

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

GENIPINA COMO AGENTE ATIVADOR DE ESFERAS DE QUITOSANA PARA A
IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

ELÍ EMANUEL ESPARZA FLORES

PORTO ALEGRE

2018

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

**GENIPINA COMO AGENTE ATIVADOR DE ESFERAS DE QUITOSANA-
COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

ELÍ EMANUEL ESPARZA FLORES
Engenheiro Bioquímico

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

Porto Alegre, RS
2018

Elí Emanuel Esparza Flores
Engenheiro Bioquímico (UAA – México)

DISSERTAÇÃO

Submetida como um dos requisitos para obtenção do grau
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

Prof. Dr. Plinho F. Hertz

Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza

Banca – UNIVATES (Lajeado, RS)

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

Profa. Dra. Giandra Volpato

Banca – IFRS (Porto Alegre, RS)

Prof. Dr. Marco Antonio Záchia Ayub

Banca – UFRGS (Porto Alegre, RS)

Porto Alegre

08 de novembro de 2018

DEDICATÓRIA

*A quem cuidou de mim dia e noite;
a quem acreditou em todos meus sonhos
mesmo que parecessem loucuras;
a quem formou meu caráter
e motivou-me a nunca desistir;
a quem devo tudo...
Pais.*

AGRADECIMENTOS

Para a conclusão de um documento como este é necessária a participação de pessoas que contribuíram direta e indiretamente a quem deixo aqui minhas mais sinceras e sentidas palavras de agradecimento:

A meu Orientador, o Prof. Dr. Plinho F. Hertz, por toda a paciência e disposição para resolver minhas dúvidas, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim e a amizade, ficará sempre minha gratidão pelo acolhimento no laboratório.

À Profa. Dra. Manuela Poletto Klein, por todo esse tempo dedicado para discutir os resultados, pela criatividade para realização desta pesquisa, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e a motivação para sempre melhorar e crescer como cientista.

Ao Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues pela grande ajuda para o aperfeiçoamento da minha pesquisa, análise de resultados e orientação.

Aos magníficos colegas de laboratório, Gustavo e Camila, por todos esses conhecimentos, dicas, ajuda, parceria, risadas e interessantes conversas.

Às maravilhosas bolsistas de iniciação científica, Fernanda e Larissa pela infinita ajuda, pela oportunidade de ensinar e aprender ao mesmo tempo, por toda essa disposição para tornar essa dissertação uma realidade e por essa finesa e organização para trabalhar nos experimentos.

Aos amigos que fiz nessa jornada, especialmente à Fernanda, pessoas que sempre me apoiaram, escutaram, aportaram ideias e fizeram com que tudo parecesse mais fácil e até divertido.

Aos diversos professores e funcionários do ICTA e Instituto de Química pela presteza e à CAPES pelo apoio financeiro.

A meus pais, Rosy e Noé, por ter acreditado em mim e ser essa base forte que me manteve em pé, mesmo nos momentos mais complicados e porque sem dúvida, nunca teria chegado até esse ponto se não fosse por eles. Assim como meus irmãos Sindy e Daniel que foram pilares fortes de apoio, força e motivação.

A meus amigos do México, Brasil, Estados Unidos, França e Alemanha que sempre acreditaram em mim e torceram para que esse sonho que um dia tive, hoje vire realidade.

E por último a Deus, sempre a ajuda fiel.

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	14
2.1.1. Aplicação industrial das enzimas	14
2.1.2. Métodos de imobilização de enzimas	15
2.1.2.1. Relação entre a estabilidade da enzima e tipo de ligação	16
2.1.2.2. Relação entre estabilidade da enzima e tipo de suporte	16
2.2. IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTES POLIMÉRICOS	17
2.2.1. A quitosana	17
2.2.1.1. Propriedades, modificações e aplicações da quitosana	18
2.2.2. Quitosana como material de suporte para enzimas	19
2.3. A GENIPINA	21
2.3.1. Propriedades da genipina	22
2.3.2. Genipina como agente de entrecruzamento	25
2.4. β -GALACTOSIDASE	26
2.4.1. Imobilização de β -galactosidase	27
3. RESULTADOS	29
4. DESDOBRAMENTOS	65
4.1. OUTROS TRABALHOS REALIZADOS	65
4.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
5. CONCLUSÕES	73
6. PERSPECTIVAS	74
7. REFERÊNCIAS	75

GENIPINA COMO AGENTE ATIVADOR DE ESFERAS DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Autor: Elí Emanuel Esparza Flores

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

Neste trabalho foi estudado o efeito de diversas variáveis implicadas na reação entre a genipina e a quitosana para seu uso em imobilização enzimática. A temperatura de reação, pH, tempo e concentração de genipina foram avaliados para a ativação do suporte e a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi usada como modelo. O resultado do processo de imobilização foi caracterizado pelos parâmetros de imobilização e cinética enzimática, assim como por sua estabilidade térmica e operacional. Foi encontrado que em pH alcalino (9,0), a 60 °C por 1 h, resultou em uma atividade recuperada de 37,5 %. Também com a estabilidade térmica se determinou um fator de estabilização de 2,0 a 50 °C para a enzima imobilizada; em processo de batelada, a enzima imobilizada manteve o 100 % da atividade relativa inicial durante 40 ciclos. Esta pesquisa mostrou, pela primeira vez, um estudo completo sobre os parâmetros que afetam o processo de ativação do suporte e a possível estrutura formada entre a genipina e a quitosana.

GENIPIN AS ACTIVATOR AGENT ON CHITOSAN BEADS AS SUPPORT FOR ENZYMATIC IMMOBILIZATION

Author: Elí Emanuel Esparza Flores

Advisor: Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

In this work, we studied the effect of some variables in the reaction of genipin and chitosan, aiming at enzymatic immobilization. Reaction temperature, pH, time and genipin concentration were evaluated for support activation and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* was used as enzyme model. The resulting immobilized preparation was characterized by immobilization and kinetic parameters and thermal and operational stability. It was found that support activation at alkaline pH (9.0), at 60 °C by 1 h, resulted in an activity recovery of 37.5 %. The thermal stability showed a stabilization factor of 2.0 at 50 °C for the immobilized enzyme; on batch process, the immobilized preparation kept 100 % of its relative initial activity during 40 reaction cycles. This research shows, for the first time, a complete study about the parameters that affect the support activation process and the possible structure formed between genipin and chitosan.

1. INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas vem ganhando cada vez mais destaque com muitas possibilidades de aplicação na indústria de alimentos. As vantagens que oferece, como a reutilização do catalisador e a possibilidade de uso em processos contínuos, a estabilidade térmica e operacional e, por consequência, a diminuição nos custos de produção e a obtenção de produtos com características diferenciadas, faz com que seja atrativa esta aplicação.

Para escolher um material de suporte deve ser levado em conta a aplicação, sobretudo para decidir a natureza e o formato do mesmo. Esferas de quitosana já vem sendo utilizadas por sua versatilidade, grande área superficial, porosidade, por não apresentar toxicidade e por disponibilizar agrupamentos amina para reagir tanto com o agente ativador quanto com a enzima no processo de adsorção e ligação da mesma. Entre os agentes ativadores, um dos mais utilizados com quitosana é o glutaraldeído porém, este possui a desvantagem de ser tóxico. Alternativamente, tem sido relatado como agente de entrecruzamento para ativação de suporte, a genipina, uma molécula extraída de diversas plantas, sendo feita a extração no nosso laboratório, por método enzimático, do fruto do jenipapo (*Genipa americana*).

A genipina não apresenta toxicidade e diversos artigos referem características que a fazem segura para uso em alimentos. No entanto, grande parte dos estudos sobre a genipina são para aplicação biomédica. Em contraste, poucos estudos têm avaliado os fatores que influenciam na forma em que a genipina polimeriza e reage com a quitosana, sendo a maioria para aplicação em engenharia de tecidos e sobretudo avaliando apenas o pH.

Neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar diversos fatores que impactam a forma como a genipina vai reagir com a quitosana: avaliar concentração de genipina, tempo, temperatura e pH na ativação do suporte; verificar a melhor concentração de enzima no processo de imobilização; realizar a caracterização dos derivados por calorimetria e determinar a estabilidade térmica e operacional da enzima imobilizada.

Foi utilizada a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* como modelo para entender a formação de espaços específicos e disponibilização de agrupamentos reativos para a melhor imobilização da enzima em termos de rendimento, eficiência e atividade recuperada. Além disso, foram feitas análises de estabilidade térmica, operacional e caracterização para conhecer melhor as propriedades do derivado.

Em um segundo momento, para aproveitar a versatilidade da quitosana e a possibilidade de modificar sua estrutura física, foram fabricadas esferas porosas de quitosana usando carbonato de sódio como indutor de porosidade com o intuito de aumentar a área superficial do suporte para melhorar o rendimento e aprimorar os outros parâmetros de imobilização. Para este segundo trabalho, ainda em andamento, foram realizados testes de concentração de carbonato de sódio, tempo, temperatura e concentração de genipina na ativação do suporte e também foram feitas análises de estabilidade térmica do derivado, termogravimetria e calorimetria diferencial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

2.1.1. Aplicação industrial das enzimas

As enzimas são proteínas encontradas tanto em plantas como em animais e microrganismos(LIU; CHEN; SHI, 2018), consideradas catalisadores biológicos sustentáveis, uma vez que são biocompatíveis, biodegradáveis e procedentes de fontes renováveis. Além disso, possuem uma alta atividade catalítica, seletividade e especificidade(GASCÓN et al., 2018; ZHANG et al., 2018). Os processos enzimáticos são conduzidos, em sua maioria, em condições moderadas de pH, temperatura e pressão atmosférica, em meio aquoso e com altas taxas reacionais e seletividades. Ainda, os processos enzimáticos proporcionam rotas sintéticas mais econômicas, que geram menos resíduos e são mais eficientes energeticamente do que a síntese orgânica convencional(HAMMER; KNIGHT; ARNOLD, 2017).

Em contraste, a aplicação industrial de enzimas oferece certas dificuldades, principalmente relacionadas à baixa estabilidade térmica e operacional(GENNARI et al., 2018; LI et al., 2018) e dificuldade de recuperação e reutilização do biocatalisador, assim como a contaminação do produto final com a enzima(LI et al., 2015; SOL; VR, 2018). Para isto, a imobilização e a engenharia de proteínas são alternativas que prometem aumentar a estabilidade frente às enzimas livres e com isso aumentar as possibilidades de aplicações na indústria(BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018). Imobilização enzimática é definida como um processo no qual uma enzima solúvel é confinada num espaço e/ou matriz que a torna insolúvel e reutilizável(CAO, 2005).

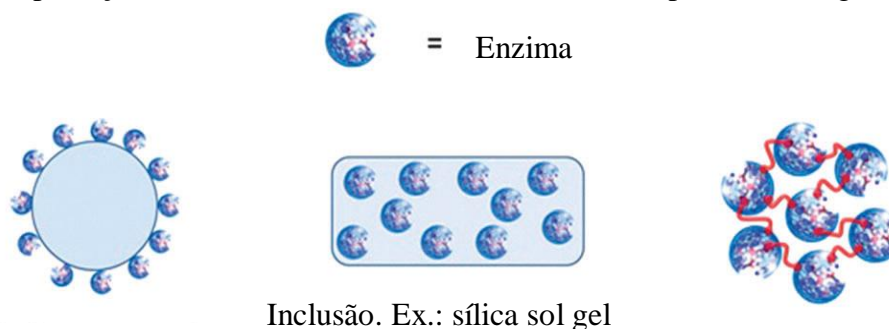
A imobilização oferece importantes vantagens frente à utilização da enzima livre, tais como: manipulação das enzimas, separação do meio reacional, reutilização do catalisador e com isso consegue-se diminuir os custos, empregar a operação contínua em biorreatores, evitar alergenicidade e até um ganho na estabilidade(MEI; HAN; WU, 2018)tanto sob condições de armazenamento ou operacionais, em relação a desnaturação por calor, por solventes orgânicos ou por autólise; todo o anterior deriva numa grande melhoria na produtividade do bioprocessamento(KLEIN et al., 2016; REMPEL et al., 2018; SHELDON; VAN PELT, 2013) além disso, idealmente o suporte oferece uma favorável

interação e grande superfície de contato com a enzima sem alterar sua bioatividade(GAS-CÓN et al., 2018). As enzimas imobilizadas têm sido aplicadas em diferentes áreas como a medicina, indústria farmacêutica, indústria alimentícia, tratamento de efluentes, têxteis, desenvolvimento de biocombustíveis, entre outras(BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018; KRIŽNIK et al., 2018).

2.1.2. Métodos de imobilização de enzimas

Os métodos de imobilização podem ser divididos em três categorias: ligação a um suporte, inclusão (ou encapsulação) e entrecruzamento(CHEN et al., 2018b; SHELDON; VAN PELT, 2013). Porém, nem sempre um método só é ideal para todas as moléculas e propósitos, considerando a complexidade e diversidade de estruturas proteicas(SOL; VR, 2018). Dessa forma, a seleção do método torna-se de grande importância, pois determina os parâmetros de imobilização e as características da reação catalisada.

A encapsulação é a inclusão de uma enzima em redes poliméricas, geralmente



Ligação a um suporte

Inclusão. Ex.: sílica sol gel

Fig. 1 Métodos de imobilização enzimática, adaptado de SHELDON & VAN PELT, (2013).

matrizes poliméricas, ou membranas como fibras ocas ou microcápsulas. Neste caso, previne-se a perda de enzima(MELLER; SZUMSKI; BUSZEWSKI, 2017).

O entrecruzamento de agregados ou cristais enzimáticos, empregando um reagente bifuncional como o glutaraldeído, a genipina e o polivinil álcool, é utilizado para preparar macropartículas livres de suporte. O uso de um suporte leva, inevitavelmente, a uma diluição da atividade, devido à introdução de uma porção não-catalítica. Entretanto, sendo formada uma monocamada de enzima na superfície do suporte(SOL; VR, 2018), as vantagens são muito maiores perante os outros dois mecanismos mencionados, uma vez que proporcionam uma alta concentração de atividade enzimática no biocatalisador. Pode-se ainda melhorar a estabilidade e, por consequência, permitir uma alta taxa de reutilização da enzima e do suporte(SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.1.2.1. Relação entre a estabilidade da enzima e tipo de ligação

A estabilidade de uma enzima imobilizada está relacionada a diversos fatores como o número e a natureza das ligações entre o suporte e a enzima, o grau de confinamento da enzima, a orientação (URRUTIA et al., 2018b), o micro ambiente gerado entre a enzima e o suporte e as condições de imobilização (CAO, 2005).

As ligações podem ser de natureza física como interações de Van Der Waals, ligações de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, assim como inclusão física. O método da inclusão física é limitado pela tendência de dessorção da enzima do suporte e alta sensibilidade às condições do ambiente. Já as técnicas de natureza química ou por ligação covalente (POORAKBAR et al., 2018; SOL; VR, 2018) diminuem a possibilidade de dessorção, pois as ligações multipontuais geradas por este método oferecem uma alta estabilização da enzima (NADAR; RATHOD, 2018). Contudo, este tipo de imobilização pode gerar muitos pontos de ligação, ocasionando uma distorção do biocatalisador, obstrução do sítio ativo e por consequência problemas de acesso do substrato ao sítio ativo; diminuindo assim a atividade do derivado (DUARTE et al., 2017; MIGNEAULT et al., 2004a; RODRIGUES et al., 2013; TANRISEVEN; ASLAN, 2005; WAHBA; SOLIMAN, 2018; ZHANG; ROCHEFORT, 2011).

O número de ligações, o tipo e a orientação delas afetará diretamente a estabilidade e a eficiência da imobilização, pois tem um efeito direto na atividade da enzima imobilizada e por consequência na atividade recuperada final do derivado. A orientação da enzima depende em primeira instância da interação física e química do suporte com o agente ativador e depois dos grupos gerados disponíveis para favorecer uma reação covalente multipontual entre o suporte ativado e a enzima (RODRIGUES et al., 2013; URRUTIA et al., 2018a).

2.1.2.2. Relação entre estabilidade da enzima e tipo de suporte

A efetividade da imobilização é governada principalmente pelas características e propriedades tanto da enzima como do suporte de imobilização. As interações entre os dois proporciona propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas.

Os materiais mais comumente utilizados como suportes são: sílica gel, polímeros orgânicos, polímeros naturais, vidro poroso, carvão ativado, sílica mesoporosa, nanotubos de carbono, coordenados entre metais e materiais orgânicos, etc.(HU et al., 2018).

A eleição do material de suporte vai depender também das características da enzima, do bioprocesso e dos parâmetros aos quais o sistema será submetido, visto que a escolha de um material inadequado pode provocar diluição, lixiviação e desintegração do suporte dificultando assim a recuperação e purificação dos produtos. Além disso, o material de suporte deve apresentar uma boa interação com a enzima a ser imobilizada(MELLER; SZUMSKI; BUSZEWSKI, 2017; SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.2. IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTES POLIMÉRICOS

A seleção do material de suporte é muito importante pois oferece uma superfície química e fisicamente compatível com a enzima e define grandemente a funcionalização do biocatalisador(BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018). A estrutura e propriedades do suporte são fundamentais, pois afetarão o desempenho da enzima imobilizada.

Os biopolímeros naturais representam uma alternativa como suporte de imobilização, visto que são economicamente viáveis e apresentam grande versatilidade de formatos (esferas, filmes, estruturas nanométricas, entre outros)(POORAKBAR et al., 2018; ROSENTHAL et al., 2018). Carboidratos insolúveis como celulose, amido, dextranas, agarose e quitosana, bem como proteínas como albumina e gelatina, têm sido amplamente utilizados como suportes para imobilização de enzimas(CAO et al., 2016; CUI et al., 2014).

2.2.1. A quitosana

Quitosana é um polissacarídeo natural, linear e catiônico, formado por unidades de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), ligação esta que é produzida pela desacetilação alcalina da quitina(PELLÁ et al., 2018; RUI et al., 2017). A quitosana é o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose(CHEN et al., 2018b; MORAN et al., 2018) e é amplamente distribuída em organismos vivos, incluídos cascos de crustáceos, cutícula de insetos, cefalópodos, nematódeos parasitas e na parede celular de fungos(SHINYA; FUKAMIZO, 2016). Ainda, é um bioproduto da indústria pesqueira(KURNIASIH et al., 2018). Dado que a quitina tem uma hidrosolubilidade muito baixa e limitada utilidade, é necessária a derivação à quitosana que é muito

mais estudada e aplicada, sobretudo na área biomédica(CHANPHAI; TAJMIR-RIahi, 2018; SAYED; MILLARD; JARDINE, 2018).

A quitosana foi isolada pela primeira vez em 1811, produzida a partir de quitina de cogumelos, pelo professor Henri Branconnot. Depois Rougeut (1859) descobriu o tratamento alcalino necessário para obter quitosana solúvel e só em 1894 Hoppe-Seyler nomearam o derivado como quitosana(MORAN et al., 2018).

2.2.1.1. Propriedades, modificações e aplicações da quitosana

As propriedades químicas da quitosana são determinadas pela massa molecular e pelo grau de desacetilação, o qual define a taxa de solubilidade do polímero. Quanto mais desacetilado, menos hidrossolúvel (RIOS et al., 2018) e mais viscoso. A massa molecular pode ser baixa (70 kDa), média (190 – 310 kDa) ou alta (500 kDa)(CARVALHO et al., 2018).

É um dos polímeros mais estudados por sua natureza inerte, baixo custo, hidrofobicidade, não toxicidade(KAUSHAL; SINGH; ARYA, 2018), caráter bacteriostático, e forte adesividade(XIONG et al., 2018).É atrativo também por sua versatilidade, biocompatibilidade(MEI; HAN; WU, 2018), hemocompatibilidade(OUERGHEMMI et al., 2018) e biodegradabilidade(CHEN et al., 2018b; ZUBAREVA et al., 2017); características que fazem com que seja ideal para ser utilizado em bioprocessos(MELLER; SZUMSKI; BUSZEWSKI, 2017) e inclusive para liberação controlada de fármacos(CHANPHAI; TAJMIR-RIahi, 2018).

A quitosana tem sido utilizada como agente antimicrobiano. Em alguns casos, é utilizada em combinação com outro polímero orgânico ou inorgânico para produzir filmes com uma expressiva ação antimicrobiana. Entretanto seu uso está limitado pela baixa solubilidade em água e alta solubilidade em soluções ácidas(CARVALHO et al., 2018; KURNIASIH et al., 2018).

A modificação química, além de dar estabilidade ao polímero, também lhe confere novas características para diversas aplicações(MORAN et al., 2018). Por exemplo, a carboxilação da quitosana tem sido usada para aumentar a solubilidade em água e, ao mesmo tempo, tem uma capacidade antifúngica maior do que aquela apresentada pela quitosana. Dessa forma, a carboxilação da quitosana pode ser usada em gazes na área biomédica(KURNIASIH et al., 2018).

De modo semelhante, a succinilação confere uma maior solubilidade à quitosana em meios ácidos e alcalinos, alta capacidade de retenção de água, alta capacidade antioxidante, habilidades quelantes e com isso uma extensa utilização do succinil-quitosana em aplicações biomédicas(RIOS et al., 2018). A sulfonação da quitosana forma um composto que, segundo a literatura, possui propriedades antibacterianas, anti-HIV-1, redução de absorção proteica no sangue, anticoagulante e capacidade anti-trombogênica com atividade comparável à heparina(OUERGHEMMI et al., 2018).

O 6-deoxy-6-amino quitosana tem sido usado como transportador de genes com uma atividade antimicrobiana melhor do que o polímero original, efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *Aspergillus niger*(SA-YED; MILLARD; JARDINE, 2018).

A quitosana também foi modificada usando 1-(3-aminopropil)-imidazol e depois funcionalizada com bromoetano, 2-bromoetanol, 2-bromoetilamina hidrobromida, ácido cloroacético, 8-bromo-1-octanol e 12-bromododecan-1-ol para depois acoplar nanopartículas de Fe₃O₄ e imobilizar lipase pancreática porcina(SUO et al., 2018).

A reação da quitosana com moléculas como a da genipina confere uma capacidade antioxidante, sendo também amplamente estudada para aplicações biomédicas(HOBBS et al., 2018; SHANMUGAM et al., 2018). Este complexo genipina-quitosana também apresenta um aumento na estabilidade mecânica e na porosidade do derivado, assim como a quantidade de grupos disponíveis para ligar com proteínas no caso da imobilização enzimática(MUZZARELLI et al., 2015).

2.2.2. Quitosana como material de suporte para enzimas

Como suporte para imobilização de enzimas, a quitosana oferece uma série de características desejáveis, incluindo: alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais para a reação direta com enzimas ou para modificação química, hidrofili- cidade, resistência à degradação química, propriedades antimicrobianas e facilidade de preparação em uma variedade de formas físicas (CAVELLO; CONTRERAS-ESQUIVEL; CAVALITTO, 2014; RUI et al., 2017). Outra característica muito importante da quitosana é a sua porosidade, pois permite a imobilização de enzimas não apenas na superfície do suporte como também nos poros formados, aumentando assim o rendimento do processo de imobilização(COSCOLÍN et al., 2018).

O tratamento da quitosana com agentes de entrecruzamento aumenta a estabilidade mecânica, sua capacidade de adsorção e previne sua dissolução em soluções ácidas(CHEN et al., 2009; CUI et al., 2014). Principalmente, este tratamento oferece grupos reativos para ligar com a enzima, criando um microambiente propício para que o biocatalisador seja funcional.

A quitosana pode ser ativada ou funcionalizada com o objetivo de obter uma imobilização covalente mais forte(PELLÁ et al., 2018). Essa ativação pode ser obtida por vários agentes como glutaraldeído(KAUSHAL; SINGH; ARYA, 2018), metil aciloil glicina(PELLÁ et al., 2018), glicidol ou epicloridina (RODRIGUES et al., 2008), L-lisina (AYHAN; AYHAN; GULSU, 2012), tripolifosfato(CARVALHO et al., 2018; CHEN et al., 2018a), *p*-benzoquinona(TALEKAR et al., 2013), dextrano polialdeído(MATEO et al., 2004), diglicidil éter, diisocianato(MUZZARELLI et al., 2016), genipina(MA et al., 2013; MI et al., 2003; MUHAMAD et al., 2011; MUZZARELLI, 2009; MUZZARELLI et al., 2015; NERI-NUMA et al., 2017), entre outros.

A quitosana tem sido utilizada como material de suporte para diversas enzimas como:

- catalase de fígado bovino em quitosana e um complexo de quitosana-bentonita usando glutaraldeído como agente de entrecruzamento(KAUSHAL; SINGH; ARYA, 2018);
- um complexo de alcalase de *Bacillus subtilis* e tripsina pancreática de porco utilizando nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ cobertas de quitosana e ativadas com tripolifosfato sódico(CHEN et al., 2018a);
- bromelina em acoplados de quitosana-montmorilonita, -sepiolita e -bentonita foram ativados com glutaraldeído(BENUCCI et al., 2018);
- α-amilase de *Aspergillusoryzae* usando esferas de quitosana-montmorilonita ativadas com glutaraldeído(MARDANI et al., 2018);
- α-glicosidase de *Aspergillusniger* foi imobilizada também em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ cobertas com quitosana e ativadas com glutaraldeído(LIU; CHEN; SHI, 2017);
- o conjunto de alcane hidroxilase e lipase de *Alcanivorax borkumensis* em quitosana ativada com tripolifosfato(KADRI et al., 2018);

- α -galactosidase isolada de tomate foi também imobilizada em esferas de quitosana usando glutaraldeído como ativador do suporte e derivatizadas com ácido aminofenilborónico para aumentar a afinidade pela enzima (DEMIR; ÖNAL, 2018);
- lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em quitosana funcionalizada com glutaraldeído (ALAMSYAH et al., 2017);
- lipase de *Candida rugosa* e β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em micropartículas de quitosana-magnetita e ativadas com glutaraldeído (POSPISKOVA; SAFARIK, 2013);
- β -galactosidase de *A. oryzae* em quitosana funcionalizada com glutaraldeído e com epicloridina (URRUTIA et al., 2018a);
- β -galactosidase de *A. oryzae* foi imobilizada em esferas de quitosana suplementadas com Na_2CO_3 para aumentar a porosidade do suporte e usando glutaraldeído como agente de entrecruzamento (WAHBA, 2018);
- β -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* e de *Alkalilactibacillus ikkense* em nanofibras de quitosana e foram funcionalizadas com polivinil álcool (HAGHJU; BARI; KHALED-ABAD, 2018);
- β -galactosidase de *Bacillus circulans* foi imobilizada em esferas de quitosana funcionalizadas com glutaraldeído (DUARTE et al., 2017).

2.3. A GENIPINA

A quitosana possui grupamentos amino disponíveis para a imobilização, mas estes grupamentos podem ser modificados pela introdução de reagentes bifuncionais que promovem a ligação cruzada entre a enzima e o suporte. A genipina pode ser utilizada para este fim, tendo a vantagem de ser de 5.000 a 10.000 vezes menos tóxica em comparação ao glutaraldeído, agente normalmente utilizado (MUZZARELLI, 2009; MUZZARELLI et al., 2015, 2016; SUNG et al., 1999; TEIMOURI et al., 2019).

A genipina é uma iridoide glicosídeo aglicona (HOBBS et al., 2018) e pode ser obtida por métodos enzimáticos, químicos e físicos (CAVELLO; CONTRERAS-ESQUIVEL; CAVALITTO, 2014; MONTA et al., 2015) a partir do geniposídeo presente nos frutos *Castilleja tenuiflora*, *Bellardiatrixago*, *Eucommia ulmoides*. Mais comumente, a genipina é obtida a partir da *Gardenia jasminoides* J. Ellis (gardênia) (BELLÉ et al., 2018; KO et al., 2017; LEE et al., 2018), uma planta da família das Rubiaceae e originária

da Ásia(SHANMUGAM et al., 2018), ou também a partir da *Genipa americana* L. (genipapo), planta nativa de regiões que vão desde o sul do México passando pela América Central e até o norte do Brasil(BRAUCH et al., 2016), estando presente tanto no endocarpo quanto no mesocarpo do jenipano e representando mais do 70 % do total dos iridoides presentes na fruta(BELLÉ et al., 2018).

2.3.1. Propriedades da genipina

Devido à sua biocompatibilidade única, uma grande vantagem do uso da genipina é que ela pode ser utilizada diretamente em tecidos vivos(PELLÁ et al., 2018). Também apresenta uma citotoxicidade muito baixa (5000 – 10000 vezes menos) comparada com outras substâncias convencionalmente utilizadas como agentes de entrecruzamento como o glutaraldeído e compostos epóxi (MUZZARELLI et al., 2015). Ainda, a genipina possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais(SUN et al., 2018), antidepressivas(HOBBS et al., 2018), antifúngicas(KO et al., 2017) e antiangiogênicas. É considerada um agente antidiabético e imunossupressor, associada a tratamentos de padecimentos como icterícia, edema e hipertensão(SHIN; LEE, 2017), e doenças relacionadas a processos inflamatórios, incluindo alguns tipos de câncer (leucemia, mama, próstata, colon e carcinoma hepatocelular)(LEE et al., 2018; SHANMUGAM et al., 2018). Ademais, possui propriedades antimicrobianas, efeitos neuroprotetivos(BRAUCH et al., 2016; CUI et al., 2017; LIN et al., 2013) e pode ser usada como veículo para liberação de fármacos(MUZZARELLI, 2009). Existem ainda muitas outras vantagens que fazem com que seja amplamente estudada e já utilizada em diferentes terapias e tratamentos médicos.

A genipina em solução é incolor, mas na presença de oxigênio esta reage com as aminas primárias e com proteínas, produzindo um pigmento azul-roxo solúvel em água. Na Ásia, o corante conhecido como “azul gardênia” é usado em massas, bebidas, presunto, vinhos, licores, produtos do mar processados e assados(HOBBS et al., 2018).

Particularmente, as formas glicosiladas (geniposídeos) presentes na gardênia precisam de tratamento enzimático com β -glicosidases para remover o grupo aglicona e deixar assim a genipina livre (Figura 2). Além da genipina, derivados dela (geniposídeo e ácido geniposídico) podem reagir com outros compostos e produzir pigmentos. A formação do pigmento é catalisada pela presença de oxigênio e também é dependente de fatores como pH, temperatura, presença de aminoácidos e concentração destes aminoácidos(CHEN et al., 2004; NERI-NUMA et al., 2017).

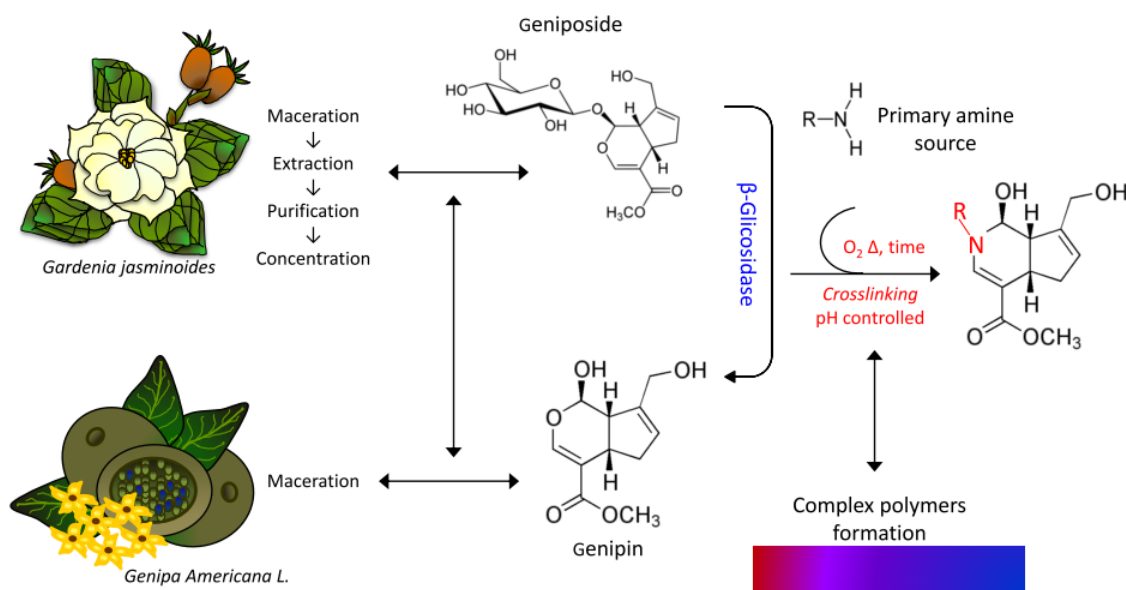


Fig. 2 Obtenção de genipina. Adaptado de NERI-NUMA et al., (2017)

A genipina em presença de glicina e lisina promove a formação de coloração azul/roxa, enquanto que em presença de valina, metionina ou tirosina resulta em colorações azul/verde. Já tonalidades pretas e verdes são obtidas usando prolina e triptofano, respectivamente (NERI-NUMA et al., 2017). Além disso, tem sido observado que a coloração azul se intensifica linearmente com o aumento da concentração de aminoácidos presentes no meio (BRAUCH et al., 2016).

A obtenção de hidrogéis usando genipina tem sido relatada para aplicações em engenharia de tecidos, utilizando como base fibroína, celulose e quitosana (CHRONOPOULOU et al., 2018; SUN et al., 2018). Os géis formados pelo complexo genipina-quitosana possuem características desejáveis para sua aplicação na imobilização de enzimas, pois além dos atributos já mencionados tanto para a genipina como para a quitosana quando estão separadas, a genipina confere uma estabilização nas cadeias da quitosana (PELLÁ et al., 2018), resultando em um aumento na resistência mecânica do derivado (YAO et al., 2012).

A forma como a genipina reage com as cadeias poliméricas da quitosana é dependente de vários fatores, e cada um tem um impacto diferente. Dentre eles, destacam-se:

- **a concentração de genipina** define a densidade da rede que se forma na superfície do polímero. Quanto mais densa a rede, a estabilidade mecânica do derivado é maior (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015). Além disso, à medida que aumenta

a concentração da genipina, pode ser favorecida uma polimerização genipina-genipina e não só a reação genipina-quitosana(CAVELLO; CONTRERAS-ESQUIVEL; CAVALITTO, 2014; MA et al., 2018a; SUNG et al., 2000).

- **o pH do meio de reação:** quando o pH do meio for baixo (ácido), a alta concentração de prótons faz com que o ataque nucleofílico da amina primária da quitosana sobre o anel da genipina no carbono número três seja acelerado(YU et al., 2015), para depois, de maneira mais lenta, ocorrer a condensação aldólica entre o grupo aldeído formado na genipina e a amina secundária da cadeia polimérica da quitosana (Fig. 3)(CHEN et al., 2004; MI et al., 2003). Quando o pH é maior (alcalino), a abertura espontânea do anel da genipina é favorecida pela presença dos íons hidroxila(MUZZARELLI, 2009), o que resulta na formação de ligações genipina-genipina com facilidade e também na formação das ligações genipina-quitosana, formando cadeias longas e flexíveis (Fig. 4)(DELMAR; BIANCOPELED, 2015; MI; SHYU; PENG, 2005).
- **o tempo e a temperatura de reação** incidem diretamente na cinética da reação favorecendo uma maior polimerização genipina-quitosana e genipina-genipina, conforme aumenta a temperatura e o tempo de reação, sendo esta última reação mais favorecida em tempos e temperaturas maiores(CAVELLO; CONTRERAS-ESQUIVEL; CAVALITTO, 2014).

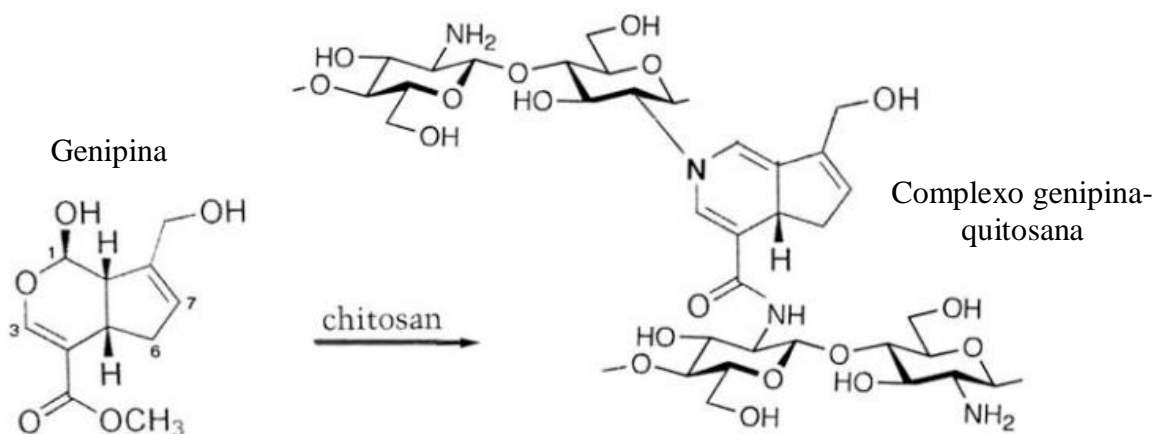


Fig. 3 Mecanismo de reação entre genipina e quitosana em pH ácido. Adaptado de MUZZARELLI, (2009).

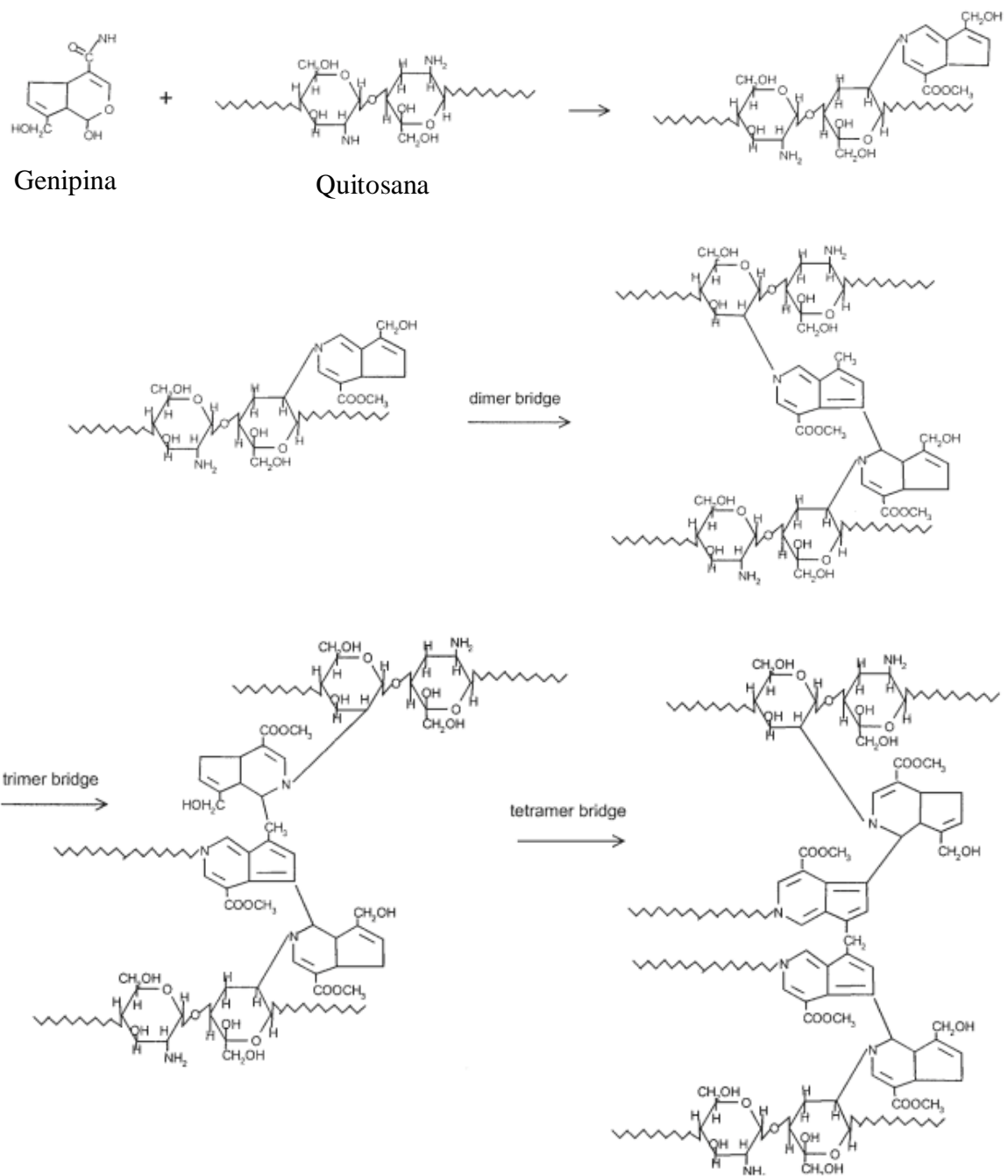


Fig. 4 Mecanismo de reação entre genipina e quitosana em pH alcalino. Adaptado de MI, SHYU & PENG, (2005)

2.3.2. Genipina como agente de entrecruzamento

As características da genipina fazem com que esta seja muito atrativa para o uso como agente de entrecruzamento, pois, além de possuir uma toxicidade muito baixa, provém de fontes naturais, sendo uma alternativa à utilização de compostos sintéticos (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015; MUZZARELLI et al., 2016). A genipina já tem sido

utilizada como agente de entrecruzamento como tem sido relatado nos seguintes exemplos:

- ligação entre duas enzimas, a glicose oxidase e a catalase para a síntese de ácido glicônico, com a finalidade de diminuir a distância entre as duas enzimas e melhorar a eficiência, obtendo assim uma atividade dez vezes maior à apresentada pelas enzimas livres(CUI et al., 2017);
- criação de uma rede polimérica formada por quitosana-gelatina para absorção de corantes(CUI et al., 2016);
- entrecruzamento de quitosana-poli-L-lisina para a formação de biomateriais para aplicação em engenharia de tecidos(MEKHAIL; JAHAN; TABRIZIAN, 2014);
- entrecruzamento de carboximetilquitosana com genipina para analisar as propriedades conferidas pela genipina à nova membrana para aplicação também em engenharia de tecidos(FIAMINGO; CAMPANA-FILHO, 2016);
- imobilização da lacase de *Trametes pubescens* pelo método de confinamento em esferas de quitosana para a degradação de corantes sintéticos(MA et al., 2018a);
- imobilização de CotAlacase de *Bacillus subtilis* em filmes de quitosana usando genipina como agente de entrecruzamento(GONÇALVES et al., 2017);
- imobilização da β -galactosidase de *A. oryzae* em esferas de quitosana utilizando genipina como agente de entrecruzamento apresentando uma atividade recuperada satisfatória e melhor estabilidade térmica comparado com o processo de imobilização tradicional usando glutaraldeído; encontrou-se que a enzima imobilizada utilizando genipina manteve 100% da sua atividade inicial depois de sua utilização em 25 bateladas de hidrólise de lactose(KLEIN et al., 2016).

2.4. β -GALACTOSIDASE

As β -galactosidases pertencem a um grupo de enzimas de suma importância para a indústria de alimentos devido à sua capacidade de hidrolisar a lactose (D-galactopiranosil-(1-4)-D-glicopiranosose) em seus monossacarídeos D-glicose e D-galactose(GENNARI et al., 2018; HENRIQUES et al., 2018; KAMRAN et al., 2016). Esta hidrólise permite o consumo de leite e produtos derivados por pessoas intolerantes (tecnológica e sensorialmente) à lactose. Permite, também, a obtenção de produtos com melhores características(TODOROVA-BALVAY et al., 2007), por exemplo, evitando a formação de

crystalinos em sorvete, doce de leite e leite condensado, melhorando suas características sensoriais como suavidade e cremosidade, e sua aceitação por parte do consumidor(WAHBA; SOLIMAN, 2018; WOLF; GASPARIN; PAULINO, 2018).

Durante a hidrólise da lactose pode ocorrer também a formação simultânea de galactooligossacarídeos, mediante a reação de transgalactosilação. Um oligossacarídeo não digerível consumido como prebiótico pode estimular o desenvolvimento da microbiota intestinal(ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018; GÄNZLE, 2012; GUERRERO et al., 2017, 2018; KLEIN et al., 2013; SZCZODRAK, 2015; SUÁREZ et al., 2018). Essas bactérias resultam em efeitos positivos à saúde mediante a redução dos níveis de colesterol, produção de vitaminas essenciais e propriedades anticarcinogênicas (KAMRAN et al., 2016).

A enzima β -D-galactosídeo galactohidrolase ou lactase (EC. 3.2.1.23) (IUBMB, 1980) pertence à família das hidrolases, sendo responsável pela hidrólise do resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4Glc), dando origem a uma mistura equimolar de glicose e galactose(GOSLING et al., 2010; GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017).

As β -galactosídeses podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, particularmente amêndoas, pêssego, damasco e maçã; entre animais e órgãos de animais, como intestino, cérebro, testículos, placenta e também são produzidas em grande quantidade por microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos filamentosos as fontes preferidas para aplicações comerciais(DUAN et al., 2017).

A β -galactosídesase de *Aspergillusoryzae* é uma enzima monomérica de 113 kDa(RODRÍGUEZ et al., 2018; TODOROVA-BALVAY et al., 2007) usada amplamente não apenas na hidrólise da lactose, como também na síntese de galactooligossacarídeos(URRUTIA et al., 2013; VERA et al., 2012; YIN et al., 2017),resultando em uma boa atividade hidrolase e transgalactosilase(URRUTIA et al., 2018a).

2.4.1. Imobilização de β -galactosídesase

Atualmente, pesquisas mostram diferentes métodos de imobilização envolvendo β -galactosídesase que utilizam materiais de suporte diversos e com finalidades distintas, seja para simples hidrólise de lactose ou para produção de galactooligossacarídeos(GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2003). Dentre os métodos já realizados, listam-se os seguintes:

- obteve-se um alto rendimento de imobilização mediante ligações covalentes em poros de vidro silanizado modificado utilizando β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, alcançando uma atividade recuperada de 90% (SZCZODRAK, 2015);
- imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando goma arábica como suporte, ativada com persulfato de potássio e acrilamida; assim mostrou uma eficiência de 5,55 % e uma hidrólise de lactose em leite UHT de 93,92 % após três ciclos de hidrólise (WOLF; GASPARIN; PAULINO, 2018);
- imobilização de β -galactosidase de *A. oryzae* utilizando esferas de alginato-cobalto reticuladas com glutaraldeído, com uma atividade recuperada de 83% (ATES; ORHON; TÜNAY, 1997);
- β -galactosidase de *A. oryzae* foi imobilizada em terra diatomácea magnética coberta de polianilina e funcionalizada com glutaraldeído, onde observou-se uma estabilidade térmica sem diferença significativa para a enzima imobilizada e a livre a 55 e 60 °C (CABRERA et al., 2018);
- β -galactosidase de *A. oryzae* foi imobilizada em nanopartículas de agarose e de sílica magnética ativadas com grupamentos éster de cianato proveniente de 1-ciano-4-dimetilaminopiridino tetrafluoroborato (CDAP-BF₄), obtendo-se um rendimento de imobilização de 67 % (RODRÍGUEZ et al., 2018);
- β -galactosidase de *A. oryzae* também foi imobilizada em esferas de vidro de borossilicato ativadas com 3-aminopropil trietoxissilano (3-APTES), para a produção de galactooligossacarídeos em um reator de leito empacotado resultando em um rendimento de 39,3 % na produção de galactooligossacarídeos com uma taxa de conversão de 56,4 % a partir de lactose; além disso, manteve a eficiência na produção em 8 ciclos, perdendo apenas 4,6 % da atividade relativa inicial (ESKANDARLOO; ABBASPOURRAD, 2018);
- utilizando esferas de carragena funcionalizada com proteína isolada de soro de leite (WPI) e glutaraldeído, foi imobilizada β -galactosidase de *A. oryzae* mostrando uma atividade recuperada de 34,80 % e o derivado manteve 93,84 % da sua atividade relativa inicial após 13 ciclos de uso em solução de lactose 217 mM (WAHBA; SOLIMAN, 2018).

3. RESULTADOS

Os resultados para o uso de genipina como agente ativador de esferas de quitosana como suporte para imobilização de enzimas serão apresentados em forma de artigo que será submetido à revista *Biomacromolecules*.

Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization

Elí Emanuel Esparza Flores¹, Fernanda Dias Cardoso¹, Larissa Bertoldo Siqueira¹, Natália Carminatti Ricardi⁴, Tania Haas Costa⁴, Rafael C. Rodrigues³, Manuela Poletto Klein², Plinho Francisco Hertz¹

¹Enzymology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

²Nutrition Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite St, ZC 90050 170, Porto Alegre, RS, Brazil

³Biocatalysis and Enzyme Technology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Chemistry Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Tel: +55 51 3308 7094

E-mail address: plinho@ufrgs.br (P. F. Hertz)

Abstract

In this work, we studied the effect of some variables in the reaction between genipin and chitosan, to form a support for enzyme immobilization. Reaction temperature, pH, time and genipin concentration were evaluated for support activation and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* was used as the enzyme model. The resulting immobilized preparation was characterized by immobilization and kinetic parameters and by thermal and operational stability. It was found that support activation at alkaline pH (9.0), at 60 °C by 1 h, resulted in an activity recovery of 37.5 %. The thermal stability showed a stabilization factor of 2.0 at 50 °C for the immobilized enzyme. In batch process, the immobilized preparation kept 100 % of its relative initial activity during 40 reaction cycles. This research show, for the first time, a complete study about the parameters that affect the support activation process and the possible structure formed between genipin and chitosan.

Keywords: thermal stability, operational stability, crosslinking, β -galactosidase.

1. INTRODUCTION

Genipin is the aglycone of geniposide and has been found from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis, which belongs to the family of Rubiaceae, and also from *Castillejaten-uiflora*, *Bellardia trixago*, *Eucommia ulmoides*.¹⁻⁴ Besides, the iridoid represents more than 70 % of the iridoids found in the fruit endocarp and mesocarp of *Genipaamericana* L, a native plant distributed from Southern Mexico, through Central America to Northern Brazil.^{1,5}

Genipin was reported presenting activities as antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor,⁶ anti-depressive,⁷ antifungal,⁴ antiangiogenic, antidiabetic, immunosuppressant;⁸ used in treatments of jaundice, edema and hypertension,⁹ inhibits the proliferation of several cancer cells, including leukemia, breast, prostate and hepatocellular carcinoma^{2,3}, and those characteristics make genipin widely studied mostly for biomedical applications.

Some studies reported the great capacity of genipin to generate crosslinking between proteins and polymers like collagen, gelatin and chitosan.^{7,10,11} Because of this ability, as an alternative to glutaraldehyde in the enzyme immobilization, genipin has been used.¹²⁻¹⁵ Although glutaraldehyde is the most used as support activator for enzyme immobilization,¹⁶⁻¹⁸ but it is cytotoxic, so genipin is safer for application in food processes.¹⁹

In addition, genipin is a versatile molecule, in the polymerization process. Variables like genipin concentration, pH, time and temperature reaction, presence or absence of determined amino acids and their concentrations, and the oxygen can change the way that genipin reacts and polymerizes.^{11,20-26} It can generate different spatial structures, colors and capacities such as mechanical resistance and swelling capacity.^{27,28}

Thus, we decided use genipin as an activator agent on chitosan beads. Chitosan has been widely used as support for enzyme immobilization due its characteristics like non-

toxicity, been inert,²⁹ biocompatible,³⁰ biodegradable,^{31,32} bacteriostatic,³³ cheap¹⁵ and versatile, so can adopt diverse forms and sizes³⁴ been ideal to use in bioprocess.³⁵

To test our model, we used β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, a monomeric enzyme of 113 kDa^{36,37} and used to hydrolyze lactose and for the synthesis of galactooligosaccharides^{38,39} because of its good hydrolase and transgalactosylase activity.⁴⁰

To the best of our knowledge, there are no reports dealing with the effects of reaction parameters between genipin and chitosan, such as pH, temperature, genipin concentration and time, and how it affects the enzyme immobilization. So, in this work we used β -galactosidase as enzyme model to studied all those parameters and characterize the immobilized preparations.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*O*-NPG) and chitosan (from shrimp shells, ≥ 75 % deacetylated), were obtained from Sigma-Aldrich. Genipin from *Genipa americana* was obtained by enzymatical extraction.¹ A D-glucose determination kit was purchased from Labtest Diagnóstica SA (São Paulo, Brazil). All solvents and other chemicals were analytical grade.

2.2. Preparation of the chitosan beads

A 3% (w/v) chitosan solution was prepared in 2% (w/v) acetic acid via mechanical stirring. The coagulation solution was NaOH 1 N. The chitosan solution was dropped into the NaOH solution under stirring. Afterwards the formed chitosan beads were washed with distilled water and then stored in the fridge till used.

2.3. Activation of chitosan beads

The chitosan beads were added to a genipin solution and five parameters were evaluated during the activation of chitosan beads and cross linkage with the enzyme: genipin concentration, enzyme concentration, pH, temperature and time. All experiments were conducted in triplicate.

2.4. Influence of genipin and enzyme concentration

Three concentrations of genipin solutions (1.5, 2.5 and 5.0 mg mL⁻¹ in sodium phosphate buffer pH 6.0, 0.1 M) with different enzyme concentrations (5, 10 and 20 U mL⁻¹ in acetate buffer 0.1 M, pH 4.5, see section 0) were used. For both steps it was used 2.0 mg mL⁻¹ of support in dry basis.

2.5. Influence of pH

The influence of pH was tested using genipin solutions with different pHs (from 4 to 12). In this case, the concentration of genipin used in the activation (at 37 °C during 3 h) of chitosan beads was 1.5 mg mL⁻¹, and 10 U mL⁻¹ of enzyme activity were used in the immobilizations. For both steps was used again 2.0 mg mL⁻¹ of support in dry basis.

2.6. Influence of time and temperature

Distinct temperatures (25, 37, 50, 60 and 70 °C) and times (0.5, 1, 2, 3, 6 and 12 h) were evaluated. In each assay, 50 chitosan beads (20 mg of support) were activated followed by enzyme immobilization according to the conditions above described (section 0).

2.7. Enzyme immobilization

For enzyme immobilization, 5 mL of β -galactosidase solution were added to 50 chitosan beads (20 mg) and incubated at 25°C for up to 24 h under stirring. Afterwards, the support was separated from the solution and washed with 5 mL acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), NaCl (0.1 M) and ethylene glycol (30% v/v) to remove the non-covalently bound proteins.

2.8. Enzymatic activity assay

β -D-Galactosidase activity was determined using o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. For this, 50 μ L of the enzyme solution was added to 450 μ L of ONPG solution (16.8 mM in acetate buffer 0.1 M, pH 4.5) and the reaction was let to proceed during 3 min at 40 °C in a thermostatic bath. The reaction was stopped by adding 1.5 mL of carbonate buffer (0.1 M, pH 10) and the absorbance was measured at 415 nm. The activity of the immobilized enzyme was also measured using o-nitrophenyl- β -D-

galactopyranoside (ONPG) as substrate. The reaction was performed by adding 5 chitosan beads (2 mg of support) to 1 mL of ONPG solution (15.12 mM in acetate buffer 0.1 M, pH 4.5) and the reaction was left to proceed during 3 min, at 40 °C, under vigorous stirring. The reaction was stopped adding 3 mL of carbonate buffer (0.1 M, pH 10) and the absorbance was measured at 415 nm. All experiments were conducted in triplicate.

The activity recovery (AR) of immobilization was calculated according to Sheldon and van Pelt,⁴¹ as follows:

$$\text{Activity Recovery (\%)} = \frac{\text{Observed activity}}{\text{Starting activity}} \times 100$$

2.9. Characterization of genipin-activated chitosan beads

The thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Perkin Elmer Pyris 1 TGA, at a heating rate of 10 °C min⁻¹ from 20 to 700 °C under air atmosphere. Changes on the molecular structure of chitosan particles were determined before and after activation with genipin (pH 6 and 9) and after enzyme immobilization (support activated on pH 6 and 9) by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) spectroscopy with a Bomem Hartmann & Braun spectrometer. Samples previously lyophilized were crushed and then analyzed; the spectra were obtained at room temperature with 32 accumulative scans and resolution of 4 cm⁻¹ (Supplementary Data).

2.10. Kinetic parameters

The kinetic parameters K_M and V_{max} of free and immobilized enzyme were determined by non-linear regression using increasing concentrations of ONPG in solution (from 5 mM to 50 mM in acetate buffer 0.1 M, pH 4.5) as described above.

2.11. Thermal stability

The thermal stability of free and immobilized (on support activated at pH 6 and pH 9) enzyme was determined by measuring the residual activity of the biocatalysts after its incubation in sealed tubes containing acetate buffer (0.1 M, pH 4.5) in a thermostatically controlled water bath at 50°C and 60°C. All determinations were done in triplicate.

2.12. Operational stability

The operational stability of the immobilized enzyme was performed in batch cycles by incubating 120 chitosan beads (48 mg of support) in 4 mL of a buffered lactose solution (5% w/v lactose solution in acetate buffer 0.1 M, pH 4.5). Every cycle was performed during 250 min at 40 °C under stirring. Samples were withdrawn periodically and analyzed enzymatically for glucose formation. After each cycle, the immobilized enzyme was filtered, washed with acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), and reintroduced into a fresh lactose solution. The percentage of lactose hydrolysis after the first cycle was defined as 100%. This determination was conducted in duplicate.

2.13. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS software (v. 9.3). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and mean comparison of different treatments was carried out using test Tukey's test ($p \leq 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Influence of genipin and enzyme concentration

Activator agent concentration plays a very important role in the enzyme immobilization process, being responsible for the number of reactive groups needed to bind the enzyme to the support.⁴²In this work the determination of all important immobilization parameters was performed and the main ones are listed in **Table 1**. A complete table containing parameters of efficiency (IE) and yield (IY) can be accessed in the supplementary materials.

As can be observed in the Table 1, varying the genipin concentration from 1.5 mg mL⁻¹ to 5.0 mg mL⁻¹, maintaining the time and temperature of activation in 3 h and 37 °C, the values of activity recovery (AR) and specific activity (SA) increased with genipin concentration until 2.5 mg mL⁻¹ using different enzyme concentrations (for 5 U mL⁻¹, AR was 36.0 % and SA was 413.8 U g⁻¹), then decreased when the genipin concentration reached to 5 mg mL⁻¹ (AR was 30.2 % and SA was 347.0 U g⁻¹). This suggests that the high activator concentration leads an excessive internal self-polymerization, thus decreasing the available groups for enzyme attachment.¹¹

Table 1: Influence of enzyme and genipin concentration on the activity recovery (AR%) and specific activity (SA).

Genipin concentration (mg mL ⁻¹)	Enzyme concentration (U mL ⁻¹)					
	5		10		20	
	AR (%)	SA (U g ⁻¹)	AR (%)	SA (U g ⁻¹)	AR (%)	SA (U g ⁻¹)
1.5	28.6±0.1 ^b	328.7±1.3 ^b	28.3±0.9 ^{ab}	643.4±11.9 ^b	19.0±0.9 ^b	872.3±40.9 ^b
2.5	36.0±3.0 ^a	413.8±34.8 ^a	31.8±1.9 ^a	731.4±44.3 ^a	22.5±1.5 ^a	1035.4±67.1 ^a
5.0	30.2±0.1 ^b	347.0±1.6 ^b	24.7±1.2 ^b	568.6±28.6 ^b	20.0±0.1 ^b	921.0±4.1 ^b

Any two means in the same column followed by the same letter are not significantly ($p \leq 0.05$) different according to Tukey test.

On the other hand, when the crosslinker concentration is too high, it causes a genipin saturation generating an internal polymerization genipin-genipin and genipin-chitosan reducing the available groups to bind the enzyme.^{13,20,22} It was reported that an excess of crosslinking agent decreases the enzyme immobilization of β -galactosidase from *A. oryzae* on amino silane magnetic nanoparticles.⁴³

The protein amount that can be adsorbed on a specific amount of support and the portion functionalized has a big impact in the enzyme immobilization efficiency. In general, it was observed an increase in the immobilization yield up to 10 U mL^{-1} of enzyme, and at 20 U mL^{-1} , the immobilization yield decreased (data not shown); consequently, the AR had the same behavior. This can be explained by the probably protein saturation on the support.⁴⁴ Thereby, the AR decreased when the enzyme concentration increased (for 2.5 mg mL^{-1} of genipin, AR was 36.0 % in 5 U mL^{-1} , 31.8 % in 10 U mL^{-1} and 22.5 % in 20 U mL^{-1}). This can be related to the diffusional problems probably due the raise of protein aggregation on the chitosan beads surface, thus decreasing the immobilization efficiency and consequently the activity recovery. In other words, catalytic sites could be hidden, impeding the substrate access. Similar phenomenon was observed and reported-when glucose-6-phosphate dehydrogenase was immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles.⁴⁵

Genipin is an expensive reagent, which is limiting for use in immobilization of enzymes. Thus, considering that there was no significant difference in AR for the lower concentrations, we have decided to use the minor genipin concentration (1.5 mg mL^{-1}) and the intermediary enzymatic solution (10 U mL^{-1}) for the next experiments.

3.2. Influence of pH

The pH is a very important factor for the enzyme immobilization, since the crosslinking reaction mechanisms for chitosan with genipin are different at each pH value. Thus, according to Fig. 5, at pH 4, AR was 0.95 % and increased with the increase of activation pH until reach the maximum at pH 9, with AR of 37.9 % and decreased again, reaching to an AR of 23.2 % at pH 12. Low pH values provided the conditions to the nucleophilic attack from the primary amine to the carbon number 3 from genipin, being this process accelerated in a reaction medium with a high proton concentration.²³

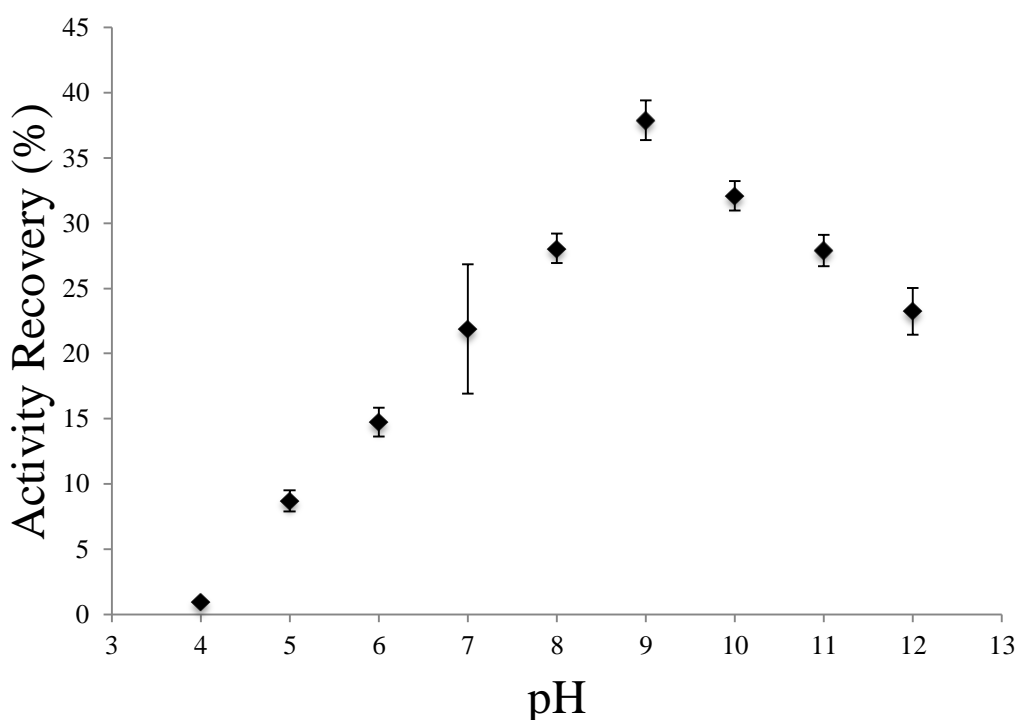


Fig. 5 Influence of pH during the support activation on the activity recovery. The crosslinking/activation was performed using 1.5 mg mL^{-1} of genipin solution ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 h) and an enzyme solution containing 10 U mL^{-1} .

Afterwards, the aldol condensation takes place between the genipin aldehyde group formed and the secondary amine from the chitosan chain.^{24,25} This reaction produces short and closed chains of chitosan-genipin, decreasing the available groups in the support surface for enzyme attachment, consequently leading to a decrease in AR. Instead, under

basic conditions, the genipin ring suffers an attack by the presence of hydroxyl groups on the reaction solution,¹⁹ leading to the formation of genipin-chitosan bonds, with a high probability of self genipin polymerization, producing long and flexible chains of genipin^{11,27} deriving in more open networks. Then, allowing greater enzyme attachment to the support, consequently, improving AR.

When the pH increased, it was not observed differences on the immobilization yield among the pH values (IY of 77.2 % and 75.5 % for pH 9 and 12, respectively). On the other hand, immobilization efficiency was affected (IE 49.0 % and 30.8 % for pH 9 and 12, respectively –supplementary material-). This may have happened because the increase on pH values generates a bigger ionization of genipin and chitosan chains, producing multipoint attachments, which may have caused changes on tertiary conformational of the enzyme structure and consequently, a decrease of AR. A similar phenomenon was reported where it was observed the pH dependency on the crosslink process between genipin and chitosan, been less efficient in acid pH.¹¹ Thus, the pH 9 was defined as the best condition to activate the support in the next experiments.

The pH also determines the color and intensity on the resultant activated support,^{23,27} and it can variate according to the type of amino acids and density of them.²⁸ In this case, it was observed a blue color on the beads at the end of activation support process, been lighter at acid pH and darker at high pH values.

3.3. Effect of time and temperature of support activation

The internal genipin polymerization depends directly on factors like pH, genipin concentration, activation time and temperature which leads to formate a spatial matrix to allow the enzyme attachment on the support.⁴⁶ It was observed that low temperatures (25 °C) demands more time to let genipin react with chitosan (24 h) and seems to create a

better spatial matrix for enzyme immobilization, reflected by a higher immobilization efficiency (44,7%), despite of this the yield and activity recovery (Table 2) was lower(59,7 and 26.7%, respectively).

On the other hand, at short times and high temperatures, the immobilization yield was higher but the efficiency and the activity recovery was lower (70 °C by 0.5 h, IY of 82.5 %, IE of 37.8 % and AR of 31.6 %). This fact could be explained by the inverse correlation between time and temperature required to let the internal self-polymerization genipin-genipin and genipin-chitosan, where the high temperature and short time is enough to the reaction takes place; so, the best combination was 60 °C by 1 h (IY 86.1 % and IE 43.5 %). In the literature, it was related for the β -galactosidase from *A. oryzae* immobilization, the best IY was 67 % and IE of 46 %, also using chitosan beads activated with genipin.¹ Besides the yield, it was observed the AR, because it is the parameter that represents the efficiency compared with the total offered activity.⁴¹

Table 2: Effect of the time and temperature on the activation support. Enzyme immobilization was carried out using an enzyme concentration of 10 U mL⁻¹ in acetate buffer pH 4.5. The support was activated at pH 9.0 using 1.5 mg mL⁻¹ of genipin solution.

Temperature (°C)	Time (h)	Activity Recovery (%)	Specific Activity (U g ⁻¹)
25	6	24.9±1.9 ^f	555.4±35.8 ^f
	12	25.5±0.4 ^{ef}	535.1±23.0 ^{ef}
	24	26.7±0.6 ^{def}	541.3±15.1 ^{def}
37	2	24.7±0.3 ^f	587.6±5.6 ^f
	3	28.3±0.9 ^{bcdef}	650.3±8.8 ^{bcdef}

	6	29.1±1.7 ^{bcdef}	642.4±16.7 ^{bcdef}
50	0.5	29.7±0.9 ^{bcde}	577.4±17.9 ^{bcde}
	1	27.1±1.4 ^{cdef}	630.9±21.1 ^{cdef}
	2	27.9±1.6 ^{bcdef}	642.9±32.3 ^{bcdef}
	3	28.0±1.4 ^{bcdef}	658.6±4.0 ^{bcdef}
60	0.5	31.8±0.5 ^b	618.8±8.5 ^b
	1	37.5±2.4 ^a	769.8±6.9 ^a
	2	30.8±3.5 ^{bcd}	646.5±57.0 ^{bcd}
70	0.5	31.2±0.8 ^{bcd}	685.1±18.2 ^{bcd}
	1	31.6±0.2 ^{bc}	648.2±7.4 ^{bc}

Any two means in the same column followed by the same letter are not significantly ($P \geq 0.05$) different according to Tukey test.

Then, in the condition of 60 °C by 1 h, the AR reached 37.5 %, being the best value and different from the other tests. This can be explained as the necessity to find the best combination of time and temperature to create a spatial matrix with genipin chains with a specific size to allow the enzyme attachment efficiently.¹³

It was observed, for keratinase immobilization, that as the activation temperature of chitosan-genipin beads raised, the yield decreased, but in that work the authors tested longer activation times (40 and 50 °C for 6 h).²² Also was reported similar results for immobilized lipase, as the temperature and the time of activation of mesoporous resins with genipin rose, the immobilization yield decreased; again, the activation times were longer too (40 °C by 3, 6, 9, 12 and 15 h).⁴⁷ In our work, it was tested shorter times, precisely to avoid this phenomenon, thus was defined the condition 60 °C by 1 h to support activation.

3.4. Immobilization time

The control of immobilization time between the enzyme and the activated support is very important to determine the moment that gives the better immobilization parameters.⁴⁷ As can be seen in Fig. 6, the immobilization yield increased as time progressed, being the IY of 83.0 % and IE of 36.5 % in 8 h of contact. After 24 h, the IY increased to 89.1 %, but the IE dropped to 29.3 %. This behavior may be related to an excessive immobilization time that can cause multipoint attachment and conformational changes on the enzyme tertiary structure causing decrease on the immobilization efficiency.^{48,49} Was reported similar results for the immobilized laccase on chitosan beads with genipin as activator agent; in that case, 14 h was the immobilization time where the efficiency reached the maximum.²¹ For the β -galactosidase, was defined 8 h as the immobilization contact time.

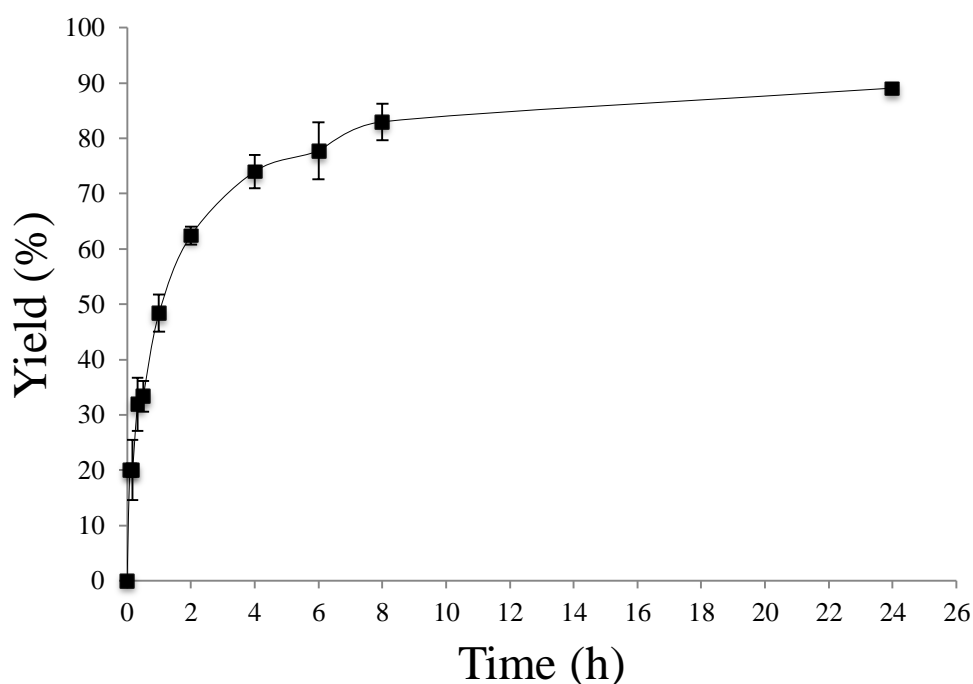


Fig. 6: Immobilization time of β -galactosidase on chitosan beads in aqueous suspension at pH 4.5 (buffer acetate, 0.1 M, room temperature). The chitosan activation was performed with genipin solution, 1.5 mg mL⁻¹, at 60 °C for 1 h.

3.5. Thermogravimetric analysis (TGA)

Dehydration and decomposition are the thermal degradation mechanisms of polymers that can be analyzed using TGA technique. All samples were measured and Fig. 7 shows in first moment, one separate step degradation around 290 °C on chitosan and chitosan-genipin activated in pH 9 beads showing practically no differences on thermal stability; for the chitosan-genipin activated in pH 6, was observed one separated degradation around 220 °C, the same step degradation also was observed on both samples with the enzyme immobilized.

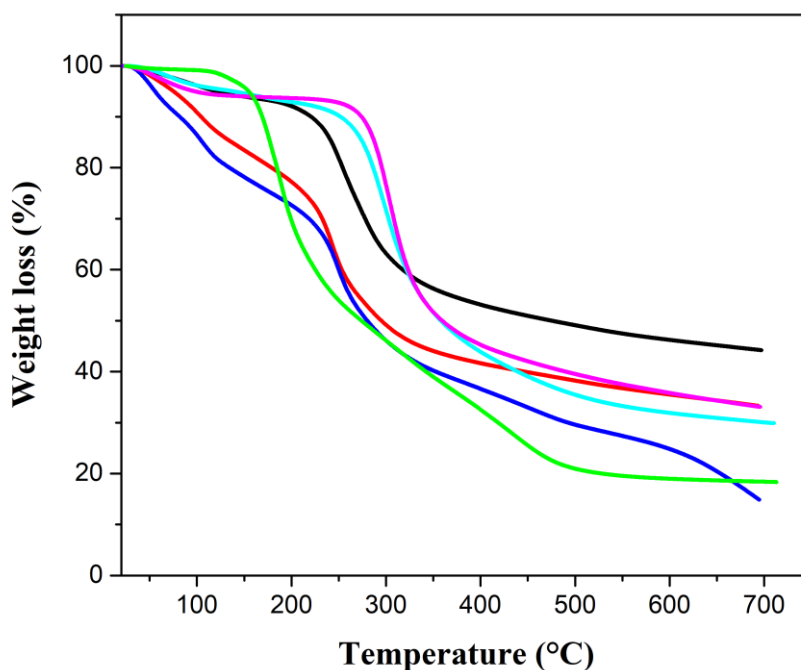


Fig. 7: Termogravimetric analysis. Performed at 10 °C min⁻¹ under air atmosphere. Chitosan (pink), chitosan-genipin activated in pH 9 (light blue), chitosan-genipin, activated in pH 6 (black), chitosan-genipin-enzyme, –support activated in pH 9- (royal blue), chitosan-genipin-enzyme, –support activated in pH 6- (red) and genipin (green).

On the other hand, for genipin was observed degradation around 150 °C, this first degradation step is related with dehydration, especially for the both chitosan-genipin-enzyme samples, depolymerization and pyrolytic decomposition of polysaccharide chains with vaporization and elimination of volatile products.^{50,51}

The chitosan activation with genipin, particularly at pH 9 demonstrated to maintain the thermal support material, however for the genipin-chitosan activated in pH 6, this depolymerization occurred before, demonstrating been less thermo-resistant, this weakening phenomena, observed after crosslink process has been reported for chitosan cross-linked with genipin,⁵² tannic acid⁵³ and in glutaraldehyde films.⁵⁴ These findings revealed that the derivatives are thermally stable up to 220 °C.

3.6. Kinetic parameters

Kinetic parameters, K_M and v_{max} , were determined for the free and immobilized enzyme (support activated at pH 9) varying the substrate concentration. In this work, the K_M for the free and immobilized enzyme was 11.5 and 54.4 mM respectively; for v_{max} , the values obtained were 20.01 and 20.35 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ of protein, for free and immobilized enzyme, respectively, indicating there was no changes in the v_{max} when the enzyme was immobilized. Generally, the raise in K_M is related to affinity between the enzyme and the substrate. Therefore, the small value of free enzyme would indicate greater affinity than immobilized enzyme.⁵⁵ However, the most likely explanation is the diffusional limitation in the immobilized enzyme, because of lesser accessibility of substrate to the catalytic site by probable enzyme conformational changes after immobilization^{42,56,57} or steric hindrances.⁵⁸ In previous works, it has been reported a K_M of 119.0 mM and 187.9 mM for free and immobilized β -galactosidase, respectively, with the same substrate as the one used in this study but on gellan gum with polyethyleneimine and chitosan

as support, activated with glutaraldehyde.⁵⁷ Also, was reported a K_M of 98.19 mM for the same enzyme immobilized on calcium pectinate and using ONPG as substrate.⁵⁹

3.7. Thermal stability

The thermal stability of an immobilized biocatalyst is crucial for the industrial applications.⁶⁰ It could depend on the support material, immobilization process or the enzyme itself,⁶¹ thus temperature can inactivate the enzyme, so necessarily it has to be evaluated.^{62,63} As can be observed in **Fig. 8**, when the free and immobilized enzyme were tested at 50 °C, the half-life of the free enzyme was reached at 43.8 h. The immobilized enzyme on support activated at pH 6 had almost the same behavior, resulting in 42.7 h as half-life. However, for the β -galactosidase immobilized on support activated at pH 9, the half-life showed a considerable increase to 89.2 h, been 2.0 times more stable when compared to the free enzyme and to the enzyme immobilized in the support activated at pH 6.

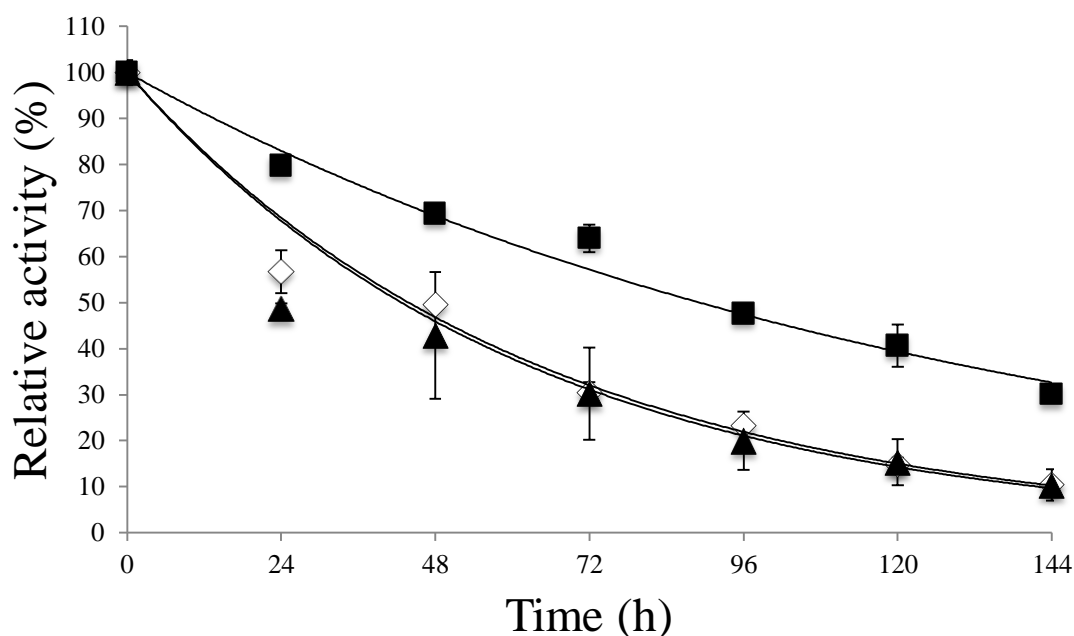


Fig. 8: Thermal stability, at 50 °C, of the immobilized enzyme-support activated at pH 9- (■), Free enzyme (◇) and Immobilized enzyme -support activated at pH 6- (▲).

When these biocatalysts were tested at 60 °C, the free enzyme has his half-life reduced to 28.0 min, almost the same as the immobilized enzyme on support activated at pH 6 (28.9 min). Again, for the immobilized enzyme on support activated at pH 9, the half-life was increased (44.3 min), resulting a stabilization factor (SF) of 1.6.

These differences between the enzyme immobilized on the support activated at different pH can be explained by the internal genipin polymerization under pH 9, resulting in the formation of long and flexible chains, causing a better enzyme attachment on the support. This also can produce multipoint binding increasing the enzyme stability, different from the immobilized enzyme on support activated at pH 6, where the polymeric chains are shorter, consequently, the attachment is more limited and weak, causing greater exposition of the enzyme to the environment, therefore, greater susceptibility to inactivation by temperature.

The raise on the thermal stability of immobilized enzyme can be related to the protection provided by the 3D structure formed between the enzyme and the chitosan support.^{64,65} This allows the conformation of the catalytic site to remain intact; also this stability can come from the multipoint enzyme attachment to the support.^{66,67}

3.8. Operational stability

Reuse capacity is a desirable advantage of immobilized biocatalysts compared to free enzymes, causing a decrease in operational process costs.⁴¹ Operational stability, using the enzymatic derivative, resulting from activation process at pH 9, was conducted in batch process for the conversion of lactose in galactose and glucose. The first cycle reached a lactose hydrolysis of 67.6 % and it was considered as the 100 % of relative activity to reference the further cycles. As can be seen in the Fig. 9, after 40 cycles the relative activity was the same in the lactose hydrolysis, demonstrating the reuse viability

of the derivative. This result can be attributed to the rigidity of the enzyme attachment on the support, preventing the catalytic site deformation and thus maintaining the same activity during all cycles.⁶⁸

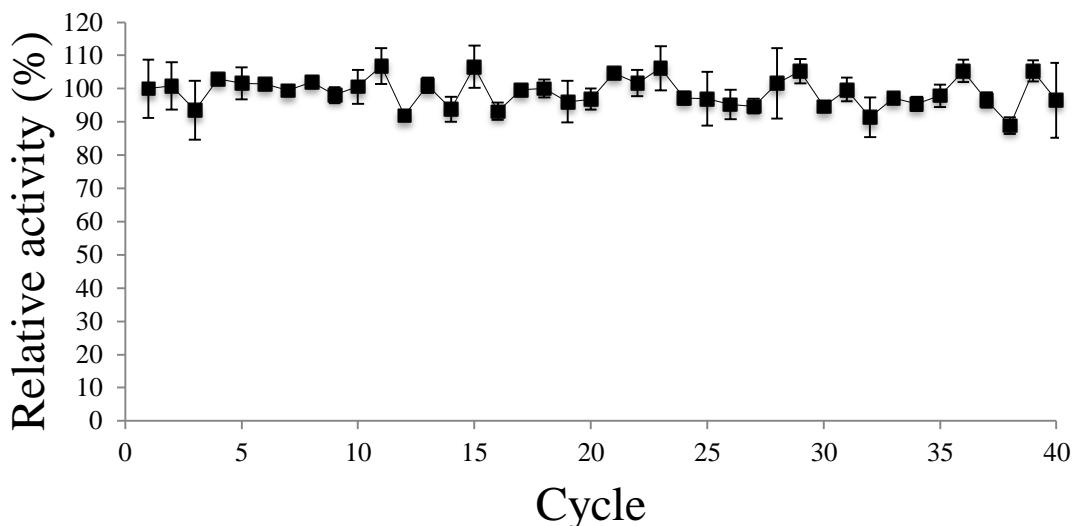


Fig. 9: Cycles of operational stability. Batch cycles of 250 min each, conducted with 12 mg of support (activated at pH 9) per mL of lactose 5 % (w/v) at 40 °C under stirring.

The result determined in this work is superior to some related in literature, using the same enzyme, but different support material and activator (β -galactosidase in gellan gum using polyethyleneimine), maintained 85.17 % of initial relative activity after 14 cycles.⁶⁹ On the other hand, using the same support material and activator, but different enzyme (keratinase in chitosan using genipin) retained only 61.3 % of initial relative activity after 5 cycles.

4. Conclusion

An effective method for chitosan beads activation using genipin was developed and tested with β -galactosidase, presenting high thermal and operational stability, besides a

high resistance of the derivative demonstrated by the calorimetric analysis. Was demonstrated that pH, time, temperature and genipin concentration affects highly the crosslinking reaction between genipin and chitosan, determining the genipin self-polymerization way. In addition, this process provides more or less reactive groups to bind the enzyme allowing the immobilization process in the best way. Moreover, our results can be explored by studies using other enzymes with different sizes and different substrates, since varying activation conditions we can change the form of genipin polymerization and thus, change the support matrix affecting the pore size and crosslinking network.

Acknowledgments

This work was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – CNPq and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – CAPES, from Brazilian government.

References

- (1) Bellé, A. S.; Hackenhaar, C. R.; Spolidoro, L. S.; Rodrigues, E. E. F. *Enzyme-Assisted Extraction of Genipin from Genipap (Genipa Americana L .) and Its Application as a Crosslinker for Chitosan Gels. Food Chem.***2018**, *246* (November 2017), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>.
- (2) Lee, S.; Jun, H.; Cheul, S.; Lee, D. Genipin Inhibits the Invasion and Migration of Colon Cancer Cells by the Suppression of HIF-1 α Accumulation and VEGF Expression. *Food Chem. Toxicol.***2018**, *116* (October 2017), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.005>.
- (3) Shanmugam, M. K.; Shen, H.; Tang, F. R.; Arfuso, F.; Rajesh, M.; Wang, L.; Prem, A.; Bian, J.; Cher, B.; Bishayee, A. Potential Role of Genipin in Cancer

- Therapy. *Pharmacol. Res.* **2018**, *133* (October 2017), 195–200.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.007>.
- (4) Ko, J.; Shin, N.; Park, S.; Cho, Y.; Kim, J.; Seo, C.; Shin, I. International Immunopharmacology Genipin Inhibits Allergic Responses in Ovalbumin-Induced Asthmatic Mice. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *53* (October), 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.010>.
- (5) Brauch, J. E.; Zapata-Porras, S. P.; Buchweitz, M.; Aschoff, J. K.; Carle, R. Jagua Blue Derived from *Genipa Americana* L. Fruit: A Natural Alternative to Commonly Used Blue Food Colorants? *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 365–372.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.029>.
- (6) Sun, Y. S.; Huang, C. Y.; Chen, C. S.; Chang, J. H.; Hou, W. T.; Li, S. J.; Hao, Y. L.; Pan, H.; Huang, H. H. Bone Cell Responses to a Low Elastic Modulus Titanium Alloy Surface Immobilized with the Natural Cross-Linker Genipin. *Surf. Coatings Technol.* **2018**, *350* (155), 918–924.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.03.069>.
- (7) Hobbs, C. A.; Koyanagi, M.; Swartz, C.; Maronpot, R.; Recio, L.; Hayashi, S. Genotoxicity Evaluation of the Naturally-Derived Food Colorant , Gardenia Blue , and Its Precursor , Genipin. **2018**, *118* (May), 695–708.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.001>.
- (8) TIAN, J. S.; ZHAO, L.; SHEN, X. L.; LIU, H.; QIN, X. M. 1H NMR-Based Metabolomics Approach to Investigating the Renal Protective Effects of Genipin in Diabetic Rats. *Chin. J. Nat. Med.* **2018**, *16* (4), 261–270.
[https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30056-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30056-6).
- (9) Shin, J.; Lee, S. Genipin Protects the Liver from Ischemia / Reperfusion Injury by Modulating Mitochondrial Quality Control. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**,

- 328, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.002>.
- (10) Muzzarelli, R. A. A.; El Mehtedi, M.; Bottegoni, C.; Gigante, A. Physical Properties Imparted by Genipin to Chitosan for Tissue Regeneration with Human Stem Cells: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 1366–1381. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.075>.
- (11) Delmar, K.; Bianco-Peled, H. The Dramatic Effect of Small PH Changes on the Properties of Chitosan Hydrogels Crosslinked with Genipin. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *127*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039>.
- (12) Cui, C.; Chen, H.; Chen, B.; Tan, T. Genipin Cross-Linked Glucose Oxidase and Catalase Multi-Enzyme for Gluconic Acid Synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2228-z>.
- (13) Ma, X.; Qiao, C.; Zhang, J.; Xu, J. Effect of Sorbitol Content on Microstructure and Thermal Properties of Chitosan Films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *119*, 1294–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.060>.
- (14) Gonçalves, I.; Nunes, C.; Mendes, S.; Martins, L. O.; Ferreira, P.; Coimbra, M. A. CotA Laccase-ABTS/Hydrogen Peroxide System: An Efficient Approach to Produce Active and Decolorized Chitosan-Genipin Films. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *175*, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.029>.
- (15) Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M. H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. Chitosan Crosslinked with Genipin as Support Matrix for Application in Food Process: Support Characterization and β -d-Galactosidase Immobilization. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>.
- (16) Barbosa, O.; Torres, R.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R. Versatility of Glutaraldehyde to Immobilize Lipases: Effect of the Immobilization Protocol on

- the Properties of Lipase B from *Candida Antarctica*. *Process Biochem.* **2012**, *47* (8), 1220–1227. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.019>.
- (17) Betancor, L.; López-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Different Mechanisms of Protein Immobilization on Glutaraldehyde Activated Supports: Effect of Support Activation and Immobilization Conditions. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39* (4), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.014>.
- (18) López-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Improved Stabilization of Chemically Aminated Enzymes via Multipoint Covalent Attachment on Glyoxyl Supports. *J. Biotechnol.* **2005**, *116* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.09.015>.
- (19) Muzzarelli, R. A. A.; El Mehtedi, M.; Bottegoni, C.; Aquili, A.; Gigante, A. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Marine Drugs*. 2015. <https://doi.org/10.3390/md13127068>.
- (20) Sung, H. W.; Chang, Y.; Liang, I. L.; Chang, W. H.; Chen, Y. C. Fixation of Biological Tissues with a Naturally Occurring Crosslinking Agent: Fixation Rate and Effects of PH, Temperature, and Initial Fixative Concentration. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52* (1), 77–87. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200010\)52:1<77::AID-JBM10>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200010)52:1<77::AID-JBM10>3.0.CO;2-6).
- (21) Ma, H. F.; Meng, G.; Cui, B. K.; Si, J.; Dai, Y. C. Chitosan Crosslinked with Genipin as Supporting Matrix for Biodegradation of Synthetic Dyes: Laccase Immobilization and Characterization. *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *132* (35), 664–676. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.02.008>.
- (22) Cavello, I. A.; Contreras-Esquivel, J. C.; Cavalitto, S. F. Immobilization of a

- Keratinolytic Protease from *Purpureocillium Lilacinum* on Genipin Activated-Chitosan Beads. *Process Biochem.***2014**, *49* (8), 1332–1336.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.016>.
- (23) Yu, S. H.; Wu, S. J.; Wu, J. Y.; Wen, D. Y.; Mi, F. L. Preparation of Fucoidan-Shelled and Genipin-Crosslinked Chitosan Beads for Antibacterial Application. *Carbohydr. Polym.***2015**, *126*, 97–107.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.068>.
- (24) Chen, S. C.; Wu, Y. C.; Mi, F. L.; Lin, Y. H.; Yu, L. C.; Sung, H. W. A Novel PH-Sensitive Hydrogel Composed of N,O-Carboxymethyl Chitosan and Alginate Cross-Linked by Genipin for Protein Drug Delivery. *J. Control. Release***2004**, *96* (2), 285–300. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.002>.
- (25) Mi, F.-L.; Sung, H.-W.; Shyu, S.-S.; Su, C.-C.; Peng, C.-K. Synthesis and Characterization of Biodegradable TPP/Genipin Co-Crosslinked Chitosan Gel Beads. *Polymer (Guildf)*.**2003**, *44* (21), 6521–6530.
[https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00620-7).
- (26) Muzzarelli, R. A. A. Genipin-Crosslinked Chitosan Hydrogels as Biomedical and Pharmaceutical Aids. *Carbohydr. Polym.***2009**, *77* (1), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>.
- (27) Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Peng, C. K. Characterization of Ring-Opening Polymerization of Genipin and PH-Dependent Cross-Linking Reactions between Chitosan and Genipin. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.***2005**, *43* (10), 1985–2000. <https://doi.org/10.1002/pola.20669>.
- (28) Neri-Numa, I. A.; Pessoa, M. G.; Paulino, B. N.; Pastore, G. M. Genipin: A Natural Blue Pigment for Food and Health Purposes. *Trends Food Sci. Technol.***2017**. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.018>.

- (29) Kaushal, J.; Singh, G.; Arya, S. K. Immobilization of Catalase onto Chitosan and Chitosan – Bentonite Complex : A Comparative Study. *Biotechnol. Reports***2018**, *18*, e00258. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00258>.
- (30) Xiong, Y.; Li, X.; Xiong, M.; Vikash, S.; Liu, P.; Wang, M.; Zhu, Y.; Yuan, W.; Zhang, Q.; Fu, B.; et al. Chitosan Combined with Swimming Promotes Health in Rats. *Int. J. Biol. Macromol.***2018**, *118*, 2092–2097. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.067>.
- (31) Chen, M.; Runge, T.; Wang, L.; Li, R.; Feng, J.; Shu, X. Hydrogen Bonding Impact on Chitosan Plasticization. *Carbohydr. Polym.***2018**, *200* (June), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.062>.
- (32) Zubareva, A.; Shagdarova, B.; Varlamov, V.; Kashirina, E.; Svirshchevskaya, E. Penetration and Toxicity of Chitosan and Its Derivatives. *Eur. Polym. J.***2017**, *93* (October 2016), 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.021>.
- (33) Carvalho, M.; Lopes, V.; Corrêa, R.; Kelley, F.; Raimundo, J.; Neto, D. O.; Amorim, A.; Borges, L.; Menezes, D.; Corrêa, A. International Journal of Biological Macromolecules Improving Peptide Quanti Fi Cation in Chitosan Nanoparticles. **2018**, *119*, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.119>.
- (34) Mei, S.; Han, P.; Wu, H. One-Pot Fabrication of Chitin-Shellac Composite Microspheres for e Ffi Cient Enzyme Immobilization. *J. Biotechnol.***2018**, *266* (November 2017), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.015>.
- (35) Meller, K.; Szumski, M.; Buszewski, B. Microfluidic Reactors with Immobilized Enzymes—Characterization, Dividing, Perspectives. *Sensors Actuators, B Chem.***2017**, *244*, 84–106. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.021>.
- (36) Todorova-Balvay, D.; Stoilova, I.; Gargova, S.; Vijayalakshmi, M. a. An Efficient Two Step Purification and Molecular Characterization of Beta-

- Galactosidases from *Aspergillus Oryzae*. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *19*, 299–304.
<https://doi.org/10.1002/jmr>.
- (37) Rodríguez, E.; Francia, K.; Brossard, N.; García, J. J.; Kalay, H.; Kooyk, Y. Van; Freire, T.; Giacomini, C. Enzyme and Microbial Technology Immobilization of β -Galactosidase and α -Mannosidase onto Magnetic Nanoparticles : A Strategy for Increasing the Potentiality of Valuable Glycomic Tools for Glycosylation Analysis and Biological Role Determination of Glyco. *Enzyme Microb. Technol.* **2018**, *117* (May), 45–55.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.012>.
- (38) Yin, R.; Wang, K.; Du, S.; Chen, L.; Nie, J.; Zhang, W. Design of Genipin-Crosslinked Microgels from Concanavalin A and Glucosyloxyethyl Acrylated Chitosan for Glucose-Responsive Insulin Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103* (1), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.067>.
- (39) Vera, C.; Guerrero, C.; Conejeros, R.; Illanes, A. Enzyme and Microbial Technology Synthesis of Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidase from *Aspergillus Oryzae* Using Partially Dissolved and Supersaturated Solution of Lactose. *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *50* (3), 188–194.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003>.
- (40) Urrutia, P.; Fernandez-arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Wilson, L.; Plou, F. J. Detailed Analysis of Galactooligosaccharides Synthesis with B-Galactosidasa de *Aspergillus Oryzae*. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1081–1087.
<https://doi.org/10.1021/jf304354u>.
- (41) Sheldon, R. A.; Van Pelt, S. Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (42), 6223–6235.
<https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.

- (42) Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *Biotechniques***2004**, *37* (5), 790–802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>.
- (43) Križnik, L.; Vasić, K.; Knez, Ž.; Leitgeb, M. Hyper-Activation of β -Galactosidase from *Aspergillus Oryzae* via Immobilization onto Amino-Silane and Chitosan Magnetic Maghemite Nanoparticles. *J. Clean. Prod.***2018**, *179*, 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.117>.
- (44) Halder, S. K.; Maity, C.; Jana, A.; Ghosh, K.; Das, A.; Paul, T.; Mohapatra, P. K. Das; Pati, B. R.; Mondal, K. C. Chitinases Biosynthesis by Immobilized *Aeromonas Hydrophila* SBK1 by Prawn Shells Valorization and Application of Enzyme Cocktail for Fungal Protoplast Preparation. *J. Biosci. Bioeng.***2014**, *117* (2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.011>.
- (45) Sahin, S.; Ozmen, I. Determination of Optimum Conditions for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Immobilization on Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles and Its Characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.***2016**, *133*, S25–S33. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.11.004>.
- (46) Tillet, G.; Boutevin, B.; Ameduri, B. Chemical Reactions of Polymer Crosslinking and Post-Crosslinking at Room and Medium Temperature. *Prog. Polym. Sci.***2011**, *36* (2), 191–217. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.08.003>.
- (47) Wang, W.; Jiang, Y.; Zhou, L.; Gao, J. Comparison of the Properties of Lipase Immobilized onto Mesoporous Resins by Different Methods. *Appl. Biochem. Biotechnol.***2011**, *164* (5), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9157-z>.
- (48) Tanriseven, A.; Aslan, Y. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to Produce

- Fructooligosaccharides. **2005**, *36* (December 2004), 550–554.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.001>.
- (49) Duarte, L. S.; Schöffner, J. da N.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.;
Rodrigues, E.; Hertz, P. F. A New Bioprocess for the Production of Prebiotic
Lactosucrose by an Immobilized β -Galactosidase. *Process Biochem.***2017**, *55*,
96–103. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>.
- (50) Felfel, R. M.; Gideon-Adeniyi, M. J.; Zakir Hossain, K. M.; Roberts, G. A. F.;
Grant, D. M. Structural, Mechanical and Swelling Characteristics of 3D
Scaffolds from Chitosan-Agarose Blends. *Carbohydr. Polym.***2019**, *204* (May
2018), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.002>.
- (51) Nunes, C.; Maricato, É.; Cunha, Â.; Nunes, A.; Silva, J. A. L. Da; Coimbra, M.
A. Chitosan-Caffeic Acid-Genipin Films Presenting Enhanced Antioxidant
Activity and Stability in Acidic Media. *Carbohydr. Polym.***2013**, *91* (1), 236–243.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.033>.
- (52) Singh, P.; Medronho, B.; Alves, L.; da Silva, G. J.; Miguel, M. G.; Lindman, B.
Development of Carboxymethyl Cellulose-Chitosan Hybrid Micro- and
Macroparticles for Encapsulation of Probiotic Bacteria. *Carbohydr. Polym.***2017**,
175, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.119>.
- (53) Rivero, S.; García, M. A.; Pinotti, A. Physical and Chemical Treatments on
Chitosan Matrix to Modify Film Properties and Kinetics of Biodegradation. *J.*
*Mater. Phys. Chem.***2013**, *1* (3), 51–57. <https://doi.org/10.12691/jmpc-1-3-5>.
- (54) Beppu, M. M.; Vieira, R. S.; Aimoli, C. G.; Santana, C. C. Crosslinking of
Chitosan Membranes Using Glutaraldehyde: Effect on Ion Permeability and
Water Absorption. *J. Memb. Sci.***2007**, *301* (1–2), 126–130.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.06.015>.

- (55) Estevinho, B. N.; Damas, A. M.; Martins, P.; Rocha, F. Microencapsulation of β -Galactosidase with Different Biopolymers by a Spray-Drying Process. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>.
- (56) Zhang, Y.; Rochefort, D. Activity, Conformation and Thermal Stability of Laccase and Glucose Oxidase in Poly(Ethyleneimine) Microcapsules for Immobilization in Paper. *Process Biochem.* **2011**, *46* (4), 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.006>.
- (57) Wahba, M. I. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Processed Gellan Gum Beads as Covalent Immobilization Carriers. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *14* (March), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.019>.
- (58) Gennari, A.; Mobayed, F. H.; Volpato, G.; de Souza, C. F. V. Chelation by Collagen in the Immobilization of *Aspergillus Oryzae* β -Galactosidase: A Potential Biocatalyst to Hydrolyze Lactose by Batch Processes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.088>.
- (59) Wahba, M. I. Treated Calcium Pectinate Beads for the Covalent Immobilization of β -D-Galactosidase. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.044>.
- (60) Rogalski, J.; Dawidowicz, A.; Leonowicz, A. Lactose Hydrolysis in Milk by Immobilized β -Galactosidase. **1994**, *93* (94), 233–245.
- (61) Memon, A. H.; Ding, R.; Yuan, Q.; Liang, H.; Wei, Y. Coordination of GMP Ligand with Cu to Enhance the Multiple Enzymes Stability and Substrate Specificity by Co-Immobilization Process. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *136*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.009>.
- (62) Klein, M. P.; Fallavena, L. P.; Schöffner, J. D. N.; Ayub, M. a Z.; Rodrigues, R.

- C.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. High Stability of Immobilized β -d-Galactosidase for Lactose Hydrolysis and Galactooligosaccharides Synthesis. *Carbohydr. Polym.***2013**, *95*, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>.
- (63) Diyanat, S.; Homaei, A.; Mosaddegh, E. Immobilization of *Penaeus Vannamei* Protease on ZnO Nanoparticles for Long-Term Use. *Int. J. Biol. Macromol.***2018**, *118*, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.075>.
- (64) Monajati, M.; Borandeh, S.; Hesami, A.; Mansouri, D. Immobilization of L - Asparaginase on Aspartic Acid Functionalized Graphene Oxide Nanosheet : Enzyme Kinetics and Stability Studies. *Chem. Eng. J.***2018**, *354* (August), 1153–1163. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.058>.
- (65) Bhandari, S.; Gupta, V. K.; Singh, H. Enhanced Stabilization of Mungbean Thiol Protease Immobilized on Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. *Biocatal. Biotransformation***2009**, *27* (1), 71–77. <https://doi.org/10.1080/10242420802607918>.
- (66) Poorakbar, E.; Shafiee, A.; Saboury, A. A.; Rad, B. L.; Khoshnevisan, K.; Ma'mani, L.; Derakhshankhah, H.; Ganjali, M. R.; Hosseini, M. Synthesis of Magnetic Gold Mesoporous Silica Nanoparticles Core Shell for Cellulase Enzyme Immobilization: Improvement of Enzymatic Activity and Thermal Stability. *Process Biochem.***2018**, *71*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.012>.
- (67) Rodrigues, R. C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Fernández-Lafuente, R. Modifying Enzyme Activity and Selectivity by Immobilization. *Chem. Soc. Rev.***2013**, *42* (15), 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>.
- (68) Kishore, D.; Kayastha, A. M. Optimisation of Immobilisation Conditions for Chick Pea β -Galactosidase (CpGAL) to Alkylamine Glass Using Response

Surface Methodology and Its Applications in Lactose Hydrolysis. *Food Chem.***2012**, *134* (3), 1650–1657.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.055>.

- (69) Wahba, M. I.; Soliman, T. N. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Whey Protein Isolate for the Preparation of Covalent Immobilization Beads. *Biocatal. Agric. Biotechnol.***2018**, *14* (March), 328–337.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.04.003>.

Supplementary Data

Table 3 Influence of enzyme and genipin concentration on the activity recovery (AR%) and specific activity (SA).

Genipin concentration (mg mL ⁻¹)	Enzyme concentration (U mL ⁻¹)					
	5		10		20	
	IY (%)	IE (%)	IY (%)	IE (%)	IY (%)	IE (%)
1.5	57.9±1.0 ^b	49.5±0.8 ^b	79.2±1.0 ^a	35.7±0.4 ^b	55.1±0.3 ^c	34.5±0.1 ^a
2.5	67.6±0.5 ^a	53.3±0.4 ^a	77.2±0.6 ^b	41.3±0.4 ^a	66.7±1.8 ^a	33.8±0.9 ^a
5.0	55.8±0.3 ^c	54.1±0.3 ^a	70.0±0.6 ^c	35.4±0.3 ^b	62.3±0.8 ^b	32.2±0.4 ^b

Any two means in the same column followed by the same letter are not significantly ($p \geq 0.05$) different according to Tukey test.

Table 4 Effect of the time and temperature on the activation support. Enzyme immobilization was carried out using an enzyme concentration of 10 U mL⁻¹ in acetate buffer pH 4.5. The support was activated at pH 9.0 using 1.5 mg mL⁻¹ of genipin solution.

Temperature (°C)	Time (h)	Immobilization Yield (%)	Immobilization Efficiency (%)
	6	58.5±0.2 ^e	42.5±3.0 ^{abc}
25	12	56.1±4.7 ^e	45.8±4.2 ^a
	24	59.7±0.5 ^e	44.7±0.6 ^a
37	2	80.7±2.1 ^{abcd}	30.5±1.1 ^f

	3	79.2±1.7 ^{abcd}	35.7±0.7 ^{cdef}
	6	87.7±1.3 ^a	33.2±2.4 ^{ef}
	0.5	76.6±2.3 ^{bcd}	39.4±1.0 ^{abcde}
50	1	74.6±4.4 ^d	35.9±1.3 ^{cdef}
	2	76.5±7.5 ^{bcd}	35.3±2.8 ^{ef}
	3	80.5±5.7 ^{abcd}	34.4±0.8 ^{ef}
	0.5	75.0±2.8 ^{cd}	42.4±1.4 ^{abcd}
60	1	86.1±1.9 ^{ab}	43.5±3.6 ^{ab}
	2	86.6±1.7 ^a	35.6±4.2 ^{def}
	0.5	82.5±1.6 ^{abcd}	37.8±0.8 ^{bcde}
70	1	84.7±1.0 ^{abc}	37.3±0.2 ^{bcdef}

Any two means in the same column followed by the same letter are not significantly ($P \geq 0.05$) different according to Tukey test.

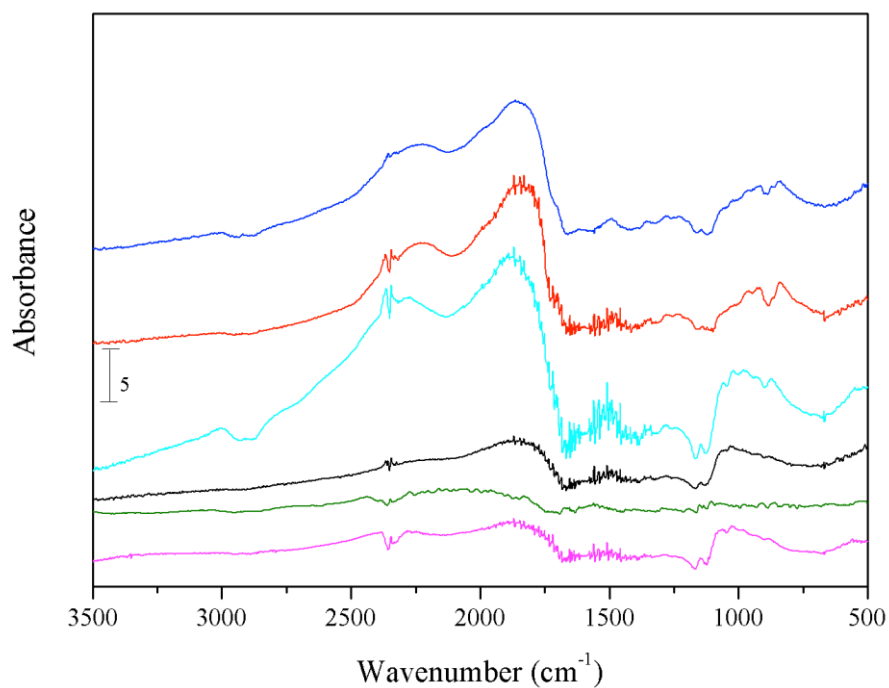


Fig. 10 Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform. Performed at room temperature with 32 accumulative scans. Chitosan (pink), chitosan-genipin activated in pH 9 (light blue), chitosan-genipin, activated in pH 6 (black), chitosan-genipin-enzyme, –support activated in pH 9- (royal blue), chitosan-genipin-enzyme, –support activated in pH 6- (red) and genipin (green).

4. DESDOBRAMENTOS

4.1. OUTROS TRABALHOS REALIZADOS

Com o intuito de melhorar ainda mais os parâmetros de imobilização e aproveitar a versatilidade da quitosana, fabricaram-se esferas porosas de quitosana para aumentar a área superficial, o tamanho dos poros e avaliar diversos fatores para determinar a viabilidade do novo suporte.

4.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1.1. Esferas porosas de quitosana

As esferas de quitosana foram fabricadas segundo o método de WAHBA, (2017) e KLEIN et al., (2012) com adaptações, usou-se Na_2CO_3 em diversas concentrações na solução de coagulação das esferas (NaOH 1 N), onde se gotejou uma solução de quitosana 3 % dissolvida em ácido acético 2 %.

4.1.1.2. Ativação do suporte

4.1.1.2.1. Tempo e temperatura

Foram colocadas 3.0 mg de suporte por mL de solução de genipina pH 9 (usou-se tampão fosfato 0.1 M pH 6 e ajustou-se o pH com NaOH 0.1 M), e foi avaliado usando dois binômios de tempo e temperatura, 50 °C por 1 h e 60 °C por 1 h.

4.1.1.2.2. Concentração de genipina

Foram testadas diversas concentrações de genipina entre 0.10 e 0.25 % (p/v) em solução pH 9 (ver secção 4.1.1.2.1) usando uma concentração de suporte de 3.0 mg por mL em base seca.

4.1.1.3. Estabilidade térmica

Foi avaliada a estabilidade térmica a 50 e 60 °C comparando a enzima livre e a imobilizada, incubando as amostras em tubos fechados contendo tampão acetato (0,1 M, pH 4,5) em Banho-Maria a temperatura controlada.

4.1.1.4. Análises calorimétricas

Foram feitas as análises de DSC e TGA. A análise termogravimétrica foi feita no Perkin Elmer Pyris 1 TGA, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ desde 20 e até

700 °C em atmosfera de ar. A calorimetria diferencial foi realizada no Perkin Elmer DSC 8500 com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ desde 20 e até 400 °C, em atmosfera de nitrogênio.

4.1.2. RESULTADOS E DISCUSÕES

4.1.2.1. Impacto da concentração de Na₂CO₃.

O uso de Na₂CO₃ na coagulação de biopolímeros como a quitosana permite a formação de mais e maiores poros na matriz polimérica o que se faz com o intuito de aumentar a área superficial e em um primeiro momento adsorver a enzima e depois disponibilizar mais agrupamentos amino não só da superfície, mas também da parte interna dos poros da quitosana para que possam formar uma ligação covalente com a enzima (WAHBA, 2018).

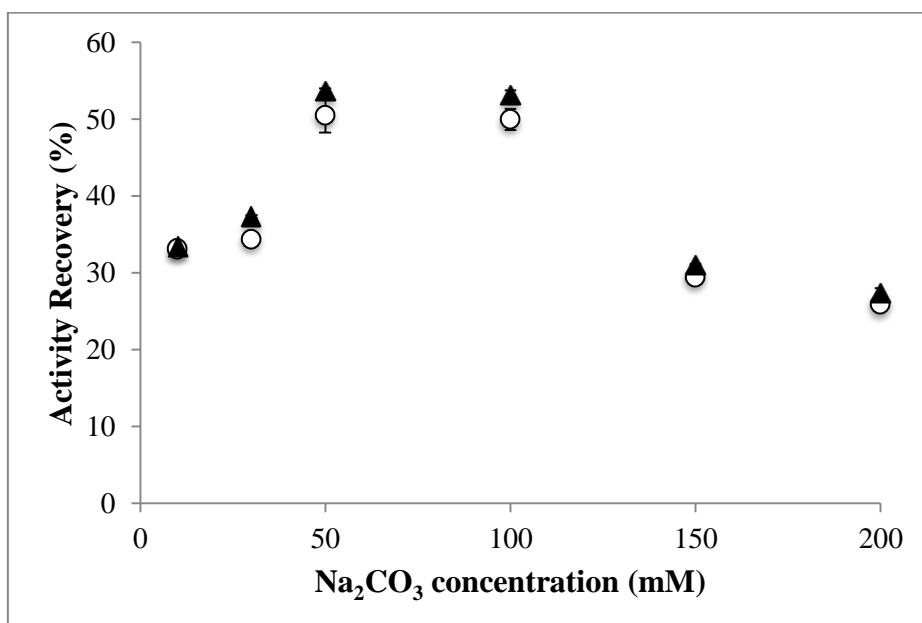


Fig. 5 Impacto da concentração de Na₂CO₃. Suporte ativado com 0.15 % (w/v) de genipina a 50 °C por 1 h (○) e a 60 °C por 1 h (■) em pH 9.0.

Como pode ser observado na Fig. 9, a atividade relativa mostrou um aumento a medida que também aumentou a concentração de carbonato na solução de coagulação da quitosana até um máximo de 50 mM (AR de 53.6 e 50.0 % para as condições de ativação das esferas a 60 e 50 °C por 1 h, respectivamente), aí manteve-se a atividade recuperada sem diferença até 100 mM e depois começou a decrescer a medida que continuou aumentando a concentração de Na₂CO₃. A medida que aumenta a concentração de carbonato, o número e tamanho dos poros cresce, é observado um pequeno aumento no rendimento da

imobilização, porém a eficiência cai (IY de 89.8 e 85.1 % e IE de 59.3 e 32.3 % para 50 mM e 200 mM, ativadas a 60 °C por 1 h, respectivamente). Esta diminuição da eficiência pode ser possivelmente relacionada a problemas de difusão e também a possibilidade de um aumento nas ligações, uma vez que existe um maior número de grupamentos disponíveis, gerando, por consequência, dificuldades de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Por isso foi escolhida a concentração de Na₂CO₃ para a coagulação das esferas 50 mM e o binômio de tempo e temperatura 1 h a 60 °C.

4.1.2.2. Concentração de genipina no suporte

A concentração do agente ativador incide diretamente nos parâmetros de imobilização, isso porque aumenta os grupamentos para ligação com a enzima e porque influencia na polimerização interna (MIGNEAULT et al., 2004b). Na Tabela 5, pode se observar que a medida que aumentou a concentração de genipina, aumentou também o rendimento da imobilização, porém a eficiência foi decrescendo (para 0.10 % de genipina, RI de 88.4 % e EI de 55.2 %, para 0.25 % de genipina, RI de 97.3 % e EI 51.1 %). A medida que aumenta a concentração de genipina, aumentam os pontos para ligação, o que pode ocasionar uma saturação de enzima no suporte e um aumento nas interações entre as enzimas, distorção delas e dificuldade de acesso aos sítios ativos, ocasionando problemas de difusão e de inativação do catalisador, diminuindo assim a eficiência (DUARTE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2013; TANRISEVEN; ASLAN, 2005).

Entretanto, a atividade recuperada, que relaciona os dois parâmetros anteriores, não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, da mesma maneira como a atividade específica; porém na menor concentração de genipina as esferas ficam frágeis e quando colocadas na solução enzimática (solução em tampão acetato pH 4.5), por ocasião da imobilização, essas esferas se desestruturam, provavelmente devido a uma concentração de genipina insuficiente para formar uma rede capaz de proteger a esfera do meio ácido da solução enzimática (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015), fenômeno que não acontece nas soluções mais concentradas. Assim, os testes posteriores foram realizados com solução de genipina 0.15 % para a ativação do suporte.

Concentração de genipina (% p/v)	Rendimento da Imobilização (%)	Eficiência da Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)	Atividade Específica (U g ⁻¹)
0.10	88.4	55.2	48.1±0.9 ^a	929.8±16.8 ^a

0.15	90.8	55.0	49.7±0.7 ^a	960.9±12.9 ^a
0.20	93.3	53.8	48.8±0.5 ^a	943.5±8.8 ^a
0.25	97.3	51.1	49.1±0.7 ^a	948.2±13.7 ^a

Tabela 5 Teste de concentração de genipina usando esferas com 50 mM de Na₂CO₃ e ativação a 60 °C por 1 h.

4.1.2.3. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica de uma enzima imobilizada é importante sobretudo porque gera maior robustez nela e faz com que seja mais viável para uso em sistemas industriais. Na Fig. 11 são apresentados os resultados da atividade relativa observada quando a enzima livre e a enzima imobilizada foram submetidas a uma temperatura de 50 °C, onde pode observar-se que para ambas, nas primeiras 8 horas, há uma queda rápida e depois uma queda mais ajustada à exponencial resultando em um tempo de meia-vida de 19,8 h para a enzima livre e 35,5 h para a enzima imobilizada, e, por consequência, um fator de estabilização (SF) de 1,8, ou seja, a enzima imobilizada é quase duas vezes mais estável que a imobilizada o que fala da robustez adquirida mediante o processo de imobilização e entrecruzamento com a esfera porosa de quitosana e a genipina.

Por outro lado, quando testado a 60 °C, atingiu tempos de meia-vida de 13,5 min e 18,6 min para a enzima livre e imobilizada, respectivamente, resultando um SF de 1,4. O aumento na estabilidade térmica pode ser explicado pelo micro ambiente criado no suporte, a genipina entrecruzada com a quitosana e os poros geram uma possível proteção à enzima, que permite que ela mantenha sua atividade e sua conformação (BHANDARI; GUPTA; SINGH, 2009; LIU; CHEN; SHI, 2018; MONAJATI et al., 2018; POORAKBAR et al., 2018).

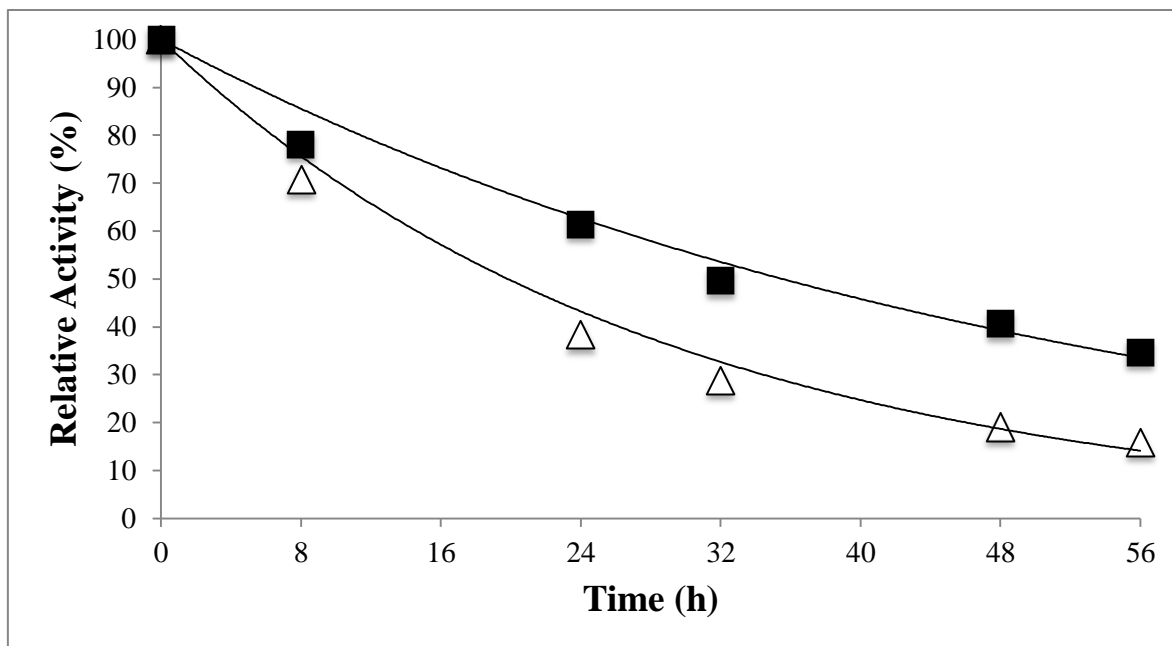


Fig. 11 Estabilidade térmica da enzima imobilizada. Realizada a 50 °C. Enzima livre (triângulo), enzima imobilizada (quadrado).

4.1.2.4. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica permite conhecer a estabilidade do material frente à temperatura, nesta análise, foram analisadas quatro amostras, esfera porosa de quitosana, genipina, esfera de quitosana-genipina e esfera de quitosana-genipina-enzima. Na Fig. 12 pode observar-se que a esfera de quitosana é a que possui a maior estabilidade, mostrando só uma queda ao redor de 270 °C, que pode ser devido a uma fragilização originada pelo aumento na porosidade do material, esta queda está relacionada à decomposição dos agrupamentos hidroxila da quitosana e desacetilação do polímero, sugerindo a sua decomposição (JAVOID et al., 2018; MA et al., 2018b; JBELI et al., 2018).

Por outro lado a genipina é a amostra que apresenta menor estabilidade apresentando a queda ao redor de 190 °C, com isso a adição da genipina praticamente não diminui a estabilidade da quitosana, apresentando também uma queda ao redor de 270 °C, unicamente a adição da enzima faz com que o material perca estabilidade, tendo uma queda aos 245 °C; pode-se dizer que fora da queda inicial das três amostras, exceto a da genipina, deve-se à presença de água na amostra que não foi retirada no processo de liofilização, especialmente na amostra com a enzima, pois existe uma maior quantidade de agrupamentos que formam interações hidrofílicas.

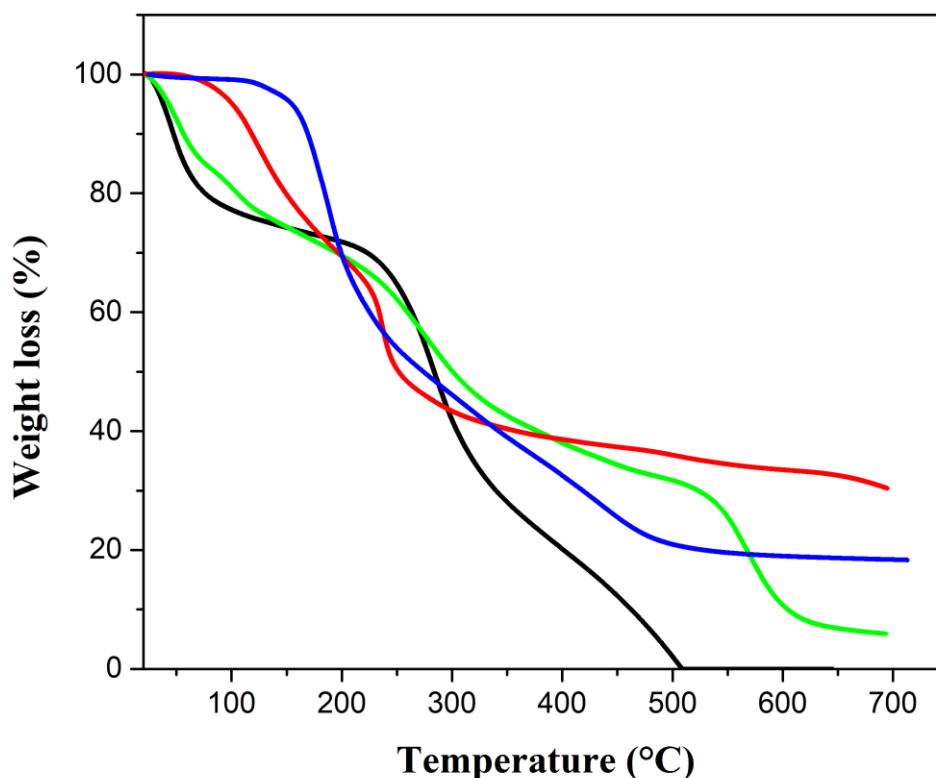


Fig. 12 Análise termogravimétrica. Realizada de temperatura ambiente até 700 °C sob atmosfera de ar. Esferaporosa de quitosana (preto), genipina (azul), quitosana-genipina (verde) e quitosana-genipina-enzima (vermelho).

O processo de ativação do suporte demonstrou pouca influência na estabilidade da quitosana, inclusive após a imobilização enzimática. Na literatura tem sido reportado que a quitosana tornou-se mais frágil quando foi entrecruzada com agentes como ácido tânico (RIVERO et al., 2013), sorbitol (MA et al., 2018b), 1,2:7,8-diepoxyoctano (DEO) (VAKILI et al., 2018), radical 2,2,6,6-tetra-metilpiperidina-1-oxil (TEMPO) (SONI et al., 2018) e glutaraldeído (BEPPU et al., 2007). Por tanto, a análise termogravimétrica revela que o derivado é termicamente estável até pelo menos 245 °C, e considerando a aplicação em alimentos, é completamente viável, já que só em processos muito específicos atinge-se temperaturas tão altas.

4.1.2.5. Calorimetria diferencial (DSC)

Com a finalidade de detectar possíveis interações entre a quitosana e a genipina e estes dois com a enzima, foi feita a análise de calorimetria diferencial, onde foram analisadas as quatro amostras, esfera porosa de quitosana, esfera de quitosana-genipina, esfera quitosana-genipina-enzima e genipina. Como pode ser observado na Fig. 13, o termograma da amostra apresenta alguns picos exotérmicos em até 100 °C para as amostras de genipina e quitosana-genipina, provavelmente associados a água presente na amostra, entretanto a amostra de quitosana-genipina-enzima apresentou um pico exotérmico ao redor de 230 °C associado ao ponto de fusão da proteína provavelmente devido a uma não tão forte interação entre a enzima com a genipina e a quitosana, fenômeno que já foi reportado para quitosana entrecruzada com L-carnitina (SOLEÉ et al., 2017).

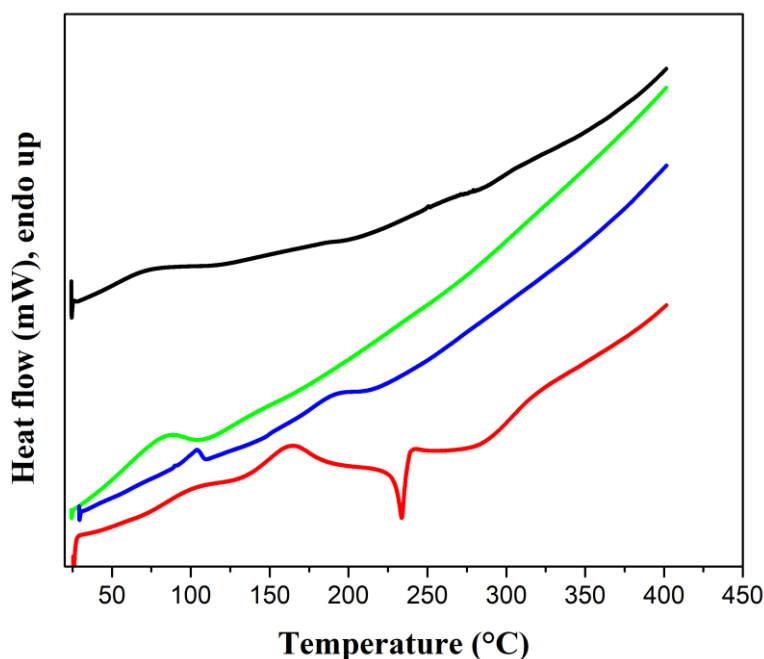


Fig. 13 Calorimetria diferencial. Realizado a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde temperatura ambiente até $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob atmosfera de nitrogênio. Esferas porosas de quitosana (preto), genipina (azul), quitosana-genipina (verde) e quitosana-genipina-enzima (vermelho).

Entre tanto, pode ser observado um pequeno momento endotérmico na genipina por volta dos $195\text{ }^{\circ}\text{C}$ que desaparece na quitosana-genipina, que pode estar relacionado a uma forte interação entre as duas substâncias derivado do processo de ativação do suporte, algo similar foi encontrado na literatura para nanopartículas de quitosana/alginato ativadas com genipina (SAMPRASIT et al., 2018), também para a encapsulação de quercetina

em hidrogel de carboximetil-quitosana ativado com genipina (YU et al., 2018) assim como para hidrogéis de quitosana-gelatina usando genipina como agente de entrecruzamento entre os polímeros (UBAID; MURTAZA, 2018) e para filmes de quitosana entrecruzados com genipina e poli vinil álcool (ALDANA et al., 2012).

5. CONCLUSÕES

De maneira geral, pode-se concluir que o presente trabalho atingiu os objetivos traçados no início; o que gerou as seguintes conclusões:

- As melhores condições para ativar o suporte de quitosana usando genipina como ativador foram: pH 9, tempo de 1 h, temperatura de 60 °C, concentração de genipina de 0.15 % (p/v), usando 4 mg de suporte por mL de solução.
- Para o processo de imobilização da β -Gal no suporte obtido, as melhores condições foram: solução enzimática de 10 U mL⁻¹ e tempo de imobilização de 8 h.
- Obteve-se parâmetros de imobilização como segue: rendimento 87.1 %, eficiência 43 %, atividade recuperada 35.7 %, atividade específica 769.2 U g de suporte.
- O derivado apresentou um fator de estabilização térmica de 2.0 a 50 °C e 1.4 a 60 °C quando comparado com a enzima livre e a enzima imobilizada em suporte ativado em pH 6.
- A estabilidade operacional demonstrou que o derivado manteve o 100 % de atividade relativa ao longo de 40 bateladas em processo descontínuo.
- As análises calorimétricas demonstraram que o o derivado apresentou uma boa estabilidade térmica até 200 °C e uma forte interação entre a genipina e a quitosana, determinadas por TGA e DSC, respectivamente.

Assim foi demonstrado que a genipina como ativador de suporte possui características e propriedades únicas que devem ser avaliadas para cada enzima no intuito de melhorar os parâmetros de imobilização; além de ser uma excelente alternativa ao uso de glutaraldeído por ser completamente segura para aplicação em alimentos; e com tudo isso foi obtido um derivado com alta estabilidade térmica e operacional.

Destaca-se também que este é um modelo que permitiu conhecer os fatores que incidem nos processos de interações físicas e químicas de polimerização interna da genipina e da quitosana com a quitosana e que poderia ser testado e avaliado com outras enzimas e suportes.

6. PERSPECTIVAS

A partir do realizado, pode se prever o seguinte como propostas de trabalhos e pesquisas futuras:

- Avaliar enzimas de maior e menor tamanho comparadas à β -galactosidase e com substratos de tamanhos distintos para conhecer ainda melhor a relação entre esses fatores com a polimerização interna da genipina e da genipina com a quitosana.
- Usar outros materiais de suporte que possuam uma estrutura física e composição química distinta para estudar o comportamento da genipina frente a eles e os processos de polimerização interna.
- Desenvolver um reator de leito fixo para avaliar a estabilidade operacional do derivado em processo contínuo de catálise.

7. REFERÊNCIAS

- ALAMSYAH, G. et al. ScienceDirect ScienceDirect Effect of amino group in adsorption The chitosan ' s immobilization of lipase enzyme on resin to catalyze biodiesel Assessing the feasibility of using the heat demand-outdoor synthesis temperature function for a long-term distr. **Energy Procedia**, [s. l.], v. 136, p. 47–52, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.278>>
- ALDANA, A. A. et al. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2- pyrrolidone) films for controlled release drugs. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 134, n. 1, p. 317–324, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.02.071>>
- ATES, E.; ORHON, D.; TÜNAY, O. **Characterization of tannery wastewaters for pretreatment selected case studies**, 1997.
- AYHAN, H.; AYHAN, F.; GULSU, A. Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine. **Turkish Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 14–20, 2012. Disponível em: <http://www.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdire=tjb&plng=eng&un=TJB-00719>
- BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.019>>
- BELLÉ, A. S. et al. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 246, n. November 2017, p. 266–274, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>>
- BENUCCI, I. et al. Chitosan/clay nanocomposite films as supports for enzyme immobilization: An innovative green approach for winemaking applications. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 74, p. 124–131, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.005>>
- BEPPU, M. M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 301, n. 1–2, p. 126–130, 2007.
- BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering : An alternative path for the development of novel and improved

- industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 1470–1480, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.06.002>>
- BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 877–882, 2006.
- BHANDARI, S.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 71–77, 2009.
- BRAUCH, J. E. et al. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, [s. l.], v. 89, p. 365–372, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.029>>
- CABRERA, M. P. et al. Polyaniline-coated magnetic diatomite nanoparticles as a matrix for immobilizing enzymes. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 457, n. May, p. 21–29, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.06.238>>
- CAO, L. Immobilised enzymes : science or art ? [s. l.], p. 217–226, 2005.
- CAO, S. et al. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 1814–1823, 2016.
- CARVALHO, M. et al. International Journal of Biological Macromolecules Improving peptide quantification in chitosan nanoparticles. [s. l.], v. 119, p. 32–36, 2018.
- CAVELLO, I. A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CAVALITTO, S. F. Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1332–1336, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.016>>
- CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIahi, H. A. Conjugation of tea catechins with chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 84, n. June, p. 561–570, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X18302650>>
- CHEN, G. et al. Application of cellulase treatment in ionic liquid based enzyme-assisted extraction in combine with in-situ hydrolysis process for obtaining genipin from *Eucommia ulmoides* Olive barks. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1569, p. 26–35, 2018. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.063>>
- CHEN, M. et al. Hydrogen bonding impact on chitosan plasticization. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 200, n. June, p. 115–121, 2018. b. Disponível em:

- <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.062>>
- CHEN, M. C. et al. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. **Biomaterials**, [s. l.], v. 30, n. 29, p. 5560–5571, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.039>>
- CHEN, S. C. et al. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 285–300, 2004.
- CHRONOPOULOU, L. et al. A physico-chemical approach to the study of genipin crosslinking of biofabricated peptide hydrogels. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 70, n. March, p. 110–116, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.005>>
- COSCOLÍN, C. et al. Controlled manipulation of enzyme specificity through immobilization-induced flexibility constraints. **Applied Catalysis A: General**, [s. l.], v. 565, n. August, p. 59–67, 2018.
- CUI, C. et al. Genipin Cross-Linked Glucose Oxidase and Catalase Multi-enzyme for Gluconic Acid Synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], 2017.
- CUI, L. et al. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 99, p. 31–38, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.048>>
- CUI, W. et al. Biomacromolecules based core/shell architecture toward biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 237, p. 43–51, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.10.001>>
- DELMAR, K.; BIANCO-PELED, H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 127, p. 28–37, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039>>
- DEMIR, T.; ÖNAL, S. Bioaffinity immobilization and characterization of α -galactosidase on aminophenylboronic acid derivatized chitosan and Sepabeads EC-EA. **Lwt**, [s. l.], v. 90, n. December 2017, p. 547–555, 2018.
- DIYANAT, S.; HOMAIEI, A.; MOSADDEGH, E. Immobilization of *Penaeus vannamei* protease on ZnO nanoparticles for long-term use. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 92–98, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.075>>

- DUAN, X. et al. Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* β -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 53, p. 17–24, 2017.
- DUARTE, L. S. et al. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 55, p. 96–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>>
- ESKANDARLOO, H.; ABBASPOURRAD, A. Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β - galactosidase immobilized on functionalized glass beads. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 251, n. January, p. 115–124, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.068>>
- ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, [s. l.], v. 64, p. 134–140, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>>
- FELFEL, R. M. et al. Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 204, n. May 2018, p. 59–67, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861718311780>>
- FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 143, p. 155–163, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.016>>
- GÄNZLE, M. G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 116–122, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.010>>
- GASCÓN, V. et al. Semi-crystalline Fe-BTC MOF material as an efficient support for enzyme immobilization. **Catalysis Today**, [s. l.], v. 304, n. October 2017, p. 119–126, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.022>>
- GENNARI, A. et al. Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 109, p. 303–310, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.088>>
- GONÇALVES, I. et al. CotA laccase-ABTS/hydrogen peroxide system: An efficient

- approach to produce active and decolorized chitosan-genipin films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 175, p. 628–635, 2017.
- GOSLING, A. et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 307–318, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.063>>
- GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–14, 2003.
- GUERRERO, C. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. [s. l.], 2017.
- GUERRERO, C. et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Effect of the type of immobilization of β -galactosidase on the yield and selectivity of synthesis of transgalactosylated oligosaccharides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. August, p. 353–363, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.021>>
- GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Fed-batch operation for the synthesis of lactulose with B-galactosidase of *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 237, p. 126–134, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.042>>
- HAGHJU, S.; BARI, M. R.; KHALED-ABAD, M. A. Affecting parameters on fabrication of β -D-galactosidase immobilized chitosan/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 200, n. August, p. 137–143, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.096>>
- HALDER, S. K. et al. Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 170–177, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.011>>
- HAMMER, S. C.; KNIGHT, A. M.; ARNOLD, F. H. Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 7, p. 23–30, 2017.
- HENRIQUES, R. O. et al. Co-immobilization of lipases and B-D-galactosidase onto magnetic nanoparticle supports: Biochemical characterization. **Molecular**

- Catalysis**, [s. l.], v. 453, n. November 2017, p. 12–21, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.04.022>>
- HOBBS, C. A. et al. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant , gardenia blue , and its precursor , genipin. [s. l.], v. 118, n. May, p. 695–708, 2018.
- HU, Y. et al. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme / MOFs). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 91, n. November 2017, p. 793–801, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.103>>
- KADRI, T. et al. Nanoencapsulation and release study of enzymes from *Alkanivorax borkumensis* in chitosan-tripolyphosphate formulation. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 137, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.013>>
- KAMRAN, A. et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Lactose hydrolysis approach : Isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 5, p. 99–103, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.010>>
- KAUSHAL, J.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Immobilization of catalase onto chitosan and chitosan – bentonite complex : A comparative study. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 18, p. e00258, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00258>>
- KISHORE, D.; KAYASTHA, A. M. Optimisation of immobilisation conditions for chick pea β -galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 1650–1657, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.055>>
- KLEIN, M. P. et al. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 95, p. 465–470, 2013.
- KLEIN, M. P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 137, p. 184–190, 2016.
- KO, J. et al. International Immunopharmacology Genipin inhibits allergic responses in ovalbumin-induced asthmatic mice. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 53, n. October, p. 49–55, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.010>>

- KRIŽNIK, L. et al. Hyper-activation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 179, p. 225–234, 2018.
- KURNIASIH, M. et al. Carboxymethyl chitosan as an antifungal agent on gauze. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 166–171, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.038>>
- LEE, S. et al. Genipin inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by the suppression of HIF-1 α accumulation and VEGF expression. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 116, n. October 2017, p. 70–76, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.005>>
- LI, J. et al. Immobilization of aminoacylase on electrospun nanofibrous membrane for the resolution of DL-theanine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 116, p. 24–28, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.03.003>>
- LI, Y. et al. Preparation and characterization of novel nonstoichiometric magnesium aluminate spinels. **Ceramics International**, [s. l.], v. 44, n. 13, p. 15104–15109, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.05.145>>
- LIN, Y. H. et al. Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 18, p. 4466–4479, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.028>>
- LIU, D.; CHEN, J.; SHI, Y. International Journal of Biological Macromolecules – Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 105, p. 308–316, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.045>>
- LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 102, p. 332–342, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>>
- LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005.
- MA, H. F. et al. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization. **Chemical**

- Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 132, n. 35, p. 664–676, 2018. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.02.008>>
- MA, W. et al. Genipin-crosslinked gelatin films as controlled releasing carriers of lysozyme. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 321–324, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.039>>
- MA, X. et al. Effect of sorbitol content on microstructure and thermal properties of chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 1294–1297, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.060>>
- MARDANI, T. et al. International Journal of Biological Macromolecules Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 120, p. 354–360, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.065>>
- MATEO, C. et al. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 273–276, 2004.
- MEI, S.; HAN, P.; WU, H. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 266, n. November 2017, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.015>>
- MEKHAIL, M.; JAHAN, K.; TABRIZIAN, M. Genipin-crosslinked chitosan/poly-L-lysine gels promote fibroblast adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 91–98, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.021>>
- MELLER, K.; SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 244, p. 84–106, 2017.
- MEMON, A. H. et al. Coordination of GMP ligand with Cu to enhance the multiple enzymes stability and substrate specificity by co-immobilization process. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 136, p. 102–108, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.009>>
- MI, F.-L. et al. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. **Polymer**, [s. l.], v. 44, n. 21, p. 6521–6530, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386103006207>>

- MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 1985–2000, 2005.
- MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde : Behavior in aqueous solution , reaction with proteins , and application to enzyme crosslinking Glutaraldehyde : behavior in aqueous solution , reaction with proteins , and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, [s. l.], v. 37, n. December, p. 790–+, 2004. a.
- MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004. b.
- MONAJATI, M. et al. Immobilization of L -asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 354, n. August, p. 1153–1163, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.058>>
- MONTA, J. C. et al. LWT - Food Science and Technology Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing. [s. l.], v. 63, p. 1347–1350, 2015.
- MORAN, H. B. T. et al. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. **Biomaterials**, [s. l.], v. 184, n. May, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961218306148>>
- MUHAMAD, I. I. et al. Genipin-cross-linked kappa-carrageenan/carboxymethyl cellulose beads and effects on beta-carotene release. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 1207–1212, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.021>>
- MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>>
- MUZZARELLI, R. A. A. et al. **Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone**, 2015.
- MUZZARELLI, R. A. A. et al. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 93, p. 1366–1381, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.075>>
- NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. International Journal of Biological Macromolecules

- Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): A novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], n. xxxx, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.126>>
- NERI-NUMA, I. A. et al. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417301802>>
- NUNES, C. et al. Chitosan-caffeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 236–243, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.033>>
- OF, J.; CATALYSIS, M.; SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. [s. l.], n. July, 2015.
- OUERGHEMMI, S. et al. Synthesis and characterization of polyampholytic aryl-sulfonated chitosans and their in vitro anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 196, n. May, p. 8–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.025>>
- PELLÁ, M. C. G. et al. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 196, n. March, p. 233–245, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>>
- POORAKBAR, E. et al. Synthesis of magnetic gold mesoporous silica nanoparticles core shell for cellulase enzyme immobilization: Improvement of enzymatic activity and thermal stability. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 71, p. 92–100, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511317319761>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I. Low-cost , easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 545–548, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.014>>
- REMPEL, A. et al. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 263, n. March, p. 163–171, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.114>>
- RIOS, R. V et al. LWT - Food Science and Technology Use of succinyl chitosan as fat replacer on cake formulations. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 96, n. November 2017, p. 260–265, 2018. Disponível em:

- <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.041>>
- RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Physical and Chemical Treatments on Chitosan Matrix to Modify Film Properties and Kinetics of Biodegradation. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 51–57, 2013. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jmpc/1/3/5/index.html>>
- RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.
- RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.
- RODRÍGUEZ, E. et al. Enzyme and Microbial Technology Immobilization of β - galactosidase and α -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glyco. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 117, n. May, p. 45–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.012>>
- ROGALSKI, J.; DAWIDOWICZ, A.; LEONOWICZA, A. Lactose hydrolysis in milk by immobilized P-galactosidase. [s. l.], v. 93, n. 94, p. 233–245, 1994.
- ROSENTHAL, A. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Enzyme immobilization on protein-resistant PNIPAAm brushes: impact of biotin linker length on enzyme amount and catalytic activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 171, n. July, p. 351–357, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.047>>
- RUI, L. et al. Enhanced solubility and antioxidant activity of chlorogenic acid-chitosan conjugates due to the conjugation of chitosan with chlorogenic acid. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 170, p. 206–216, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.076>>
- SAHIN, S.; OZMEN, I. Determination of optimum conditions for glucose-6-phosphate dehydrogenase immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 133, p. S25–S33, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.11.004>>
- SAMPRASIT, W. et al. Design of alpha mangostin-loaded chitosan/alginate controlled-release nanoparticles using genipin as crosslinker. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 46, n. May, p. 312–321, 2018. Disponível em:

- <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.029>>
- SAYED, S.; MILLARD, T.; JARDINE, A. Expedient synthesis and properties of 6-deoxy-6-amino chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 196, n. May, p. 187–198, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.030>>
- SHANMUGAM, M. K. et al. Potential role of genipin in cancer therapy. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 133, n. October 2017, p. 195–200, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.007>>
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60075K>>
- SHIN, J.; LEE, S. Genipin protects the liver from ischemia / reperfusion injury by modulating mitochondrial quality control. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 328, p. 25–33, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.002>>
- SHINYA, S.; FUKAMIZO, T. Interaction between chitosan and its related enzymes: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.040>>
- SINGH, P. et al. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 175, p. 87–95, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.119>>
- SOL, V.; VR, M. Chemosphere Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross- linked aggregates rkov a Stanislava Vob e. [s. l.], v. 202, p. 694–707, 2018.
- SOLÉ, I. et al. DHA and L-carnitine loaded chitosan hydrogels as delivery systems for topical applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 525, n. April, p. 85–92, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.056>>
- SONI, B. et al. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan/TEMPO biocomposite packaging films. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 17, n. May, p. 73–79, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.001>>
- SUÁREZ, S. et al. E ff ect of particle size and enzyme load on the simultaneous reactions of lactose hydrolysis and transgalactosylation with glyoxyl-agarose immobilized β -

- galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 73, n. August, p. 56–64, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.016>>
- SUN, Y. S. et al. Bone cell responses to a low elastic modulus titanium alloy surface immobilized with the natural cross-linker genipin. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 350, n. 155, p. 918–924, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.03.069>>
- SUNG, H. W. et al. Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **Biomaterials**, [s. l.], v. 20, n. 19, p. 1759–1772, 1999.
- SUNG, H. W. et al. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: Fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 77–87, 2000.
- SUO, H. et al. Enhancement of catalytic performance of porcine pancreatic lipase immobilized on functional ionic liquid modified Fe₃O₄-Chitosan nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 624–632, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018326667>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- TALEKAR, S. et al. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, [s. l.], v. 3, n. 31, p. 12485, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ra40818c>>
- TANRISEVEN, A.; ASLAN, Y. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. [s. l.], v. 36, n. December 2004, p. 550–554, 2005.
- TEIMOURI, S. et al. Food Hydrocolloids Diffusion and relaxation contributions in the release of vitamin B6 from a moving boundary of genipin crosslinked gelatin matrices. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 87, n. August 2018, p. 839–846, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.015>>
- TIAN, J. S. et al. 1H NMR-based metabolomics approach to investigating the renal protective effects of Genipin in diabetic rats. **Chinese Journal of Natural Medicines**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 261–270, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30056-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30056-6)>
- TILLET, G.; BOUTEVIN, B.; AMEDURI, B. Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 191–217, 2011. Disponível em:

- <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.08.003>>
- TODOROVA-BALVAY, D. et al. An efficient two step purification and molecular characterization of beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*. **Journal of molecular recognition : JMR**, [s. l.], v. 19, p. 299–304, 2007.
- UBAID, M.; MURTAZA, G. International Journal of Biological Macromolecules Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan / gelatin hydrogel for pH-sensitive , oral delivery of metformin with an application of response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 114, p. 1174–1185, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.023>>
- URRUTIA, P. et al. Detailed Analysis of Galactooligosaccharides Synthesis with β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 61, p. 1081–1087, 2013.
- URRUTIA, P. et al. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 116, p. 182–193, 2018. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.112>>
- URRUTIA, P. et al. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 108, p. 674–686, 2018. b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017327502>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- VAKILI, M. et al. Novel crosslinked chitosan for enhanced adsorption of hexavalent chromium in acidic solution. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 347, n. March, p. 782–790, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.181>>
- VERA, C. et al. Enzyme and Microbial Technology Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 188–194, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.003>>
- WAHBA, M. I. Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 91,

- p. 877–886, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.044>>
- WAHBA, M. I. International Journal of Biological Macromolecules Porous chitosan beads of superior mechanical properties for the covalent immobilization of enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 105, p. 894–904, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.102>>
- WAHBA, M. I. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Processed gellan gum beads as covalent immobilization carriers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. March, p. 270–278, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.019>>
- WAHBA, M. I.; SOLIMAN, T. N. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Whey protein isolate for the preparation of covalent immobilization beads. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. March, p. 328–337, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.04.003>>
- WANG, W. et al. Comparison of the properties of lipase immobilized onto mesoporous resins by different methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 561–572, 2011.
- WOLF, M.; GASPARIN, B. C.; PAULINO, A. T. International Journal of Biological Macromolecules Hydrolysis of lactose using β - D -galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free / low-lactose milk. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 157–164, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.058>>
- XIONG, Y. et al. Chitosan combined with swimming promotes health in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 2092–2097, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.067>>
- YAO, C. et al. Applied Surface Science Porous chitosan scaffold cross-linked by chemical and natural procedure applied to investigate cell regeneration. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 262, p. 218–221, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.05.128>>
- YIN, H. et al. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 225, p. 230–238, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>>
- YIN, R. et al. Design of genipin-crosslinked microgels from concanavalin A and

- glucosyloxyethyl acrylated chitosan for glucose-responsive insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 369–376, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.067>>
- YU, S. H. et al. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 126, p. 97–107, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.068>>
- YU, Y. et al. International Journal of Biological Macromolecules Nanostructured lipid carrier-based pH and temperature dual-responsive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 114, p. 462–469, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.117>>
- ZAAK, H.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 64, n. September 2017, p. 200–205, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.020>>
- ZHANG, L. et al. Biocompatible magnetic nanoparticles grafted by poly(carboxybetaine acrylamide) for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 1004–1012, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.181>>
- ZHANG, Y.; ROCHEFORT, D. Activity, conformation and thermal stability of laccase and glucose oxidase in poly(ethyleneimine) microcapsules for immobilization in paper. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 993–1000, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.006>>
- ZUBAREVA, A. et al. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 93, n. October 2016, p. 743–749, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.021>>