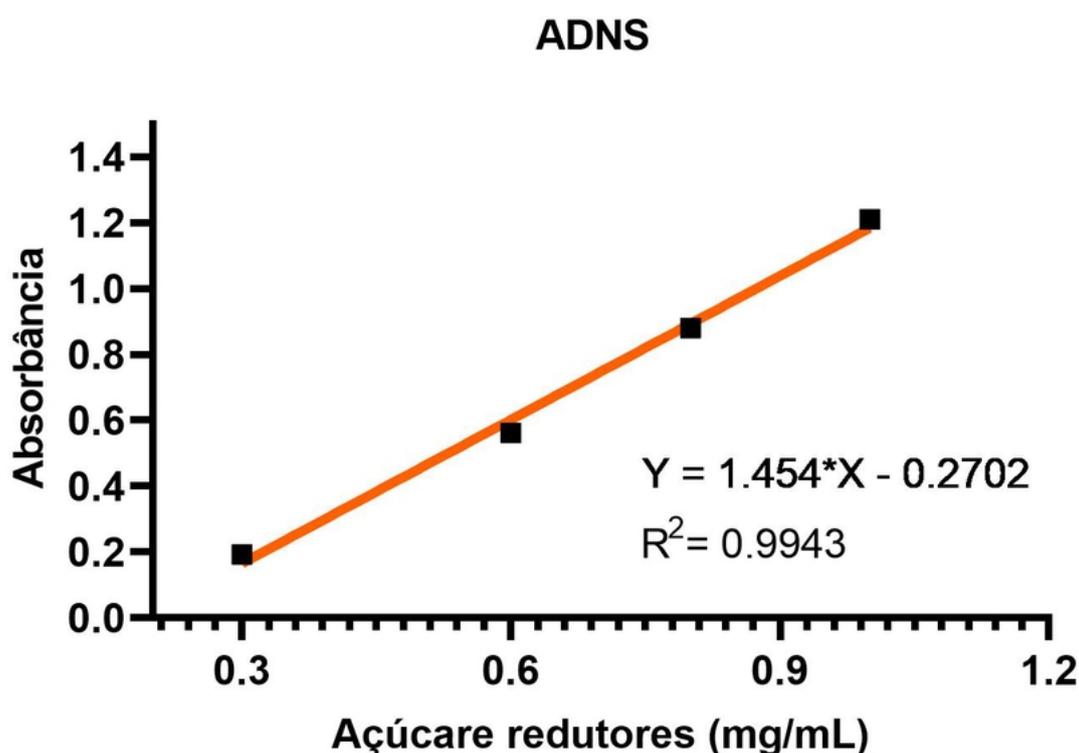
análise quantitativa das alterações nas regiões amida I e II forneceu novas informações sobre as modificações produzidas em misturas baseadas em proteínas modificadas com polissacarídeos. Nesse contexto, a espectroscopia no infravermelho forneceu um meio conveniente e poderoso para monitorar as interações entre todos os ingredientes usados na formulação da mistura, o que é de grande importância para explicar as alterações nas propriedades funcionais dos materiais biodegradáveis usados para aplicações industriais nas indústrias alimentícia e farmacêutica. [126]

Interações mais sutis podem ser verificadas, elucidando os mecanismos reacionais responsáveis por alterações específicas. Um procedimento para a análise simultânea de polissacarídeos da parede celular, amidas e poliésteres alifáticos por transmissão por microscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi estabelecido para pétalas de *Arabidopsis*. A combinação de imagens de FTIR com derivatização de espectros revelou que as pétalas, ao contrário de outros órgãos, têm um zoneamento químico característico com alta quantidade de compostos e ésteres alifáticos na lâmina e de polissacarídeos no caule da pétala. A região de dobradiça das pétalas era particularmente rica em amidas e também em vibrações potencialmente associadas à hemicelulose. Além disso, vários outros padrões de distribuição foram identificados. Análises de mutantes na deposição de cutina confirmaram que as vibrações de compostos alifáticos e ésteres presentes na lâmina estavam amplamente associadas ao poliéster cuticular. [127]

Outro estudo conferiu a interpretação da literatura atual dos espectros de FTIR em PECs de alginato-quitosana. Demonstramos que nenhuma mudança significativa na posição da banda das duas vibrações carbonílicas do alginato ocorre após a interação com diferentes espécies iônicas. No entanto, a protonação do grupo carboxilato faz com que uma nova banda apareça a 1710 cm^{-1} , como previsto. Além disso, foi elucidado que a protonação parcial do grupo amina de quitosana causa o aparecimento de uma nova banda (1530 cm^{-1}) devido a um dos modos vibracionais -NH^{3+} (o outro modo se sobrepõe à banda amida I). É importante ressaltar que a posição das duas bandas principais na região espectral de interesse em filmes de quitosana parcialmente protonada não depende da extensão da protonação. Para avaliar isso, é necessário obter varreduras estreitas do XPS N 1s. No filme estudado de quitosana-alginato, precipitado e montagem de LbL, as bandas observadas no FTIR correspondem às espécies -COO^- e -NH^{3+} , mas sua posição não é diferente de cada um dos componentes. Assim, o FTIR não pode ser usado diretamente para identificar a presença de PECs. No entanto, em combinação com o XPS, usando as varreduras de pesquisa e as N1s estreitas, é possível obter uma descrição mais completa da estrutura. Um resultado semelhante encontrado em nossa avaliação, que apesar de e ter diversas repostas hidrolíticas e de concentração de proteínas diferentes dentre as conformações, não é possível ter um distinção clara entre os microgéis obtidos por FTIR. [128]

Das interações mais sutis como a interação entre um polissacarídeo e outro, juntamente as análises complementares possíveis, podendo também investigadas interações mais complexas e que ficam mais evidenciadas, podem ser feitas pelo método de FTIR.

Figura 34 – Curva de calibração de açúcares redutores pelo método de ADNS

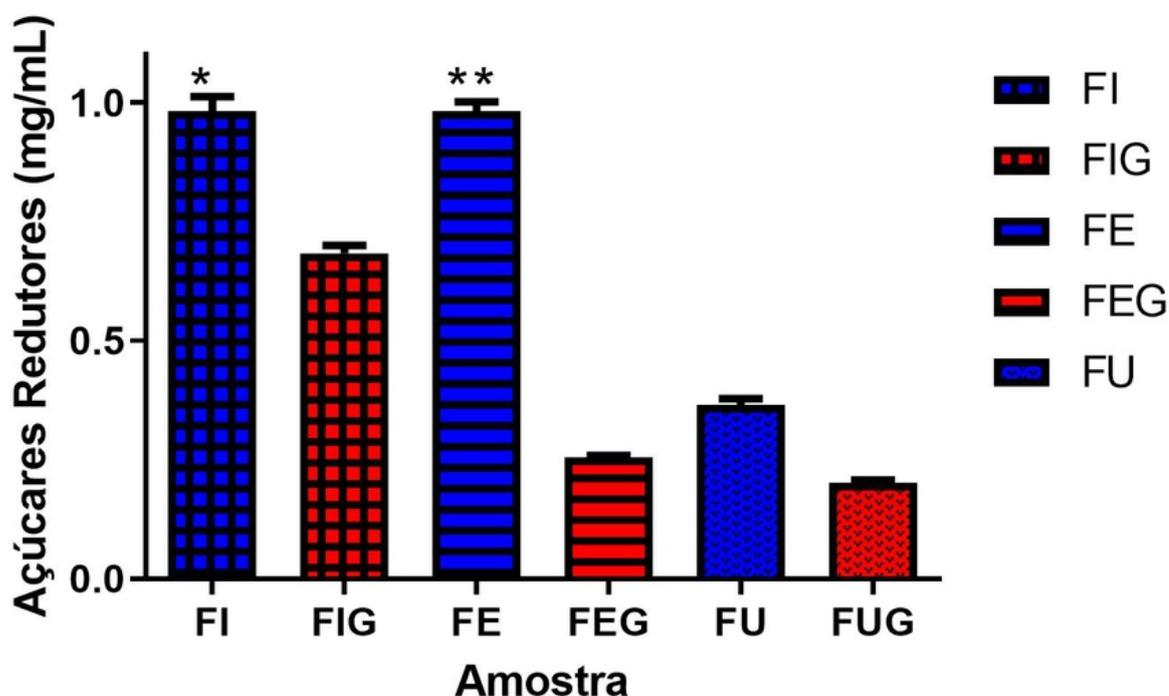


4.6 Método de caracterização pelo teste de hidrólise

Dos dados de absorbância das amostras foi utilizado a equação da curva abaixo (Figura ??), onde se construiu um gráfico das atividades hidrolíticas de cada formulação testada.

Gráfico que demonstra a quantidade de açúcares redutores obtidos na hidrólise enzimática da solução de amido 1% (p/v) utilizando as diferentes microesferas de amilases imobilizadas (Figura 35).

Figura 35 – Gráfico da produção de açúcares redutores pelo processo de hidrólise de diferentes conformações

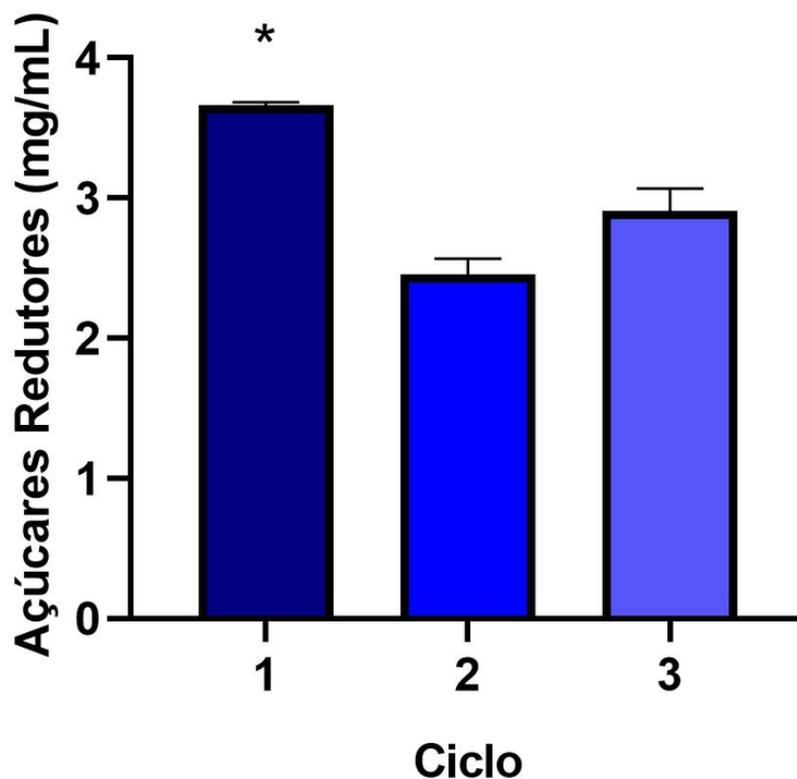


FI: Fase Interna (amilases situaram-se na fase interna do suporte); FIG: Fase Interna com adição do glutaraldeído; FE: Fase Externa (amilases situaram-se na fase externa do suporte); FEG: Fase Externa com adição do glutaraldeído; FU: Fase Interna e Externa (amilases situaram-se tanto na fase interna quanto na fase externa do suporte); FUG: Fase Interna e Externa com adição do glutaraldeído.

As seis amostras avaliadas, tiveram suas medidas feitas em triplicadas e posteriormente feito o teste estatístico mais adequado para análise dos dados. O teste escolhido foi o *One way Anova* ($p < 0,05$), demonstrando diferença significativa entre as amostras, exceto entre FI e FE que produziram quantidades de açúcares redutores iguais em ambos testes. Apesar de tais concentrações de açúcares produtores serem iguais, no que se refere à síntese, as conformações de fase interna apresentam maior rendimento em termos de massa. Na síntese de FI e FIG, se obteve 16,88g e 17,10g respectivamente, de microgéis com enzimas imobilizadas. Em FE e FEG se obteve 2,33g e 2,17g respectivamente, demonstrando o baixo rendimento do método onde se imobilizou a enzima na fase externa.

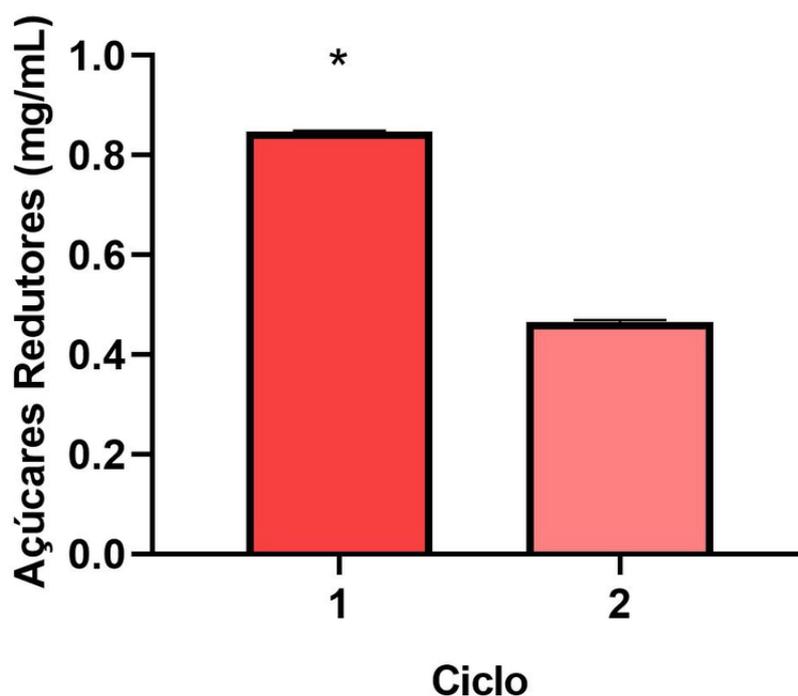
A concentração de açúcares redutores obtidos na hidrólise enzimática da solução de amido 1 % (p/v) durante três ciclos de reuso, utilizando as microesferas com a conformação FI (amilases situaram-se na fase interna do suporte) (Figura 37).

Figura 36 – Concentração de açúcares redutores obtidos durante os ciclos de FI



A concentração de açúcares redutores obtidos na hidrólise enzimática da solução de amido 1 % (p/v) durante dois ciclos de reuso, utilizando as microesferas com a conformação FIG (amilases situaram-se na fase interna do suporte, ligadas pelo glutaraldeído) Figura 37.

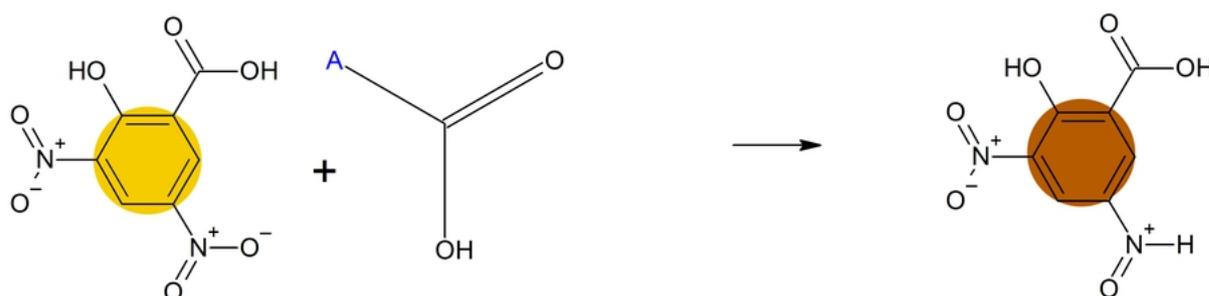
Figura 37 – Concentração de açúcares redutores obtidos ao longo de sucessivos ciclos utilizando o suporte FIG



Concentração de açúcares redutores obtidos na hidrólise por meio do suporte na conformação FIG

No ensaio colorimétrico as moléculas fazem dispersão da luz, que por sua vez constitui a medição da atividade de amilases, usando amido como substrato. A atividade da amilase é quantificada através de um método bem estabelecido ensaio do ácido dinitrosalicílico (DNS). Sob condições alcalinas, açúcares redutores reduzem o ácido 3,5-dinitrosalicílico para 3-amino-5-nitrosalicílico Figura 38, resultando em uma mudança de cor de amarelo para marrom avermelhado, que pode ser monitorado a 540 nm. Como o substrato é uma pasta turva de amido, qualquer amido remanescente de hidrólises incompletas irá interferir com medições espectroscópicas subsequentes. [129]

Figura 38 – Reação de ADNS



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

4.7 Análise de amido residual

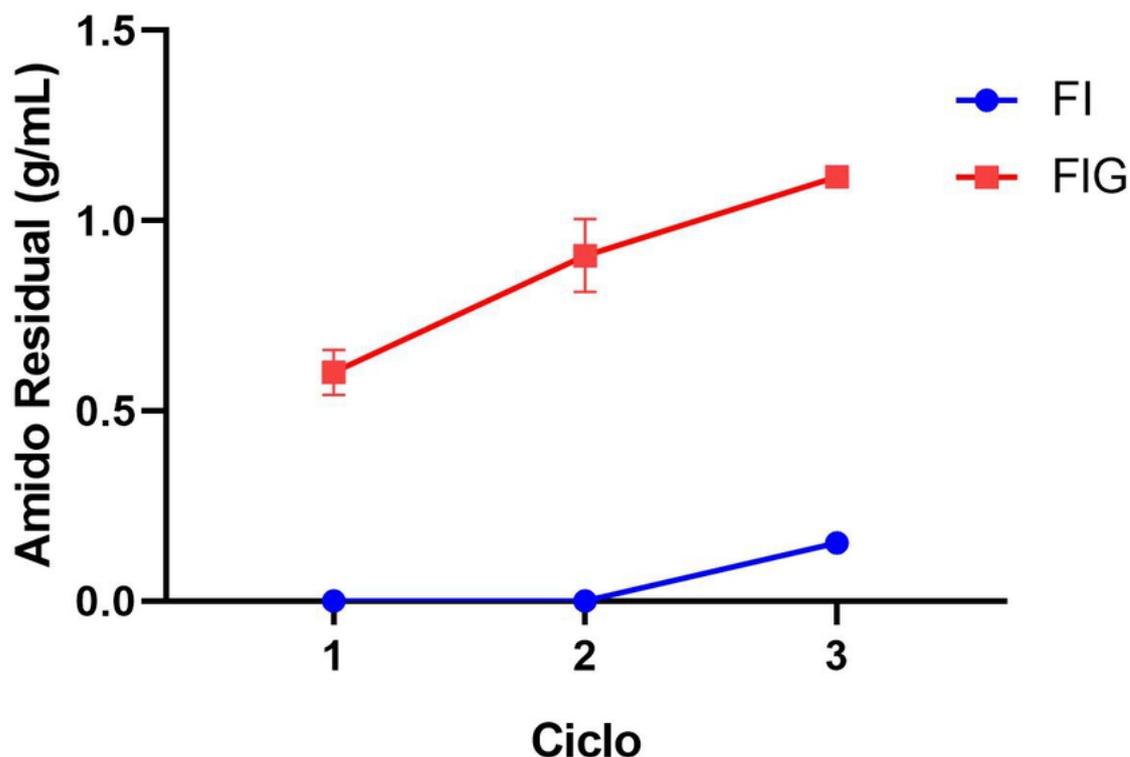
A hidrólise parcial do amido se demonstra como um novo horizonte a ser explorado dentro da biotecnologia. Os produtos de reações parciais de hidrólise podem ser trabalhados em diversas perspectivas, principalmente da indústria farmacêutica e alimentícia. No presente trabalho foi feita análise de amido residual, por meio do método de complexação do iodo, avaliando a hidrólise do amido, por meio de tal método ao longo dos ciclos, demonstrando que a presente tecnologia se mostra aplicável não somente na produção de açúcares redutores mas, também na obtenção de derivados do amido. A conhecida coloração azul do amido com iodo é devida ao complexo amilose-iodo e é muito usada para medir quantitativamente a amilose no amido, sendo aqui o método utilizado para a avaliação de amido residual.[104]

Concentração de amido residual obtido na hidrólise enzimática da solução de amido 1 % (p/v) durante três ciclos de reuso, utilizando os microgéis com a conformação FIG (amilases situam-se na fase interna do suporte).

Para se medir a quantidade de amido residual se utilizou um solução de iodo e iodeto de potássio(Lugol) para se misturando essa solução as alíquotas amostradas da reação de hidrólise.

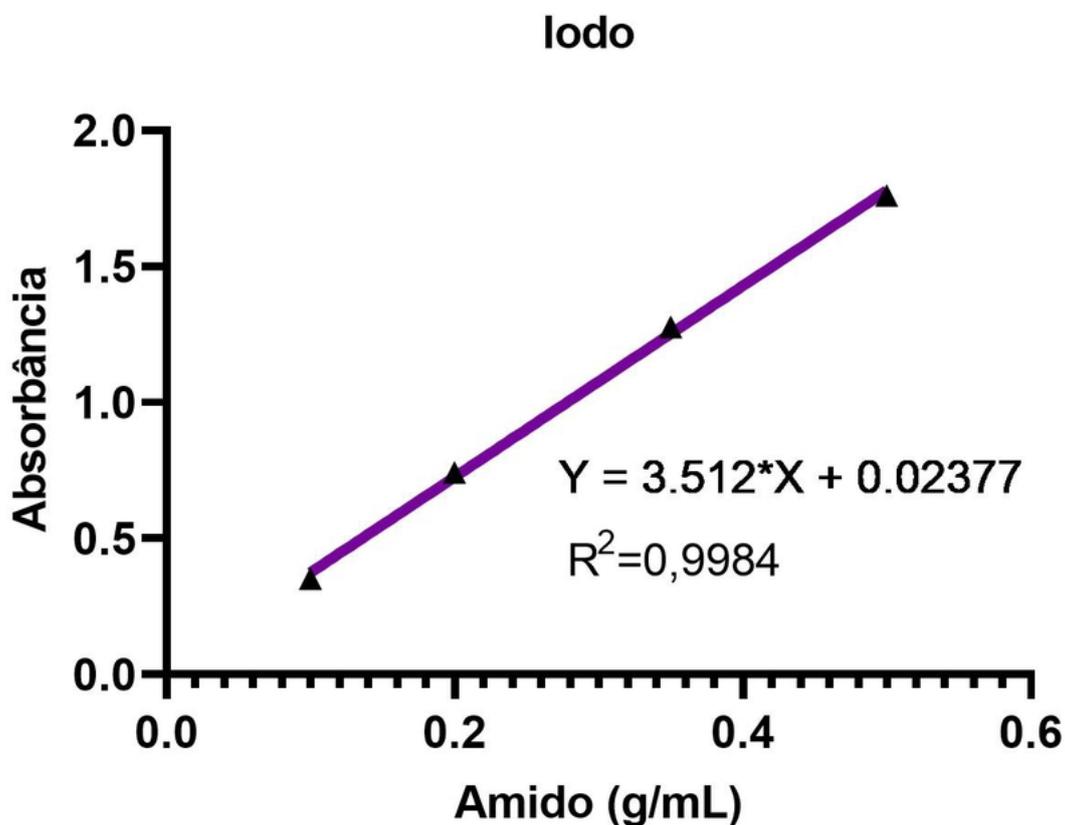
Figura 39 – Quantificação de amido residual em FI e FIG ao longo dos três ciclos de reuso dos microgéis.

1: primeiro uso das microgéis com amilases imobilizadas; 2: segundo reuso das microgéis com amilases imobilizadas; 3: terceiro uso das microgéis com amilases imobilizadas.



O teste de quantificação de amido residual, foi utilizado como um indicador complementar para indicar a hidrólise feita pelos microgéis que não é detectável se fazendo a quantificação de açúcares redutores. Como demonstrado no teste de quantificação de açúcares redutores, FI se demonstra alta taxa de hidrólise, deixando nos 2 primeiros ciclos a concentração de amido residual, nula, conseqüentemente, nenhuma cadeia de amilose detectável pelo teste, atingindo $0,15 \pm 0,02$ g/mL de amido residual no terceiro ciclo. FIG se inicia em produzindo concentrações $0,60 \pm 0,06$ g/mL amido residual, posteriormente $0,90 \pm 0,09$ g/mL no segundo e último ciclo.

Figura 40 – Curva de calibração do método do iodo



Uma das características mais características do amido conhecido há muito tempo é a suposição de cor azul no contato com o iodo. Durante a evolução da química do amido, o fato já enfatizado por Aquene e Roux, em 1905, de que o amido consiste em dois componentes, foi totalmente comprovado. Um dos componentes é a amilopectina, que constitui, de acordo com as espécies de amido, cerca de 70-80% do grânulo de amido (alguns amidos cerosos podem consistir em até 100% de amilopectina). A amilopectina constitui apenas 20 a 30% amidos de ervilha). A amilopectina é de estrutura altamente ramificada e dá uma coloração vermelho-violeta-vermelho ou marrom-avermelhado com iodo, dependendo do seu tipo, ou mais especificamente no presente trabalho, grau de hidrólise (Figura 41). A quantificação de amido residual, foi submetida a uma amostragem de suas medidas feitas em triplicadas e posteriormente feito o teste estatístico mais adequado para análise dos dados. Em ambas amostras o Teste-t não pareado ($p < 0,05$), demonstrando diferença significativa entre as amostras, entre os três ciclos avaliados.

Figura 41 – Tubos de ensaio representando a reação do iodo para a quantificação do amido



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

A coloração azul com iodo ocorre apenas no componente “chamado amilose que consiste em glicose com ligações alfa-1,4 < e não é ramificada. Alguns autores atribuem a reação da cor azul a um fenômeno de adsorção no qual agregados coloidais estão envolvidos. Alguns outros se referiram à formação de complexos, outros tentaram provar a existência de um determinado composto. A última teoria foi amplamente reconhecida no momento em que ainda se acreditava que o amido consistia em uma molécula determinada.

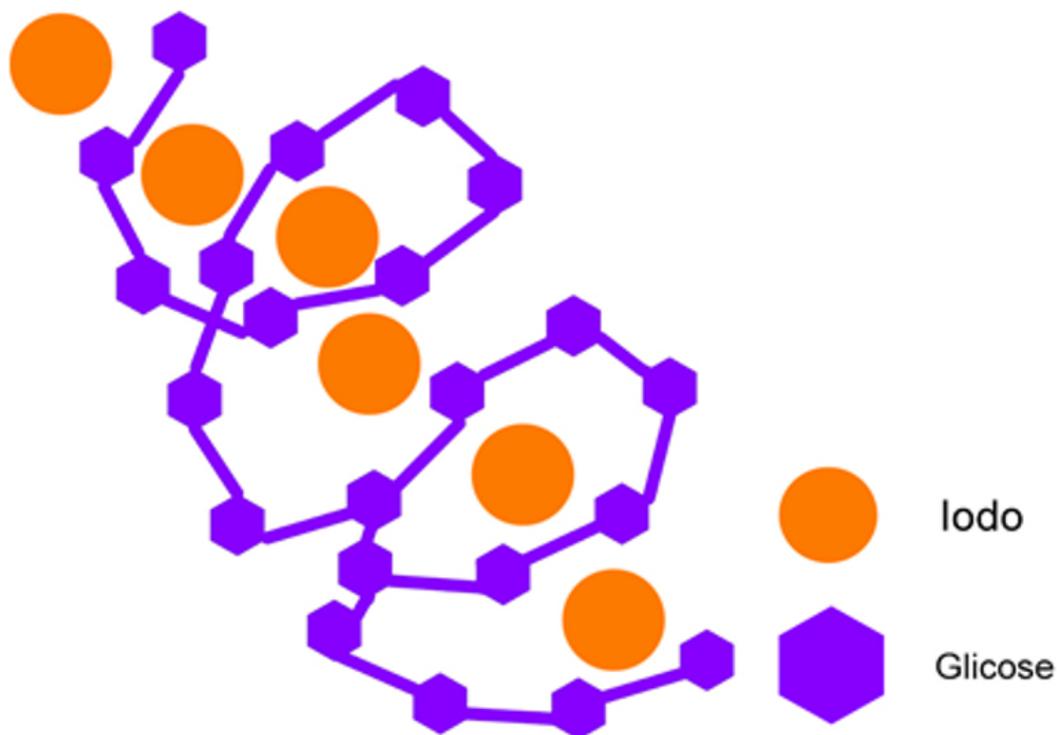
A reação amido-iodo conhecida por todos os químicos desde cursos elementares em análises qualitativas e quantitativas foi descoberta por Colin e Claubry em 1814. Apesar das inúmeras investigações que foram realizadas para explicar a natureza do cromóforo absorvendo a 620 nm, que confere ao complexo amido-iodo ou “azul do iodo” a característica cor azul intenso, muitas controvérsias ainda existiam sendo resolvidas até certo ponto nos últimos anos.[130]

Os resultados até agora descritos, podemos dão algumas respostas claras às perguntas relacionadas à estrutura do complexo amilose-iodo. A hélice de amilose orientadas para esquerda e contém um canal central de 5 Å de largura no qual os átomos de iodo são incorporados. Eles claramente não formam exclusivamente triiodeto

(13) n, deve-se que assumir outras espécies como já observado no complexo. A unidade em zig-zag de iodo pode se endireitar facilmente para se ajustar ao canal mais estreito formado por ou por hélices de amilose. Pode ser que as unidades I encontradas em complexos com alfa ciclodextrina e com ácido triásico cujo, forma um artefato baseado nas periodicidades de 15,5 Å das matrizes circundantes. Deve ser cauteloso ao extrapolar dados derivados de estudos de monocristais com a hélice linear e infinita de amilose, onde a repetição real é de 8 Å / 6 glicoses ou 1,33 Å.[131]

Por algum tempo se assumiu que as espécies de iodo realmente envolvidas no complexo amilose iodeto era I_5 , conforme sugerido por estudos espectroscópicos cristalográficos e Raman e I129, o que confirma o entendimento de que a unidade de iodo abrange variedades de uma ampla gama de com modulação em distâncias que variam de três e dois iodos (I_3-I_2) podendo também se constituir ($I_2 - I - I_2$). Uma unidade I_5 com separação I-I exatamente equidistante ainda não foi observada e representaria um caso especial. As unidades de iodo, individuais estão alinhadas a distâncias muito mais próximas do que a respectiva soma dos raios de van der Waals e são ligadas por ligações que utilizam orbitais de $5p_x$. Essa ligação facilita a deslocalização de elétrons ao longo da cadeia de poliiodeto e explica a cor azul profunda dos respectivos complexos[131]

Figura 42 – Representação da reação de complexação das cadeias de amilose do amido com o iodo



Fonte: Produção de amilases fúngicas imobilizadas em microgéis de alginato-quitosana para produção de açúcares redutores

Foi relatado a preparação e caracterização cristalográfica de raios-X da primeira cadeia polimérica homoatômica cristalina, que faz parte de um complexo semiconductor de pirroloperileno-iodo. A estrutura cristalina contém poliodieto infinito I. A estrutura do iodo no complexo insolúvel de amido-iodo azul permaneceu não descrita por muito tempo, mas tem sido especulada como possuindo infinitas cadeias de iodo. Semelhanças são próximas nos espectros Raman de baixa frequência no complexo iodo-amido apontando também para essas cadeias infinitas de poliodeto.[130]

4.8 Taxa de atividade em função da variação de pH e temperatura

Figura 43 – Teste da estabilidade dos microgéis e EB em diferentes pHs

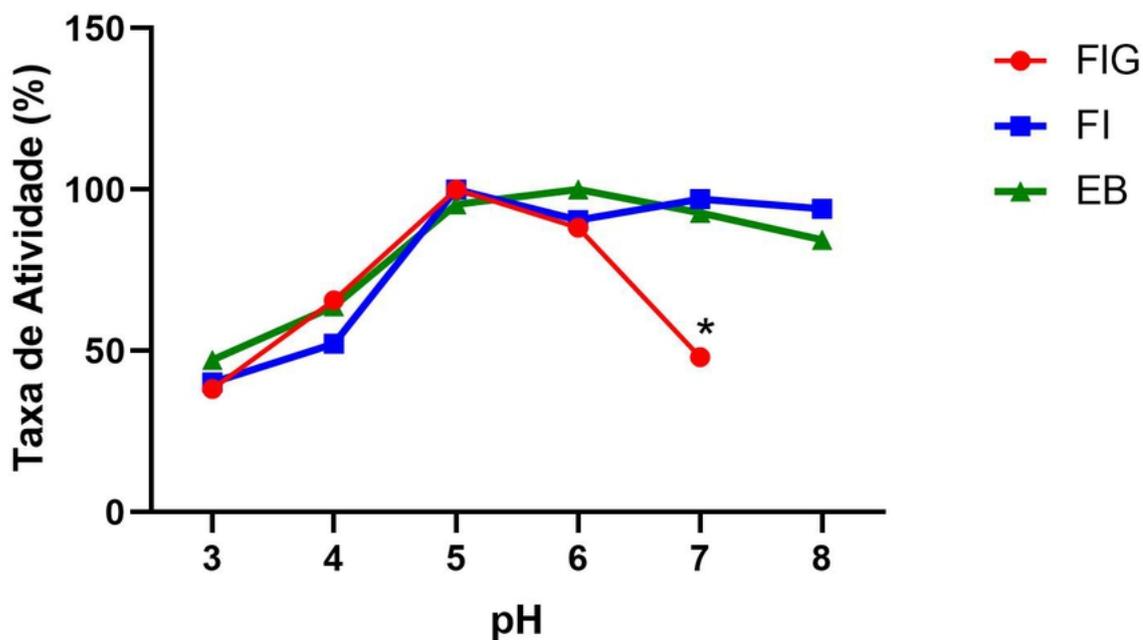
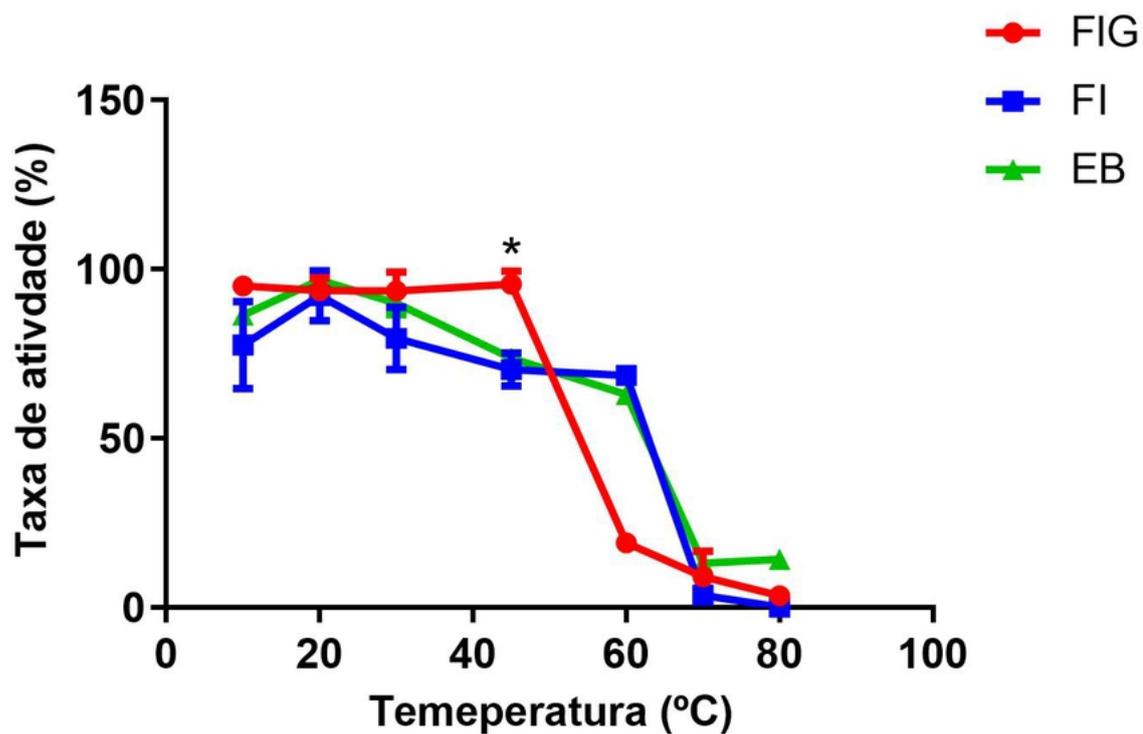


Figura 44 – Teste da estabilidade dos microgéis e EB em diferentes temperaturas



As condições ideais para atividade enzimática máxima diferem para enzimas livres e imobilizadas, dependendo do tipo de suporte, método de ativação e método de imobilização. Dessa forma, se variou o pH (pH: 3,0 a 8,0) e temperatura (Temperatura 10 °C a 80 °C). A quantidade de enzima imobilizada foi de 0,22 g de microgéis e 500 μ L de EB com o tempo de incubação foi fixado em 60 min.

Ao se selecionar o suporte, a alta afinidade (ou capacidade) de se ligar as enzimas e uma estrutura química adequada (% de hidrofobicidade) para fornecer atividade enzimática máxima e contato enzima-substrato. Tal propriedade é importante pois, gera uma interação com as cadeias laterais polares do aminoácidos, mantendo a enzima ligada ao suporte. Juntamente a tal propriedade, a enzima imobilizada, não entra em contato direto com o meio, dando a ela estabilidade a variação de pH e nas mudanças de temperatura. A imobilização contínua da lipase de *Pseudozyma hubeiensis* adsorção, conferiu a enzima um grande aumento tanto na sua estabilidade em diferentes pH e temperaturas. [132]

Os resultados descritos acima houve um aumento, no caso de FIG na estabilidade térmica da enzima, e uma preservação da atividade nos diferentes pH e temperaturas testadas.

Nos testes de temperatura FIG desempenhou uma maior taxa de atividade em 45 °C com uma média de sua taxa de atividade de $96,44 \pm 3,10\%$, comparados a $73,66 \pm 0,02\%$ de EB e $68,32 \pm 0,30$ de FI.

Em contrapartida durante o teste de pH, FIG se desfez no pH 8,0 por completo. Isso se deve ao enrijecimento da estrutura conferida pelo glutaraldído, a estrutura dos polisacarídeos, podendo auxiliar na reticulação, entretanto também comprometendo a taxa de atividade enzimática.

Para o teste da taxa de atividade controlando a temperatura e um nível de significância de 5% ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey, existe diferença entre as médias de taxa de atividade com relação aos tratamentos (FIG e FI) e o extrato bruto. Entre os tratamentos, ou seja as conformações testadas, não existe evidências estatísticas para concluir que possuem taxas de atividades diferentes. O mesmo pode se concluir para a comparação no teste de estabilidade em diferentes pHs, exeto no pH de 8, e na temperatura de 55 °C.

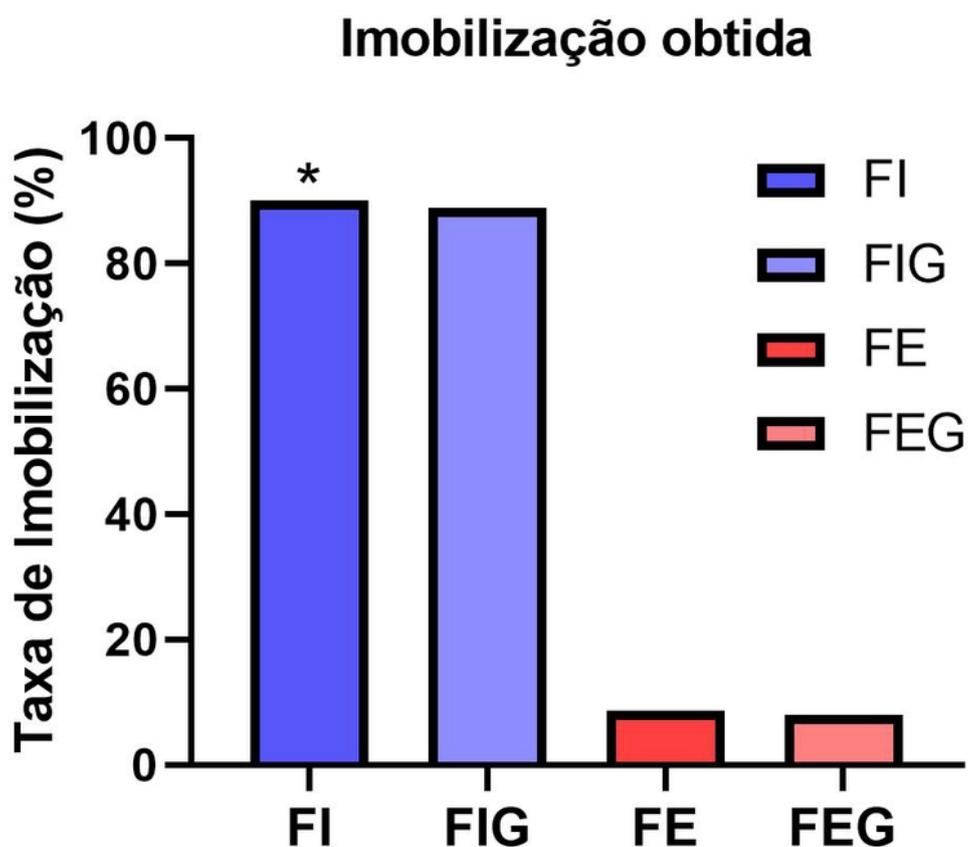
O teste de Tukey é utilizado para múltiplas comparações entre tratamentos específicos e projetado para manter a taxa de erro tipo I (rejeitar a hipótese de que as médias são iguais, dado que elas são diferentes) a um nível de significância α (5%). O teste é baseado na estatística T que tem o objetivo de verificar o pressuposto entre diferença de duas médias, dessa forma, o teste de Tukey faz as múltiplas comparações necessária de acordo com a necessidade mantendo a significância sob controle.

Usualmente, a características necessárias para se obter os objetivo principais do procedimento de imobilização que são uma alta atividade, estabilidade operacional, reuso e aumento do tempo de estoque da enzima. Para se chegar a essas característica o uso de um agente de cross-linking foi utilizado, não se obtendo grandes ganhos com seu uso. [133]

4.9 Taxa de imobilização através da Avaliação de atividade amilolítica do sobrenadante

Após o processo de síntese/imobilização, obteve-se valores do total de EB que foi imobilizado, sendo que tais valores apresentados na Figura45, não representam o total de enzimas imobilizadas, pois, são apenas taxas preliminares, para se calcular, *Overall Immobilization*, que reflete de fato a quantidade de enzimas imobilizadas e ativas, disponíveis para efetuar a catálise do amido (Figura 46)

Figura 45 – Imobilização obtida total de EB

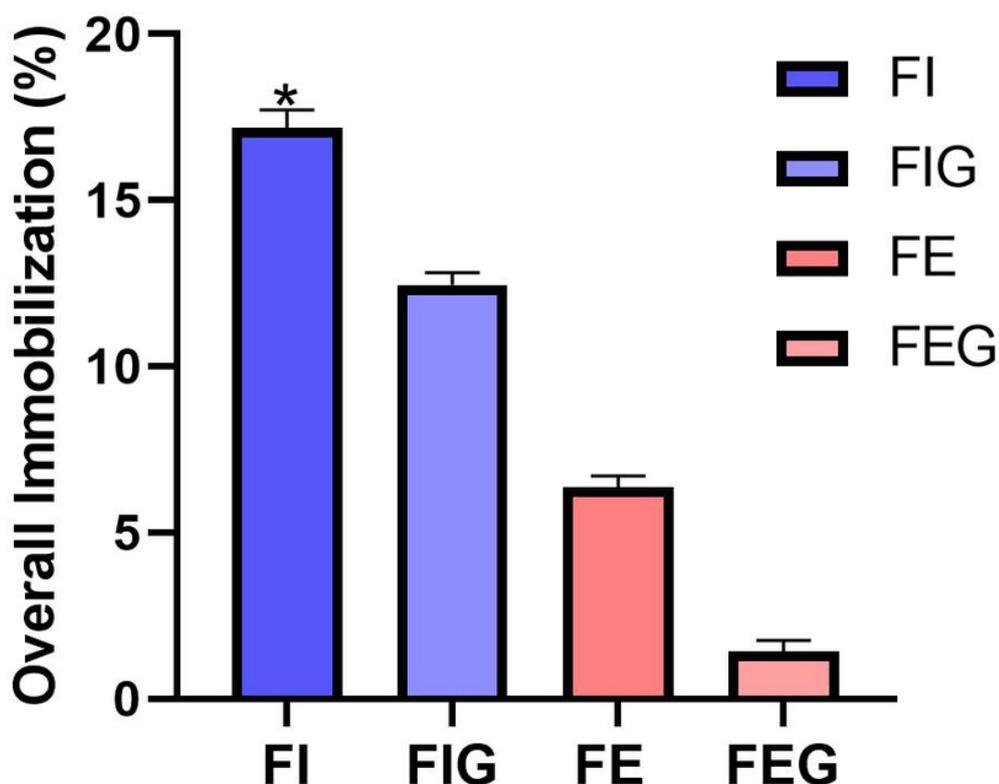


No estudo feito onde houve comparação entre três polissacarídeos, papel(celulose), alginato e quitosana, o número de moléculas de água absorvidas pelo alginato foi superior. Pela perspectiva de estrutura química, as principais diferenças entre os polímeros está na substituições parciais de grupamentos hidroxila por grupamentos amina, da quitosana, pelo grupamento COONa, no alginato. O mecanismo de absorção de água é composta de de dois fatores principais, a absorção da água por sítios específicos dos polímeros e o agrupamento de água das primeiras moléculas de água a serem absorvidas. Essa baixa atividade se deve ao fato de que a água tem menor afinidade aos grupos polares da celulose e da quitosana do que os grupamentos iônicos e polares do alginato. Substituindo um grupamento hidroxila por grupamentos amino, não leva a um grande aumento no primeiro mecanismo de absorção de água. [134]

Além da menor afinidade da quitosana pela água, a constituição de EB, além de diversas proteínas solúveis que se apresentam no meio, EB também constituído de açúcares, aminoácidos e íons gerando uma força iônica fora da cadeia de alginato, podendo assim absorver a água presente na cadeia de alginato, superando as forças do polissacarídeo de reter a água apesar de ter maior hidrofiliçidade. [112]

Dessa forma a diferença que se apresenta no experimento onde as conformações de fase externa (FE e FEG) se apresentaram com menor rendimento em termos de massa, mas também menores taxas de imobilização, justifica-se por tais fatores descritos .

Figura 46 – Taxa de imobilização total de enzimas ativas



Selecionar método de imobilização apropriado é um determinante no processo de imobilização, pois desempenha o papel mais importante na elucidação da atividade e das características da enzima em uma reação específica. Especificações de processo para o catalisador, incluindo atividade enzimática geral, eficácia da utilização da enzima, características de desativação e regeneração enzimática, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas das enzimas imobilizadas são fatores que devem ser considerados.[135]

O alginato e a quitosana são polisacarídeos amplamente utilizados dentro da imobilização enzimática por possuírem grupamentos OH e NH₂, na quitosana especificamente. Tais grupamentos permitem com que ambos os suportes tenham interações com as cadeias polares presentes nos aminoácidos, das cadeias laterais proteicas enzimáticas. Dessa forma as enzimas irão se manter confinadas tanto pelo *entrapment*, devido a rede que ambos os polímeros formam, quanto pelas interações entre os grupamentos dos componentes do conjunto.[73, 79, 123, 78]

As conformações FI e FIG, foram as conformações mais ativas e as que se obteve mais rendimento na síntese. O resultado se reflete também no gráficos citados acima. As conformações FE e FEG, retratam um padrão semelhante, com as ativida-

des demasiadamente mais baixas, demonstrando que a conformação onde se fez a dissolução de EB na fase externa, se mostrou ineficiente apesar de se ter uma eficiência catalítica semelhante a FI, por meio da síntese de FE. Ambas as conformações com o glutaraldeído demonstram que a concentração utilizada do reagente reduziu a atividade enzimática.

4.10 Concentração de proteína no sobrenadante

A determinação da concentração de proteína foi medida espectrofotometricamente a 595 nm, de acordo com o método de Bradford[105] com o uso de albumina de soro bovino (BSA) como uma proteína padrão, utilizando-a como padrão para constituir a curva de calibração (Figura 47). Para determinar a concentração de enzima imobilizada, todas as esferas foram lavadas 3 vezes em um filtro com água para remover a enzima que não estava presa. A solução de CaCl_2 filtrada e as lavagens foram coletadas e testadas quanto à concentração de enzimas para determinar a eficiência do aprisionamento. A quantidade de proteína encapsulada foi determinada indiretamente a partir da diferença entre a quantidade de proteína introduzida na mistura de reação e a quantidade de proteína nos filtrados, sobrenadante (SN) e também nas lavagens após os ciclos. Na Figura 48 está representado as quantidades de açúcares redutores produzidos pela hidrólise mediada por SNFI, sobrenadante obtido da reação de síntese de FI, e SNFIG sobrenadante obtido da reação de síntese de FIG.

Figura 47 – Curva de calibração para quantificação de proteínas no extrato bruto e para avaliação do método de síntese

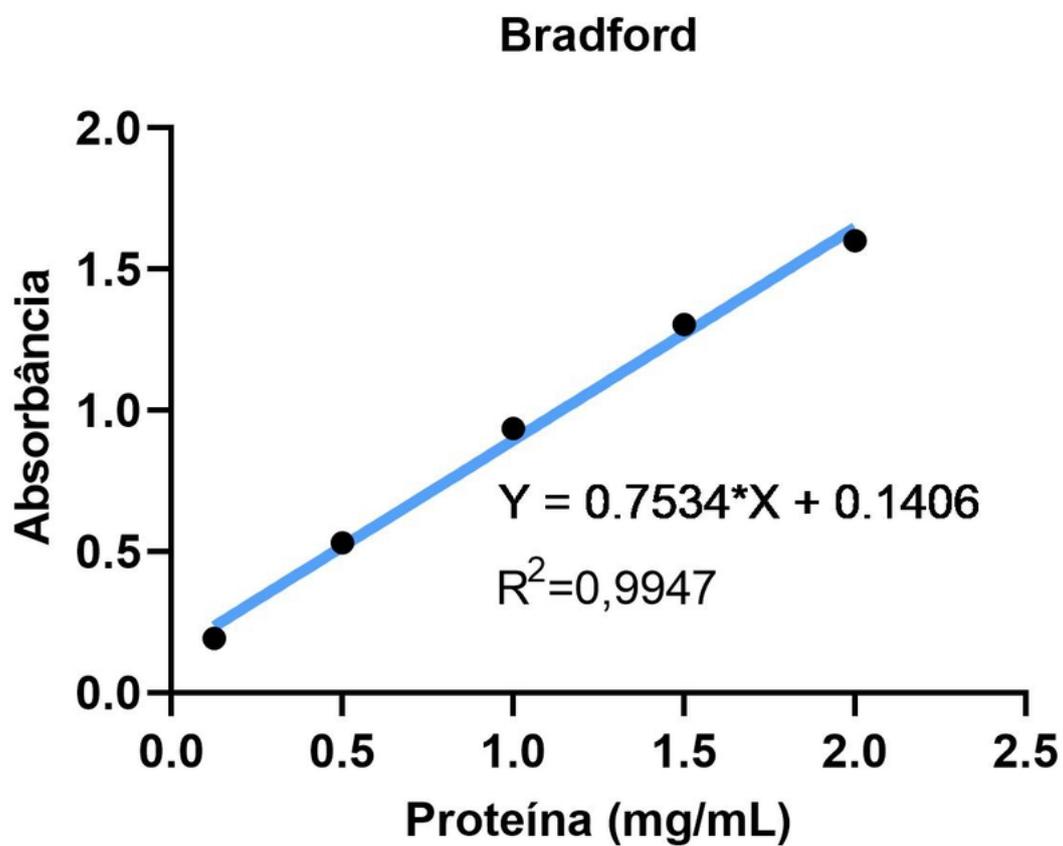
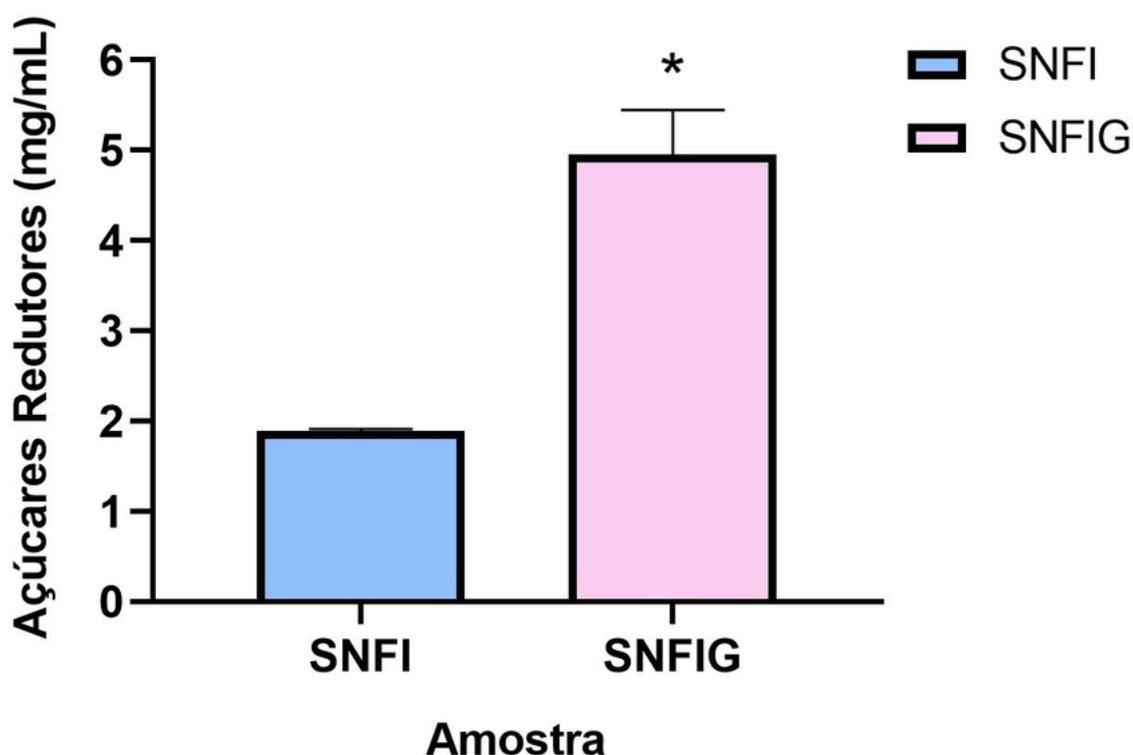
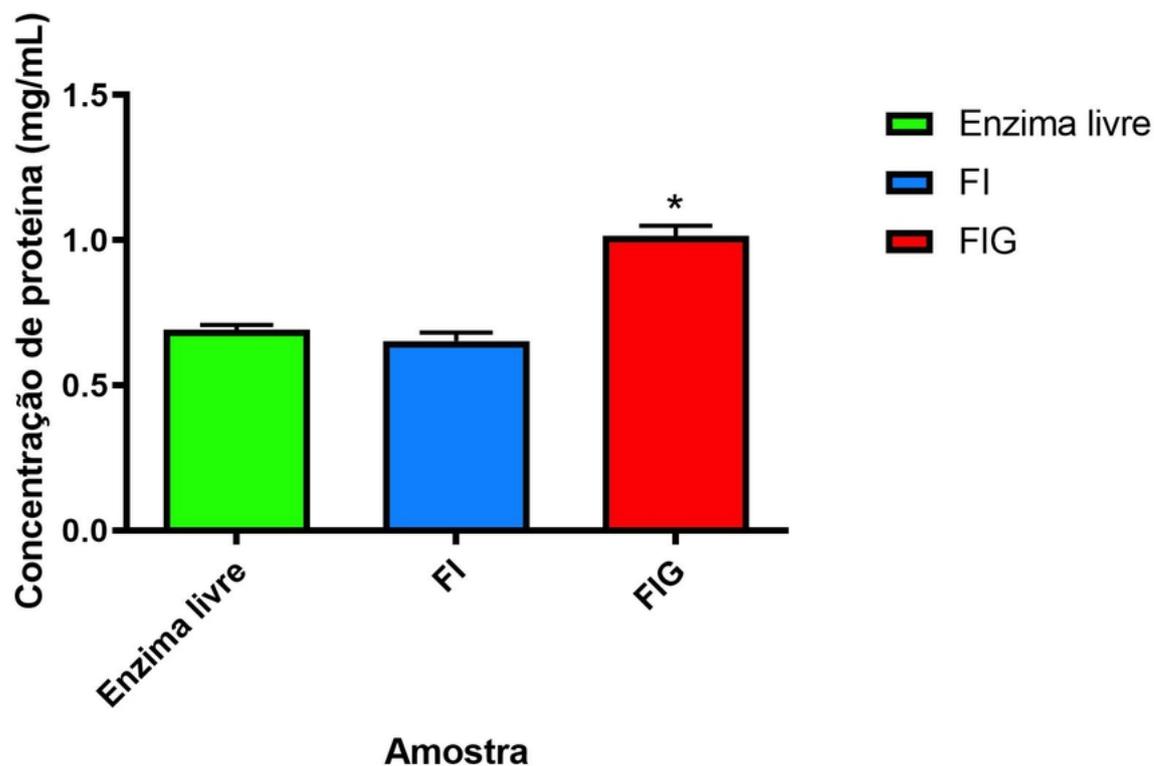


Figura 48 – Concentração de açúcares redutores, obtidos pela hidrólise do amido, pelo sobrenadante recolhido após as sínteses dos microgéis



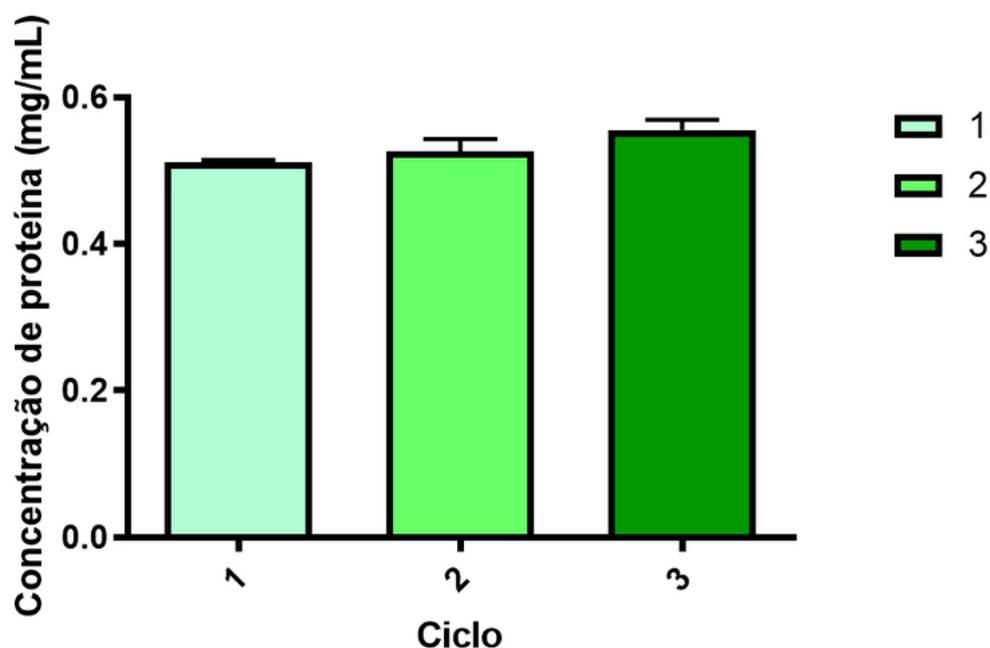
As concentrações de proteínas em FI e em EB são próximas, possuindo uma ínfima diferença estatística (Tukey $p < 0,05$), entre as médias obtidas, sendo em EB $0,70 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,65 \pm 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ em FI pelas análises feitas pelo método de Bradford. O sobrenadante obtido a partir de FIG possui maior concentração de proteínas $1,01 \pm 0,03 \text{ mg mL}^{-1}$. As imagens obtidas por MEV demonstram que FIG possui um número maior de rachaduras em sua superfície, demonstrando as alterações feitas a partir do glutaraldeído. Tais alterações são por conta das alterações das micro e macro propriedades nos polímeros podendo reduzir a absorção de água e consequentemente a interação dos polímeros, tanto o alginato quanto a quitosana com os grupamentos polares que apresentam-se na fase externa da cadeia proteica, aumentando assim, as concentrações de proteína no sobrenadante Figura 49 e Figura 50. (BEPPU et al., 2007; ZDARTA et al., 2018)

Figura 49 – Concentração proteica no sobrenadante proveniente da síntese



A resposta distinta de FIG se deve ao fato de que o glutaraldeído, por ser um agente reticulante, atuou reduzindo a solubilidade dos polisacarídeos, fazendo com que tenham menor afinidade pelas proteínas, conseqüente a afinidade das enzimas amilolíticas presentes em EB, fazendo com que tal conformação, além de apresentar menor atividade amilolítica, apresentou maiores concentrações proteicas no sobrenadante após a síntese, demonstrando que uma menor concentração de proteínas ficaram retidas. [136]

Figura 50 – Concentração proteica no sobrenadante ao longo dos ciclos em FI



O ensaio de Bradford foi descrito pela primeira vez por Bradford e tornou-se o método preferido para quantificar proteínas em muitos laboratórios. O mecanismo básico do ensaio é a ligação do corante azul brilhante G-250 da coomassie a pH ácido a resíduos de aminoácidos básicos, como arginina, histidina, fenilalanina, triptofano, resíduos de tirosina e interações hidrofóbicas nas proteínas, o que resulta em uma mudança de cor para azul. As vantagens do teste de Bradford incluem a facilidade de uso, sensibilidade relativa, baixo custo dos reagentes e baixa interferência de outras substâncias.[137]

A espécie de fungo típica para se fazer o *koji* é, o *A. oryzae*, sendo utilizada durante o processo de fermentação, o *koji* age quebrando os substratos de sua respectiva aplicação. Cada espécie de fungos *koji* reage de maneira diferente aos ingredientes utilizados e, portanto, deve ser selecionada com base no produto desejado. Por exemplo, *A. sojae* é selecionada para produzir missô e molho de soja devido à sua alta capacidade proteolítica, e *A. oryzae* é amplamente utilizado na produção de saquê, missô e molho de soja por sua alta capacidade amilolítica.[138]

O ano de 1894 viu o verdadeiro início da moderna tecnologia de enzimas microbianas, com a Takadiastase, uma mistura relativamente não pura de enzimas hidrolíticas preparadas pelo cultivo de *A. oryzae* em farelo de trigo, sendo comercializada no Ocidente pela primeira vez. As enzimas principais de *A. oryzae* são as

amilases, alfa-amilase e glucoamilase, que decompõem o amido. Sendo as amilases as enzimas mais produzidas, tendo a atividade mais pronunciada no presente trabalho mesmo sendo sua medida feita indiretamente, pela quantidade total de proteína no meio reacional após a síntese dos microgéis, a medida pelo método de Bradford se mostra adequada, pela quantidade de amilase e por ser um método recorrente na literatura onde se avalia a quantidade de enzima encapsulada ou entrapada pelos métodos de imobilização.[139]

O teste de proteína Bradford é popular devido à sua facilidade de desempenho e sensibilidade relativa. A linearização em toda a faixa de concentrações de proteínas obtida pelo protocolo apresentado aqui simplifica ainda mais o ensaio, pois as amostras desconhecidas não precisam estar dentro da faixa do gráfico de calibração. [140]

O método onde se utiliza o sobrenadante para se determinar a quantidade de enzimas entrapadas no suporte é o mais comum a ser utilizado pelo baixo custo. Idealmente métodos como sds page ou espectrometria de massa poderiam também ser utilizados para se determinar especificamente a quantidade de enzimas presente no meio reacional após a síntese dos microgéis.[138]

Devido à sua facilidade de desempenho e sensibilidade relativa. A linearização em toda a faixa de proteção das proteínas é aplicada pelo protocolo aqui apresentado, simplificando ainda mais o ensaio, pois as há interações desconhecidas não sendo necessárias, e fora da faixa de calibração gráfica. As aplicações no campo da imobilização enzimática. Um trabalho se utilizando puerarina glicosidase em celulose DAE-52 obteve-se 100% de eficiência de imobilização, sendo tal medida feita pelo método de Bradford.[71]

Na mesma linha, a imobilização de lipase de *Candida Rugosa* em quitosana obteve medindo indiretamente as proteínas, a eficiência de imobilização 78%.[141]

Em uma linha semelhante ao presente trabalho, utilizando múltiplas enzimas isoladas. Obteve-se 97.07% e 52.14% de encapsulamento de enzimas em esferas de alginato de cálcio e argila. O material sintetizado teve sua caracterização e aplicação por meio sacarificação de pasta de mandioca . A alfa-amilase de *Bacillus subtilis*, a glucoamilase de *Rhizopus niveus* liofilizada e a celulase de *Aspergillus niger*.[124]

A ligação de afinidade entre enzima e suporte é alcançada de duas maneiras: ou o suporte é pré-acoplado a um ligante de afinidade para a enzima alvo ou a enzima é conjugada a uma entidade que desenvolve afinidade com o suporte. [124]

Modificação adicional do O método de ligação por afinidade é uma camada de bioafinidade que aumenta exponencialmente a capacidade de ligação enzimática e a reutilização por meio de várias interações, como forças Coulomb, ligação de hidrogênio e van der Waals.[141]

A notável seletividade da interação, a orientação de controle da enzima imobilizada e as alterações conformacionais mínimas causadas por esse tipo de ligação, que resultou em alta retenção da atividade da molécula imobilizada são vantagens

principais do método (por exemplo, a ligação entre anticorpos e antígenos ou haptenos, lectinas e cadeias sacarídicas livres ou macromoléculas glicosiladas, ácidos nucleicos e proteínas de ligação a ácidos nucleicos, hormônios e seus receptores, avidina e biotina, etiqueta de poli-histidina e íons metálicos etc.)[141]

Interações hidrofóbicas entropicamente acionadas também são usadas para ligar enzimas às superfícies do suporte. Quando uma molécula de enzima desloca um grande número de moléculas de água do suporte e de sua própria superfície durante a imobilização, resulta em ganho de entropia para produzir as interações hidrofóbicas entre as duas entidades. A força das interações depende da hidrofobicidade do adsorvente e da proteína, regulada pelo tamanho da molécula do ligante hidrofóbico e pelo grau de substituição do suporte. Modulação adicional das interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte é alcançada através do ajuste do pH, temperatura e concentração de sal durante a imobilização da enzima.[138]

A orientação e a estrutura tridimensional das enzimas imobilizadas são cruciais para garantir alta estabilidade e atividade enzimática. A maioria dos procedimentos de imobilização não controla ativamente a orientação das enzimas, resultando no inevitável enterramento e inacessibilidade do local ativo.[142]

Pensou que durante a imobilização as enzimas, como biomoléculas dinâmicas, podem ficar distorcidas e isso pode alterar suas propriedades catalíticas. No entanto, os efeitos de diferentes estratégias de imobilização na rigidez ou flexibilidade enzimática e suas conseqüências na especificidade e estereoquímica em larga escala ainda não foram claramente avaliados e compreendidos.[72]

A por meio da investigação usando como modelo uma hidrolase de éster, isolada de uma bactéria que habita um lago cárstico, com amplo espectro de substrato (72 ésteres sendo convertidos; $61,5 \text{ U mg}^{-1}$ para tripropionato de gliceril), descobriu-se que a enzima ($7 \text{ nm} \times 4,4 \text{ nm} \times 4,2 \text{ nm}$) poderia ser eficientemente trocada por meio da força iônica dentro dos poros ($9,3 \text{ nm}$ em condições secas) de material mesoporoso ordenado funcionalizado por amino (NH_2 -SBA-15), atingindo uma carga proteica de 48 mg g^{-1} e atividade específica de $4,5 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$. Quando a enzima foi direcionada ao local, imobilizada através da interação de dos grupamentos de histinina com um cátion imobilizado na superfície de dois tipos de micropartículas magnéticas através das *tags* de hexahistidina, a proteína carrega até $10,2 \mu\text{g g}^{-1}$ e atividades específicas de até $29,9 \pm 0,3 \text{ U mg}^{-1}$, foram obtidos. Foi observado que a enzima trocada ionicamente dentro dos poros do NH_2 -SBA-15 reduziu drasticamente a faixa do substrato (17 ésteres), em uma extensão muito maior do que a enzima trocada ionicamente na superfície das micropartículas magnéticas (até 61 ésteres). Isso é atribuído a diferenças na química da superfície, tamanho das partículas e acessibilidade do substrato ao túnel do local ativo. Tais resultados também sugeriram, pela primeira vez, que a imobilização de enzimas em poros de tamanho semelhante pode alterar as estruturas enzimáticas e produzir centros ativos enzimáticos com configurações diferentes, os quais promovem

conversões estereoquímicas de maneira diferente das decorrentes da imobilização superficial, onde a força da troca iônica também tem influência. Isso foi mais bem caracterizado, demonstrando que quando a enzima foi introduzida no interior de poros com um diâmetro (em condições secas) ligeiramente superior ao da estrutura cristalina da enzima, sendo produzido um biocatalisador enantiospecífico para o (R) -4-cloro-3-hidroxi-butirato de etila, um biocatalisador não encontrado ao usar poros mais largos. Por outro lado, a imobilização na superfície de micropartículas ferromagnéticas produziu biocatalisadores seletivos para mandelato de metila (S) - (+) - ou lactato de metila (S), dependendo da funcionalização.[142] [143]

Este estudo de Rong et al. 2015 demonstra os benefícios de uma extensa análise dos espectros de substrato para entender melhor os efeitos de diferentes estratégias de imobilização na flexibilidade / rigidez enzimática, bem como na especificidade e estereoquímica do substrato. Tais resultados ajudarão a projetar materiais e interfaces ajustáveis para uma manipulação controlada da especificidade e transformar enzimas não enantiospecíficas em biocatalisadores com maior afinidade ao substrato estereoquimicamente quimicamente capazes de converter múltiplas moléculas quirais.[143]

4.11 Análise estatística

4.11.1 Teste de Confiabilidade nas conformações de Fase Interna

O coeficiente alfa de Cronbach (α) resultante de confiabilidade, varia de 0 a 1 ao fornecer essa avaliação geral da confiabilidade de uma medida. Se todos os itens da escala forem totalmente independentes um do outro (ou seja, não estiverem correlacionados ou não tiverem covariância), então $\alpha = 0$; e, se todos os itens tiverem covariâncias altas, então α irá tender a 1 quando o número de itens na escala se aproximar do infinito. Em outras palavras, quanto maior o coeficiente α , mais os itens compartilham covariância e provavelmente variam dentro do menor intervalo possível. [111]

As amostras com os melhores rendimentos em massa foram submetidas a tal teste, por apresentarem também maior reuso. São também as amostras que representam a maior parte dos testes conduzidos pelo trabalho, que foram FI e FIG, que obtiveram cerca de 16g de rendimento por síntese. FI possui um alfa 0,976 de e FIG Possui um alfa de 0,975. Nas tabelas abaixo estão descritas os dados gerados pela análise.

Figura 51 – Tabela descritiva das médias e desvio padrão das concentrações de açúcares redutores obtidos

Estatística de Item				
Amostra	Média	Desvio Padrão	N	Alfa de Cronbach
FI	0,62	0,09	9	0,975
FI2	0,63	0,10	9	
FIL1	2,70	1,42	9	0,976
FIL2	2,56	1,35	9	

A estatística de item acima demonstram os grupos médias das comparadas. O programa ao fazer o cálculo do teste de confiabilidade, agrupa as médias em dois grupos de médias verificando a consistência interna a partir dos parâmetros de Alfa de Cronbach. FI possui Desvios Padrão aceitáveis de acordo com a estatística convencional, entretanto o foco do teste é verificar em uma grande gama de respostas, sua consistência interna, sendo o valor do Desvio Padrão só um elemento da estatística clássica para dar a referência dentro das medidas feitas. FIG apresenta um alto grau de variação, chegando a cerca de 50% de variação dentre as médias em ambos agrupamentos feitos para o cálculo, mas, pelo cálculo do Alfa de Cronbach, o valor do cálculo apresenta-se aceitável. O alto grau de variação, tanto em FI e FIG se deve ao diversos fatores, principalmente a forma que a enzima ativa se liga a cadeia polimérica e a variação esperada na produção da enzima pelo fungo. [142] [112]

5 Conclusão

Os seis métodos de imobilização enzimática do extrato bruto do fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em arroz geraram diferentes concentrações de açúcar, sendo as conformações de fase inter (FI e FIG) as mais ativas e com maior viabilidade no que se refere ao rendimento de sua síntese. A eficiência de imobilização enzimática de FI foi de 90% sendo somente 17% ativa, enquanto para FIG foi obtida cerca de imobilização 88% e 12 % de enzimas ativas. Juntamente aos testes de eficiência catalítica foram feitos testes de reuso, Obtendo em um ciclos de de uma hora 3 ciclos em FI e 2 ciclos em FIG. No que se refere aos testes de taxa de atividade com variação de pH e temperatura, os testes de FI resultaram em nenhuma diferença quando se comparada a EB e FIG apresentou resultados superiores de atividade a 45 °C.

A utilização do glutaraldeído encontra-se de acordo com a literatura, sendo a concentração de 1% usual, entretanto, não se apresenta com um bom desempenho para o modelo de sistema de enzimas imobilizadas aqui utilizado. Melhores condições para se trabalhar tal agente ligante/ reticulante deve ser aprimorada com a regulação de sua ação reacional, obtendo índices de imobilização e cross-linking, adequadas para que se possibilite maior eficiência catalítica sem a redução do desempenho enzimático.

Os hidrolisados obtidos apresentaram variadas concentrações de açúcar, demonstrando que apesar de baixa as quantidades de açúcar, apresentam potencial de aplicação de modulação enzimática. O estudo também demonstra que com a utilização de dois suportes, pode-se tentar diferentes variações entre eles, alterando drasticamente o desempenho da enzima imobilizada.

Sugere-se fazer a modulação específica do processo de imobilização do extrato bruto ou amilase do fungo, para que as o processo de hidrólise seja otimizado na perspectiva da síntese, por estratégias de funcionalização no suporte melhorando os índices de atividade enzimática e maior geração de açúcares redutores. Como descrito por Reyes-Duarte et al. 2018 em seu estudo fazendo a modificação de uma variada gama de grupamentos, pode se melhorar atividade enzimática não só em termos do reuso mas também houve um aumento da eficiência catalítica, ao se comparar com a enzima livre. [144]

A inserção de amiloglicosidase no processo se apresenta como uma alternativa interessante para o aumento a concentração de açúcares redutores, podendo assim gerar a hidrólise total do amido e explorar a perspectiva da técnica de coimobilização.

Os sistemas de microgéis a, demonstraram-se eficientes para imobilização enzimática e podem ser utilizados em distintos setores industriais, após estudos em escala piloto com o sistema de imobilização utilizado, tanto farmacêutico mas também na indústria de energia, alimentos e bebidas, podendo ser utilizada para obtenção de açúcares redutores e para produção de álcool, a partir do amido havendo a possibilidade de se trabalhar outros produto proveniente da hidrólise além dos açúcares redutores.

O controle das condições de reação podem ser utilizados como estratégia para se limitar e modular a reação do glutaraldeído no intuito de se reduzir sua reação entre as diversas cadeia proteica, presentes em EB, levando a redução da atividade juntamente, com a redução da interação do suporte com os polisacarídeos.

Referências

- [1] Saurabh Bhatia. *History, scope and development of biotechnology*, pages 1 – 61. 2053-2563. IOP Publishing, 2018. ISBN 978-0-7503-1299-8. URL <http://dx.doi.org/10.1088/978-0-7503-1299-8ch1>.
- [2] Rachel S. Meyer, Ashley E. DuVal, and Helen R. Jensen. Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. 196(1):29 – 48, 10 2012. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2012.04253.x>.
- [3] Ania Wieczorek and Mark Wright. History of Agricultural Biotechnology: How Crop Development has Evolved. 1(1):1 –, 2012. URL <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/history-of-agricultural-biotechnology-how-crop-development-25885295/>.
- [4] Jonathan Ethier, Eszter Bánffy, Jasna Vuković, Krassimir Leshtakov, Krum Bacvarov, Mélanie Roffet-Salque, Richard P. Evershed, and Maria Ivanova. Earliest expansion of animal husbandry beyond the Mediterranean zone in the sixth millennium BC. 7(1):7146 –, 12 2017. URL <http://www.nature.com/articles/s41598-017-07427-x>.
- [5] Patrick F. Fox, Timothy P. Guinee, Timothy M. Cogan, and Paul L. H. McSweeney. *Cheese: Historical Aspects*, pages 1 – 10. Boston, MA, 2017. URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9_1.
- [6] Mason Sutton and Skylar Barr. *Food Biotechnology*. EDTECH, 2018. ISBN 9781839472558. URL <https://books.google.com.br/books?id=DePEDwAAQBAJ>.
- [7] Edward R.(Ted) Farnworth, editor. *Handbook of Fermented Functional Foods*. 2003. URL <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203009727>.
- [8] AshishSwarup Verma, Shruti Rastogi, Shishir Agrahari, and Anchal Singh. Biotechnology in the realm of history. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3):321 –, 2011. ISSN 0975-7406. URL <http://www.jpbonline.org/text.asp?2011/3/3/321/84430>.
- [9] Rudolph H. Michel, Patrick E. McGovern, and Virginia R. Badler. The First Wine & Beer. 65(8):408A – 413A, 4 1993. URL <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00056a734>.
- [10] Robert Bud. History of 'biotechnology'. *Nature*, 337(6202):10 – 10, 1 1989. ISSN 0028-0836. URL <http://www.nature.com/articles/337010a0>.

- [11] K Bergdolt and J Dewhurst. *Wellbeing: A Cultural History of Healthy Living*. 2008. URL <https://books.google.com.br/books?id=adrvICd50HAC>.
- [12] Payam Behzadi and Elham Behzadi. The Realm of Applied Microbiology, Biotechnology and Genetic Engineering through the Millennia: from Prehistoric Era to Modern Era. 1(1), 5 2016. URL <https://medwinpublishers.com/OAJMB/OAJMB16000101.pdf>.
- [Steinberg and Raso] F M Steinberg and J Raso. Biotech pharmaceuticals and bi-otherapy: an overview. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 1(2):48 – 59. ISSN 1482-1826. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945918>.
- [13] Keith L. Manchester. Louis Pasteur (1822–1895) — chance and the prepared mind. 13(12):511 – 515, 12 1995. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779900890149>.
- [14] Harn Benniga. *A History of Lactic Acid Making: A Chapter in the History of Biotechnology*. Dordrecht: Kluwer, 1990.
- [15] Keith Vernon. Pus, Sewage, Beer and Milk: Microbiology in Britain, 1870–1940. *History of Science*, 28(3):289 – 325, 9 1990. ISSN 0073-2753. URL <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/007327539002800303>.
- [16] William Thieman. *Introduction to biotechnology*. PEARSON, Boston, 2012. ISBN 9781621005391.
- [17] Ashok Yakkaldevi. *Basic Concepts in Biotechnology*. 2015. ISBN 978-1-312-87694-1.
- [18] Carlos Eduardo Torres Freire. *Biotecnologia no Brasil: uma atividade econômica baseada em empresa, academia e Estado*. pages 201 –, 2014.
- [19] Alan T. Bull, Geoffrey Holt, and Malcolm D. Lilly. Biotechnology: International Trends and Perspectives. *OECD*, 1(1):78 –, 1982. URL <http://www.oecd.org/sti/emerging-tech/2097562.pdf>.
- [20] Brent Erickson, Nelson, and Paul Winters. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal*, 7(2):176 – 185, 2 2012. ISSN 18606768. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201100069>.
- [21] Jan B.van Beilen and Zhi Li. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):338 – 344, 8 2002. ISSN 09581669. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003348>.

- [22] Goutam Brahmachari. *Biotechnology of microbial enzymes : production, biocatalysis and industrial applications*. Academic Press Elsevier, London, UK, 2016. ISBN 978-0-12-803725-6.
- [23] CAPES. Biotecnologia. Technical report, 2016.
- [24] Ole Kirk, Torben Vedel Borchert, and Claus Crone Fuglsang. Industrial enzyme applications. 13(4):345 – 351, 8 2002. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003282>.
- [25] Daniel L. Purich. Active Sites and their Chemical Properties. In *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*, pages 53 – 169. Elsevier, 2010. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012380924710002X>.
- [26] Wolfgang Aehle, editor. *Enzymes in Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2003. ISBN 9783527602131. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/3527602135>.
- [27] N.S. Punekar. *Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Singapore, 2018. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-0785-0>.
- [28] Albert Lehninger, David L. Nelson, and Michael M. Cox. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed, Porto Alge, 6° edition, 2014.
- [29] Anthony J. Kirby and Florian Hollfelder. Enzymes under the nanoscope. *Nature*, 456(7218):45 – 47, nov 2008. ISSN 0028-0836. URL <http://www.nature.com/articles/456045a>.
- [30] Paulo H. Rampelloto. *Enzymes and Their Biotechnological Applications*. Biomolecules, 2015.
- [31] Adam Augustyn and Kara Rogers. *Enzyme*. 2018.
- [32] E. Z. Eisenmesser. Enzyme Dynamics During Catalysis. *Science*, 295(5559): 1520 – 1523, feb 2002. ISSN 00368075. URL <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1066176>.
- [33] James A. Barnett. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast*, 16(8):755 – 771, jun 2000. ISSN 0749-503X. URL [http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0061\(200006\)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4](http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0061(200006)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4).
- [34] Harry W. Paul. *Science, Vine and Wine in Modern France*. Cambridge University Press, 2009. ISBN 9780521497459. URL <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9780511529283/type/book>.

- [35] Sergio Martínez Cuesta. *The Chemistry and Evolution of Enzyme Function: Isomerases as a Case Study*. PhD thesis, University of Cambridge, 2014.
- [36] Aron W. Fenton and Aileen Y. Alontaga. The Impact of Ions on Allosteric Functions in Human Liver Pyruvate Kinase. pages 83 – 107. 2009. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687909660055>.
- [37] Cornelia Welte and Uwe Deppenmeier. Proton Translocation in Methanogens. pages 257 – 280. 2011. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851123000135>.
- [38] Ana Maria Edwards. Structure and General Properties of Flavins. pages 3 – 13. 2014. URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0452-5_{_}1.
- [39] Gianantonio Battistuzzi, Marco Borsari, and Marco Sola. Redox Properties of Cytochrome c. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(2):279 – 291, apr 2001. ISSN 1523-0864. URL <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/152308601300185232>.
- [40] Jung-Min Choi, Sang-Soo Han, and Hak-Sung Kim. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. 33(7):1443 – 1454, 2015.
- [41] T Godfrey and J Reichelt. Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. *British Polymer Journal*, 16(1), 1982.
- [42] G. Singh, N. Capalash, K. Kaur, S. Puri, and P. Sharma. Enzymes. In *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*, pages 157 – 172. Elsevier, 2016. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128023921000071>.
- [43] Jan B. van Beilen and Zhi Li. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):338 – 344, aug 2002. ISSN 09581669. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003348>.
- [44] Ole Kirk, Torben Vedel Borchert, and Claus Crone Fuglsang. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):345 – 351, aug 2002. ISSN 09581669. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003282>.
- [45] Thiagarajan Hemalatha, Thiagamoorthy UmaMaheswari, Gunasekaran Krithiga, Palavesam Sankaranarayanan, and Rengarajulu Puvanakrishnan. Enzymes in clinical medicine: An overview. *Indian J Exp Biol*, 51:777 – 788, 2013.
- [46] Masayuki Machida, Osamu Yamada, and Katsuya Gomi. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research*, 15(4):173 – 183, 2008. ISSN 13402838.

- [Pandey et al.] Ashok Pandey, Colin Webb, Carlos Ricardo Soccol, and Christian Larroche. *Enzyme Technology*. 1 edition.
- [47] Shalini Singh, Sanamdeep Singh, Vrinda Bali, Lovleen Sharma, and Jyoti Mangla. Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. *BioMed Research International*, 2014:1 – 9, 2014. ISSN 2314-6133. URL <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/215748/>.
- [48] Z Yuan. *Microbial Energy Conversion*. De Gruyter, 2018. ISBN 9783110424737. URL <https://books.google.com.br/books?id=35FdDwAAQBAJ>.
- [49] Margaret E. Smith and Dion G. Morton. DIGESTION and ABSORPTION. In *The Digestive System*, pages 129 – 152. Elsevier, 2010. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702033674000086>.
- [50] Ana Carvalho. Purificação e caracterização bioquímica da α -glicosidase termoestável produzida por *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. *Aleph*, 2010.
- [51] Marc J.E.C van der Maarel, Bart van der Veen, Joost C.M Uitdehaag, Hans Leemhuis, and L Dijkhuizen. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2):137 – 155, mar 2002. ISSN 01681656. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165601004072>.
- [52] Ludmilla Riisager Lumholdt, René Holm, Erling Bonne Jørgensen, and Kim Lambertsen Larsen. In vitro investigations of α -amylase mediated hydrolysis of cyclodextrins in the presence of ibuprofen, flurbiprofen, or benzo[a]pyrene. *Carbohydrate Research*, 362:56 – 61, nov 2012. ISSN 00086215. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621512003965>.
- [53] Lili Kandra. α -Amylases of medical and industrial importance. 666-667: 487 – 498, 12 2003. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166128003007073>.
- [54] Huacong Zhou, Liangrong Yang, Wei Li, Qinghui Shou, Peng Xu, Wensong Li, Fuchun Wang, Pinhua Yu, and Huizhou Liu. Improving the stability of immobilized penicillin G acylase via the modification of supports with ionic liquids. 51(12): 4582 – 4590, 2012.
- [55] Sumitra Datta, L. Rene Christena, and Yamuna Rani Sriramulu Rajaram. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3 (1):1 – 9, 2 2013. ISSN 2190-572X. URL <http://link.springer.com/10.1007/s13205-012-0071-7>.

- [56] Romanian Biotechnological Letters and Calea Aradului. Influence of immobilization on biocatalytic activity of a microbial (*Bacillus amyloliquefaciens*) alpha-amylase. 17(3):7252 – 7258, 2012.
- [57] Yu-Ke Cen, Yu-Xiao Liu, Ya-Ping Xue, and Yu-Guo Zheng. Immobilization of Enzymes in/on Membranes and their Applications. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 361(24):5500 – 5515, dec 2019. ISSN 1615-4150. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adsc.201900439>.
- [58] Fabian B. H. Rehm, Shuxiong Chen, and Bernd H. A. Rehm. Bioengineering toward direct production of immobilized enzymes: A paradigm shift in biocatalyst design. *Bioengineered*, 9(1):6 – 11, jan 2018. ISSN 2165-5979. URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2017.1325040>.
- [59] Nur Royhaila Mohamad, Nur Haziqah Che Marzuki, Nor Aziah Buang, Fah-rul Huyop, and Roswanira Abdul Wahab. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2):205 – 220, 3 2015. ISSN 1310-2818. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2015.1008192>.
- [60] Jakub Zdarta, Anne Meyer, Teofil Jesionowski, and Manuel Pinelo. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*, 8(2):92 –, 2 2018. ISSN 2073-4344. URL <http://www.mdpi.com/2073-4344/8/2/92>.
- [61] Zu-Feng -F Xu, Rhett Affleck, Pramod Wangikar, Valerie Suzawa, Jonathan S. Dordick, and Douglas S. Clark. Transition state stabilization of subtilisins in organic media. 43(6):515 – 520, 1994.
- [62] E. Ranjbakhsh, a. K. Bordbar, M. Abbasi, a. R. Khosropour, and E. Shams. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. 179:272 – 276, 2012. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.097>.
- [63] Claudia Bernal, Karen Rodriguez, and Ronny Martinez. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 36(5):1470 – 1480, sep 2018. ISSN 07349750. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018301010>.
- [64] D. F. Silva, A. F. A. Carvalho, T. Y. Shinya, G. S. Mazali, R. D. Herculano, and P. Oliva-Neto. Recycle of Immobilized Endocellulases in Different Conditions for

- Cellulose Hydrolysis. *Enzyme Research*, 2017:1 – 18, 2017. ISSN 2090-0406. URL <https://www.hindawi.com/journals/er/2017/4362704/>.
- [65] Carla Silva, Madalena Martins, Su Jing, Jiajia Fu, and Artur Cavaco-Paulo. Practical insights on enzyme stabilization. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3): 335 – 350, apr 2018. ISSN 0738-8551. URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2017.1355294>.
- [66] Hui Luo, Linlin Zhu, Yanhong Chang, Xiuhong Liu, Zijia Liu, Hongxu Sun, Xi Li, Huimin Yu, and Zhongyao Shen. Microenvironmental pH changes in immobilized cephalosporin C acylase during a proton-producing reaction and regulation by a two-stage catalytic process. *Bioresource Technology*, 223:157 – 165, 1 2017. ISSN 09608524. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416314444>.
- [67] Veronika Stepankova, Sarka Bidmanova, Tana Koudelakova, Zbynek Prokop, Radka Chaloupkova, and Jiri Damborsky. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. 3(12):2823 – 2836, 2013.
- [68] R. Siva Sai Kumar, K.S. Vishwanath, Sridevi Annapurna Singh, and A.G. Appu Rao. Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. 41(11):2282 – 2288, 11 2006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511306002339>.
- [69] M Kahraman, G Bayramoglu, N Kayamanapohan, and A Gungor. α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry*, 104(4):1385 – 1392, 2007. ISSN 03088146. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607001562>.
- [70] V I Tishkov, S S Savin, and A S Yasnaya. Protein engineering of penicillin acylase. *Acta naturae*, 2(3):47 – 61, jul 2010. ISSN 2075-8251. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649651><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3347563>.
- [71] E.B. Pereira, G.M. Zanin, and H.F. Castro. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20(4):343 – 355, oct 2003. ISSN 0104-6632. URL http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322003000400002&lng=en&tlng=en.
- [72] Jakub Zdarta, Anne Meyer, Teofil Jesionowski, and Manuel Pinelo. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*, 8(2), feb 2018. ISSN 2073-4344. URL <http://www.mdpi.com/2073-4344/8/2/92>.

- [73] Vishakha Kulkarni, Kishor Butte, and Sudha Rathod. Natural Polymers—a comprehensive review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2012.
- [74] M. Beatriz Brena and Francisco Batista-Viera. *Immobilization of Enzymes and Cells*, volume 22 of *Methods in Biotechnology*TM. Totowa, NJ, 2006. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-053-9>.
- [75] Haiying Cai, Yang Li, Minjie Zhao, Guanwen Fu, Jia Lai, and Fengqin Feng. Immobilization, Regiospecificity Characterization and Application of *Aspergillus oryzae* Lipase in the Enzymatic Synthesis of the Structured Lipid 1,3-Dioleoyl-2-Palmitoylglycerol. 10(7):e0133857 –, 7 2015. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133857>.
- [76] Ram M. Shivakumar H.G. Singh M. N., Hemant K. S. Y. Microencapsulation: A promising techniques for controlled drug delivery. 5(2):65–77 –, 2010.
- [77] Ferdous Khan and Sheikh Rafi Ahmad. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. *Macromolecular Bioscience*, 13 (4):395 – 421, apr 2013. ISSN 16165187. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201200409>.
- [78] Aja Aravamudhan, Daisy M. Ramos, Ahmed A. Nada, and Sangamesh G. Kumbar. Natural Polymers. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, pages 67 – 89. Elsevier, 2014. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123969835000041>.
- [79] Sindhu Doppalapudi, Sameer Katiyar, Abraham J. Domb, and Wahid Khan. Biodegradable Natural Polymers. In *Advanced Polymers in Medicine*, pages 33 – 66. Springer International Publishing, Cham, 2015. URL http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12478-0_{_}2.
- [80] Roy L. Whistler and James N. BeMiller. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition*. 2012. ISBN 9780127462530.
- [81] Journal O F Fermentation. Viable Cells by Using Calcium Alginate. 67(2):92 – 96, 1989.
- [82] F. Cellesi, W. Weber, M. Fussenegger, J.A. Hubbell, and N. Tirelli. Towards a fully synthetic substitute of alginate: Optimization of a thermal gelation/chemical cross-linking scheme (?tandem? gelation) for the production of beads and liquid-core capsules. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6):740 – 749, dec 2004. ISSN 0006-3592. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20264>.

- [83] Iain D. Hay, Zahid Ur Rehman, M. Fata Moradali, Yajie Wang, and Bernd H. A. Rehm. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*, pages n/a – n/a, sep 2013. ISSN 17517915. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12076>.
- [84] P. A. J. Gorin and J. F. T. Spencer. EXOCELLULAR ALGINIC ACID FROM AZOTOBACTER VINELANDII. *Canadian Journal of Chemistry*, 44(9):993 – 998, may 1966. ISSN 0008-4042. URL <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/v66-147>.
- [85] R.J. Clarke. Microorganisms and Their Response to Stimuli. In *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes*, pages 171 – 206. Elsevier, 2017. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128045954000079>.
- [86] Akira Inoue and Takao Ojima. Functional identification of alginate lyase from the brown alga *Saccharina japonica*. *Scientific Reports*, 9(1), dec 2019. ISSN 2045-2322. URL <http://www.nature.com/articles/s41598-019-41351-6>.
- [87] Fatih Comert, Fatemeh Azarikia, and Paul L. Dubin. Polysaccharide zeta-potentials and protein-affinity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(31): 21090 – 21094, 2017. ISSN 1463-9076. URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7CP02641B>.
- [88] Tugce Senturk Parreidt, Kajetan Müller, and Markus Schmid. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods*, 7(10), oct 2018. ISSN 2304-8158. URL <http://www.mdpi.com/2304-8158/7/10/170>.
- [89] B. H. A. Rehm and S. Valla. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(3):281 – 288, sep 1997. ISSN 0175-7598. URL <http://link.springer.com/10.1007/s002530051051>.
- [90] Robert P. Lanza, Willem M. Kühnreiter, and William L. Chick. Encapsulation Technologies. *Tissue Engineering*, 2013. ISSN 10763279.
- [91] Xia Wang, Ke-Xue Zhu, and Hui-Ming Zhou. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12):3042 – 3054, 5 2011. ISSN 1422-0067. URL <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/5/3042/>.
- [92] Bernd H. A. Rehm. *Alginates: Biology and Applications*, volume 13 of *Microbiology Monographs*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009. ISBN 978-3-540-92678-8. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-92679-5>.

- [93] Ping Li, Ya-Ni Dai, Jun-Ping Zhang, Ai-Qin Wang, and Qin Wei. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. : IJBS. 2008;4(3):221-228. 4(3):221 – 228, 2008.
- [94] Mani Prabakaran and João F. Mano. Stimuli-Responsive Hydrogels Based on Polysaccharides Incorporated with Thermo-Responsive Polymers as Novel Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(12):991 – 1008, dec 2006. ISSN 16165187. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200600164>.
- [95] Zhensheng Li, Matthew Leung, Richard Hopper, Richard Ellenbogen, and Miqin Zhang. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials*, 31(3):404 – 412, jan 2010. ISSN 01429612. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209010229>.
- [96] Ehab Taqieddin and Mansoor Amiji. Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25(10):1937 – 1945, 5 2004. ISSN 01429612. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203006999>.
- [97] Kely Viviane Souza. *Desenvolvimento de espécies de ferro imobilizadas em matrizes poliméricas e sua utilização na remediação de resíduos industriais*. PhD thesis, 2010.
- [98] Zübeyde Baysal, Yasemin Bulut, Murat Yavuz, and Çetin Aytekin. Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: Determination of equilibrium, kinetics, and thermodynamic parameters. 66(5-6):484 – 490, 5 2014. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/star.201300133>.
- [99] Novozymes. *Enzymes at work*, 2016.
- [100] Ameel M. R. Al-Mayah. Simulation of Enzyme Catalysis in Calcium Alginate Beads. *Enzyme Research*, 2012:1 – 13, 2012. ISSN 2090-0406. URL <http://www.hindawi.com/journals/er/2012/459190/>.
- [101] R. Siva Sai Kumar, K.S. Vishwanath, Sridevi Annapurna Singh, and A.G. Appu Rao. Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry*, 41(11):2282 – 2288, nov 2006. ISSN 13595113. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511306002339>.
- [102] Gail Lorenz Miller. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 1959. ISSN 0003-2700. URL <file:///Users/igoralbuquerque/souza/Downloads/referenciasartigo/miller.pdf>.

- [103] Amogh A. Ambardekar, Terry J. Siebenmorgen, and Tanya Pereira. Colorimetric Method for Rapidly Predicting Rice Amylose Content. *Cereal Chemistry Journal*, 88(6):560 – 563, nov 2011. ISSN 0009-0352. URL <http://doi.wiley.com/10.1094/CCHEM-04-11-0052>.
- [104] Yasuhito Takeda, Susumu Hizukuri, and Bienvenido O. Juliano. Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydrate Research*, 168(1):79 – 88, oct 1987. ISSN 00086215. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0008621587800083>.
- [105] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248 – 254, 5 1976. ISSN 00032697. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>.
- [106] Ashok Pandey. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3):81 – 84, mar 2003. ISSN 1369703X. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X02001213>.
- [107] Haruo Oyashiki, Masahiro Uchida, Akira Obayashi, and Satoru Oka. Evaluation of koji prepared with various molds for mirin-making. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67(3):163 – 168, jan 1989. ISSN 0922338X. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0922338X89901153>.
- [108] Figen Ertan, Hulya Yagar, and Bilal Balkan. Optimization of α -Amylase Immobilization in Calcium Alginate Beads. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37(3):195 – 204, may 2007. ISSN 1082-6068. URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826060701386679>.
- [109] Manu Sharma, Vinay Sharma, and Dipak K Majumdar. Entrapment of α -Amylase in Agar Beads for Biocatalysis of Macromolecular Substrate. *International Scholarly Research Notices*, 2014:8 –, 2014. ISSN 2356-7872. URL <http://dx.doi.org/10.1155/2014/936129>.
- [110] Anna R. C. Braga, Marcell F. Silva, José V. Oliveira, Helen Treichel, and Susana J. Kalil. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on Eupergit [®] C: structural, kinetic, and thermal characterization. *Química Nova*, 2014. ISSN 0100-4042. URL <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20140128>.
- [111] Chelsea Goforth. Using and interpreting Cronbach's Alpha, 2015.
- [112] Vasudeo Zambare. Solid State Fermentation of *Aspergillus oryzae* for Glucoamylase Production on Agro residues. *International Journal of Life Sciences*, 4:16 –

- 25, 3 2010. ISSN 2091-0525. URL <https://www.nepjol.info/index.php/IJLS/article/view/2892>.
- [113] Chuenjit Chancharoonpong, Pao-Chuan Hsieh, and Shyang-Chwen Sheu. Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation. *APCBEE Procedia*, 2:57 – 61, 2012. ISSN 22126708. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212670812000826>.
- [114] Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, Andrea Maria Rodrigues Andrade, Sandra Lúcia Pinheiro Fraga, and Renata Beltrão Teixeira. Solid state fermentation: An alternative to reuse and valorization of tropical agroindustrial residues. *Embrapa Comunicado Técnico*, 102:1 – 5, 2005.
- [115] Zübeyde Baysal, Fikret Uyar, and Çetin Aytekin. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 38(12):1665 – 1668, jul 2003. ISSN 13595113. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959202001504>.
- [116] Leya Thomas, Christian Larroche, and Ashok Pandey. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81:146 – 161, dec 2013. ISSN 1369703X. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X13002830>.
- [117] a Zaks and a M Klibanov. The effect of water on enzyme action in organic media. 263(1):8017 – 8021, 1988.
- [118] Zoe Konsoula and Maria Liakopoulou-Kyriakides. Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4):690 – 696, aug 2006. ISSN 01410229. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905005399>.
- [119] C. Nick Pace, Saul Treviño, Erode Prabhakaran, and J. Martin Scholtz. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1448):1225 – 1235, aug 2004. ISSN 0962-8436. URL <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2004.1500>.
- [120] K. J. Zhu X. Z. Shu. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, 18(2):237 – 245, jan 2001. ISSN 0265-2048. URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652040010000415>.
- [121] Osama M. Darwesh, Sameh S. Ali, Ibrahim A. Matter, Tamer Elsamahy, and Yehia A. Mahmoud. Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to

- improve industrial and environmental applications. pages 481 – 502. 2020. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007668791930463X>.
- [122] M.A. Mohamed, J. Jaafar, A.F. Ismail, M.H.D. Othman, and M.A. Rahman. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In *Membrane Characterization*, pages 3 – 29. Elsevier, 2017. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637765000012>.
- [123] Dominika Kulig, Anna Zimoch-Korzycka, Andrzej Jarmoluk, and Krzysztof Marycz. Study on Alginate–Chitosan Complex Formed with Different Polymers Ratio. *Polymers*, 8(5), may 2016. ISSN 2073-4360. URL <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/5/167>.
- [124] Siti Noraida Abd Rahim, Alawi Sulaiman, Fazlena Hamzah, Ku Halim Ku Hamid, Miradatul Najwa Muhd Rodhi, Mohibbah Musa, and Nurul Aini Edama. Enzymes Encapsulation within Calcium Alginate-clay Beads: Characterization and Application for Cassava Slurry Saccharification. *Procedia Engineering*, 68:411 – 417, 2013. ISSN 18777058. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877705813020547>.
- [125] Lizhu Ye and Huibin Chen. Characterization of the interactions between chitosan/whey protein at different conditions. *Food Science and Technology*, 39(1):163 – 169, mar 2019. ISSN 1678-457X. URL http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000100163&tlng=en.
- [126] Pedro Guerrero, Joe P. Kerry, and Koro de la Caba. FTIR characterization of protein–polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydrate Polymers*, 111:598 – 605, oct 2014. ISSN 01448617. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714004718>.
- [127] Sylwester Mazurek, Antonio Mucciolo, Bruno M. Humbel, and Christiane Nawrath. Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of Arabidopsis petals. *The Plant Journal*, 74(5):880 – 891, jun 2013. ISSN 09607412. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.12164>.
- [128] Gwen Lawrie, Imelda Keen, Barry Drew, Adrienne Chandler-Temple, Llewellyn Rintoul, Peter Fredericks, and Lisbeth Grøndahl. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8):2533 – 2541, aug 2007. ISSN 1525-7797. URL <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm070014y>.

- [129] Manchuta Dangkulwanich, Kaness Kongnithigarn, and Nattapat Aurnoppakhun. Colorimetric Measurements of Amylase Activity: Improved Accuracy and Efficiency with a Smartphone. *Journal of Chemical Education*, 95(1):141 – 145, jan 2018. ISSN 0021-9584. URL <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jchemed.7b00468>.
- [130] Sheri Madhu, Hayden A. Evans, Vicky V. T. Doan-Nguyen, John G. Labram, Guang Wu, Michael L. Chabiny, Ram Seshadri, and Fred Wudl. Infinite Polyiodide Chains in the Pyrroloperylene-Iodine Complex: Insights into the Starch-Iodine and Perylene-Iodine Complexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(28):8032 – 8035, jul 2016. ISSN 14337851. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201601585>.
- [131] Wolfram Saenger. The structure of the blue starch-iodine complex. *Naturwissenschaften*, 1984. ISSN 00281042.
- [132] Roberta Bussamara, Luciane Dall’Agnol, Augusto Schrank, Kátia Flávia Fernandes, and Marilene Henning Vainstein. Optimal Conditions for Continuous Immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) Lipase by Adsorption in a Packed-Bed Reactor by Response Surface Methodology. *Enzyme Research*, 2012:1 – 12, 2012. ISSN 2090-0406. URL <http://www.hindawi.com/journals/er/2012/329178/>.
- [133] Mohamed E. I. Badawy, Nehad E. M. Taktak, Osama M. Awad, Souraya A. Elfiki, and Nadia E. Abou El-Ela. Preparation and Characterization of Biopolymers Chitosan/Alginate/Gelatin Gel Spheres Crosslinked by Glutaraldehyde. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 56(6):359 – 372, jun 2017. ISSN 0022-2348. URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00222348.2017.1316640>.
- [134] S. Despond, E. Espuche, N. Cartier, and A. Domard. Hydration mechanism of polysaccharides: A comparative study. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43(1):48 – 58, jan 2005. ISSN 0887-6266. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.20277>.
- [135] Shao Hua Chiou and Wen Teng Wu. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, 2004. ISSN 01429612.
- [136] Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Michel J Bertrand, and Karen C Waldron. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5):790–6, 798–802 – 798–802, 11 2004. ISSN 0736-6205. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15560135>.

- [137] Nicholas J. Kruger. The Bradford Method For Protein Quantitation. pages 17 – 24. 2009. URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-198-7_{_}4.
- [138] Eiji Ichishima. Development of enzyme technology for *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, and *A. luchuensis*, the national microorganisms of Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(9):1681 – 1692, sep 2016. ISSN 0916-8451. URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2016.1177445>.
- [139] Bushra Aleem, Muhammad Hamid Rashid, Neelam Zeb, Anam Saqib, Ayesha Ihsan, Mazhar Iqbal, and Hazrat Ali. Random mutagenesis of super Koji (*Aspergillus oryzae*): improvement in production and thermal stability of α -amylases for maltose syrup production. *BMC Microbiology*, 18(1), dec 2018. ISSN 1471-2180. URL <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-018-1345-y>.
- [140] Orna Ernst and Tsaffrir Zor. Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (38), apr 2010. ISSN 1940-087X. URL <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1918>.
- [141] Guiyou Liu, Lei Sun, Xiuxiu Wu, Wen Zhang, Jianshu Feng, Yi Cui, Zhou Lu, Jiaojiao Shen, Zhonghua Liu, and Sheng Yuan. Immobilization of puerarin glycosidase from *Microbacterium oxydans* CGMCC 1788 increases puerarin transformation efficiency. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(2):325 – 333, jun 2014. ISSN 0104-6632. URL http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_{_}arttext{&}pid=S0104-66322014000200005{&}lng=en{&}tlng=en.
- [142] Cristina Coscolin, Ana Beloqui, Mónica Martínez-Martínez, Rafael Bargiela, Gerard Santiago, Rosa M. Blanco, Guillaume Delaitre, Carlos Márquez-Álvarez, and Manuel Ferrer. Controlled manipulation of enzyme specificity through immobilization-induced flexibility constraints. *Applied Catalysis A: General*, 565: 59 – 67, sep 2018. ISSN 0926860X. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926860X18303879>.
- [143] Rong Cao, Liyun Guan, Miaosi Li, Junfei Tian, and Wei Shen. A zero-step functionalization on paper-based biosensing platform for covalent biomolecule immobilization. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 6:13 – 18, dec 2015. ISSN 22141804. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214180415300180>.
- [144] Paula Nicolás, Verónica Lassalle, and María Luján Ferreira. Immobilization of CALB on lysine-modified magnetic nanoparticles: influence of the immobilization protocol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2):171 – 184, feb 2018. ISSN 1615-7591. URL <http://link.springer.com/10.1007/s00449-017-1855-2>.

Anexos

PUBLICAÇÕES

Biotechnology Reports 22 (2019) e00342



Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/btre

Enzymatic hydrolysis of starch into sugars is influenced by microgel assembly

Igor A. de Souza, Daniela C. Orsi, Anderson J. Gomes, Claire N. Lunardi*

Laboratory of Photochemistry and Nanobiotechnology, Universidade de Brasília, Centro Metropolitano, Brasília 72220-275, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 December 2018

Received in revised form 29 March 2019

Accepted 16 April 2019

Keywords:

Alginate
Chitosan
Beads
Starch
Hydrolysis
Reducing sugars

ABSTRACT

The use of alginate and chitosan polymer in the immobilization of *Aspergillus oryzae* ATCC 3940 fungal crude enzyme extract (CEE) amylase was presented. The assembly results change in the application of optimal pH and temperature hydrolysis to convert starch to sugar. Bead arrangement in three microgel supports: the internal support phase (IP), the external support phase (EP), and the internal and external support phase (UP). The best results were obtained using IP and EP. Reusing beads evaluated the stability of immobilized enzymes on IP support, remained active and bound during three cycles of reuse. For free and immobilized (IP) activity showed pH ranged from 5.0 to 7.0; optimum thermal enzymatic greater activity at 45 °C. The method of building the microgel influencing sugar reduction, in a single-step way to immobilize crude fungal amylase extracts can be used in industry.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Enzymes are used for starch hydrolysis (amylase or amylolytic enzymes) have attracted great attention because of biotechnological approaches and economic benefits. There are several types of amylases and the most commonly used in the industry include α -amylases, β -amylases, and glycoamylases [1,2]. Amylases are found in a wide range of organisms, including plants, animals, and microorganisms, with the latter a suitable source for the production of enzymes in industrial processes because of ease of cultivation [1,3,4].

Aspergillus oryzae is known to produce a wide variety of hydrolytic enzymes and has enormous potential to degrade a wide range of compounds [5,6]. Production of starch hydrolytic enzymes by *A. oryzae* is induced in presence of starch or maltooligosaccharides and *A. oryzae* amylases exhibit high efficiency in starch saccharification. [5] *A. oryzae* is generally recognized as a safe (GRAS) microorganism by the Food and Drug Administration and has been widely used to obtain amylases [7].

In industry, most processes use free enzymes, which are inactivated following completion reaction. The use of immobilized amylases presents advantages in relation to use of free amylases, among which we can mention possibility of reusing is the ability to

reuse the biocatalyst for more than one reaction cycle [8] and the use of a continuous process in a bioreactor. In addition, immobilized enzymes increase stability of biocatalyst in relation to variations in pH [9,10], temperature [11], and the reaction medium, besides facilitating separation and recovery of the biocatalyst and products [12–14].

Among various options of existing immobilization supports, the advantage of developing a support of alginate-chitosan polymers exists due to gel formed has a greater ability to make connections with the enzymes and synergistically stabilizes polysaccharides chain [15]. Thus entrapping the enzymes in the support, so they are not released into the reaction medium during enzymatic hydrolysis [15].

Several types of beads have been described in literature using alginate and chitosan [16,17]. Many studies have used alginate-chitosan beads to immobilize a wide range of purified enzymes [18,19]. The present study demonstrates different entrapment procedures dramatically alter enzymatic loading. We report a single-step way to immobilize crude fungal amylase extracts from *Aspergillus* ATCC 3940 using different preparation procedures of alginate, chitosan, and crude enzymatic extract. These microgels described in this method can be applied as a reusable support of enzymes in starch hydrolysis (Scheme 1).

2. Methods

Alginate, chitosan glutaraldehyde 25% and Brilliant Blue G were purchased from Sigma-Aldrich® (USA). Calcium chloride acetic acid and ethanol Vetec® (Brazil). Sabouraud dextrose Prodimol®

* Corresponding author.

E-mail addresses: iasphar@gmail.com (I.A. de Souza), danielacastilhoorsi@gmail.com (D.C. Orsi), ajgomes@unb.br (A.J. Gomes), clunardi@unb.br (C.N. Lunardi).

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00342>

2215-017X/© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

05/09/2018 870180126650
09:23

29409161808805960

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 067853 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

C PF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-970

País: Brasil

Telefone: (61)3107-4100/4137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 05/09/2018 às 09:23, Petição 870180126650

05/09/2018 870180126651
09:24

29409161808806109

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 067854 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-970

País: Brasil

Telefone: (61)3107-4100/4137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 05/09/2018 às
09:24, Petição 870180126651



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 067855 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-970

País: Brasil

Telefone: (61)3107-4100/4137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br