

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/04/2025.

DAVID SPRESSÃO DE LIMA JUNIOR

**Imobilização de glucoamilase fúngica comercial em suportes
obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do
amido em reator de tanque agitado operado em batelada**

Tese apresentada ao Programa de
Pós – Graduação em Biotecnologia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Ariela Veloso de Paula

Araraquara

2024

L732i

Lima Junior, David Spressão de

Imobilização de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reator de tanque agitado operado em batelada / David Spressão de Lima Junior. -- , 2024
135 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara,

Orientadora: Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula

1. Amilases. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Manufatura aditiva. 4. Planejamento experimental. 5. Hidrólise. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

As glucoamilases são enzimas de grande importância industrial, com destaque para os processos de produção de bebidas alcoólicas e de xaropes de glicose e frutose. Nesse sentido, levando-se em consideração a relevância industrial e de mercado das glucoamilases, juntamente com o alto valor agregado associado a enzimas, de maneira geral, o presente trabalho tem como impacto potencial contribuir para o avanço nos estudos de imobilização enzimática bem como oferecer soluções práticas para elevar a eficiência e a sustentabilidade de processos enzimáticos por meio do *design* de suportes inovadores utilizando-se a tecnologia de manufatura aditiva.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Glucoamylases are enzymes of significant industrial importance, particularly in the production of alcoholic beverages and glucose and fructose syrups. In light of the industrial and market significance of glucoamylases, coupled with the considerable added value associated with enzymes in general, this work has the potential to contribute to advancements in enzyme immobilization studies and offer practical solutions to enhance the efficiency and sustainability of enzymatic processes through the design of innovative supports using additive manufacturing technology.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Imobilização de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reator de tanque agitado operado em batelada"

AUTOR: DAVID SPRESSÃO DE LIMA JÚNIOR

ORIENTADORA: DANIELA ALONSO BOCCHINI

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

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

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELA ALONSO BOCCHINI
Data: 25/10/2024 07:57:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra. DANIELA ALONSO BOCCHINI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

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

Prof. Dr. JÚLIO CÉSAR DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Escola de Engenharia de Lorena - USP - Lorena

Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dra. JULIANA CRISTINA BASSAN (Participação Virtual)
Faculdade de Tecnologia Profa. Édi Salvi Lima / FATEC - Barretos

Araraquara, 04 de outubro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: David Spressão de Lima Junior

Nome em citações bibliográficas: LIMA JUNIOR, D. S.; LIMA JR, D. S.

Endereço de acesso ao currículo Lattes: lattes.cnpq.br/2622722366127237

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica e Química Orgânica. Unesp – Campus de Araraquara. Jardim Quitandinha. 14800900 – Araraquara, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2020 – Atual: Doutorado em andamento em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Imobilização de glucoamilase fúngica em suportes obtidos por manufatura aditiva e aplicação na hidrólise do amido em reatores enzimáticos.

Orientadora: Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2018 – 2020: Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido.

Orientadora: Daniela Alonso Bocchini

Coorientadora: Heloiza Ferreira Alves do Prado

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2013 – 2017: Graduação em Engenharia Biotecnológica

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico e biomassa unicelular a partir da formulação e cultivo de *Sporidiobolus pararosesus* utilizando-se resíduos agroindustriais.

Orientador: Pedro Oliva Neto

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021 - 2021

Docência no Ensino Superior: fundamentos e práticas pedagógicas. (Carga horária: 30h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2019 - 2019

Ecologia Microbiana: diversidade genética e funcional de fungos. (Carga horária: 8h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2019 - 2019

Redação de Patentes, Além dos Guias + Oficinas Práticas. (Carga horária: 12h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2017 - 2017

Inovações para Saúde, Indústria e Meio Ambiente. (Carga horária: 12h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - 2016

Fundamentos da Produção de Cerveja. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - 2016

Fotografia forense. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014 - 2014

Autocad - Conceitos básicos e aplicações na Área Ambiental. (Carga horária: 60h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

Shinya, Thais Yumi ; Elsner, Victor Henrique Pereira ; De Lima Júnior, David Spressão ; De Barros Ranke, Fabiane Fernanda ; Escaramboni, Bruna ; Da Paixão Melo, Weilan Gomes ; Núñez, Eutimio Gustavo Fernández ; De Oliva Neto, Pedro O. Bioprocess development with special yeasts for cassava bagasse enrichment nutritional to use in animal feed. ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 290, p. 115338, 2022

Livros e capítulos

de Cassia Pereira, J. ; Bocchini, D. A. ; Gomes, E. ; da Silva, R. ; Gomes, J. E. G. ; Sanches, R. D. O. ; Lima Jr, D. S. ; Pereira, W. E. S. ; Silva, G. O. ; Nascimento, C. E. O. . Microbial plant material degrading enzymes: catalysis and application. In: Inamuddin; Tariq Altalhi; Arwa Alrooqi. (Org.). Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science Natural Materials-Based Green Composites 2 : Biomass. 1ed.: Elsevier, 2023, v., p. 79-120.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Lima Jr, D. S.; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras em meio contendo bagaço de cana. In: VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015, Rio Claro. Anais do VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015.

Elsner, V. H. P. ; Lima Jr, D. S. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras para incremento proteico do bagaço de cana. In: VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015, Rio Claro. Anais do VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015.

Shinya, T. Y. ; Lima Junior, D. S. ; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Moraes, F. T. ; Oliva Neto, P. . Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato. In: II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014, Rio Claro - SP. Anais do II Workshop de Bioenergia, 2014.

Apresentações de trabalho

Lima Junior, D. S.; Sessak, I. ; De Paula, A. V. ; Bocchini, D. A. . Immobilization of fungal glucoamylase on carrier obtained by additive manufacturing. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Do Nascimento, J.F.C. ; Lima Junior, D. S. ; Remonato, D. ; Oliveira, J.V. ; Barbosa, L.B. ; De Paula, A. V. . Avaliação do impacto da razão molar na esterificação enzimática de ésteres de cinamato de geranila. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Lima Junior, D. S.; Alves-Prado, H. F. ; Bocchini, D. A. . Studies of amylase production by the endophytic fungi *Paecilomyces* sp. SF 021. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Lima Junior, D. S.; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Avaliação da produção de enzimas por *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 usando palha de cana e soro de leite. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Lima Jr, D. S.; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras em meio contendo bagaço de cana. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Elsner, V. H. P. ; Lima Jr, D. S. ; Ornela, P. H. O. ; Shinya, T. Y. ; Oliva Neto, P. . Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras para incremento proteico. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Shinya, T. Y. ; Elsner, V. H. P. ; Lima Jr, D. S. ; Moraes, F. T. ; Nunez, E. G. F. ; Oliva Neto, P. . Produção de enzimas lignocelulolíticas por *Rhodotorula mucilaginosa*: Um novo bioprocesso utilizando bagaço de cana em cultivo submerso. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Shinya, T. Y. ; Lima Jr, D. S. ; Elsner, V. H. P. ; Ornela, P. H. O. ; Moraes, F. T. ; Oliva Neto, P. . Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais produções técnicas

Lima Junior, D. S.. Avaliador dos painéis apresentados durante o XXXV Congresso de Iniciação Científica do Instituto de Química de Araraquara. 2023.

Lima Junior, D. S.. Avaliador dos painéis apresentados durante o XXXIV Congresso de Iniciação Científica do Instituto de Química de Araraquara. 2022.

Lima Junior, D. S.. Avaliador dos painéis apresentados durante o XXXII Congresso de Iniciação Científica do Instituto de Química de Araraquara. 2020.

Participação em bancas

BAPTISTA NETO, A.; LIMA JR, D. S.; REMONATTO, D.. Participação em banca de Izabela Barbosa. Síntese e caracterização da lipase de *Rhizopus oryzae* para a produção de lipídios estruturados. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista.

Sousa Brito, C. A. R; LIMA JUNIOR, D. S.; SHINYA, THAIS YUMI. Participação em banca de Alisson de Sousa Rodrigues. Quantificação de *Aspergillus* em grãos de arroz comprados em comércios e adquiridos de produtores locais em Campo Maior - PI. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Piauí.

Sousa Brito, C. A. R; LIMA JUNIOR, D. S.; SHINYA, THAIS YUMI. Participação em banca de Janaira do Nascimento Gomes. Monitoramento do curso da água em três locais da comunidade América - PI. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Piauí.

DE PAULA, A. V.; CERRI, M. O.; LIMA JUNIOR, D. S.. Participação em banca de Bárbara Fernandes Izidoro. Impressão 3D: estudo das principais técnicas e da sua aplicação na imobilização enzimática. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista.

Participação em eventos

15 SLACAN – Simpósio Latino-Americano de Ciências de Alimento e Nutrição. 2023.

IX Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2019. (Simpósio).

I Workshop do Departamento de Biotecnologia: Inovações para Saúde, Indústria e Meio Ambiente. 2017. (Oficina).

XXIX Congresso de Iniciação Científica - UNESP. 2017. (Congresso).

Workshop: Inovações em Bioprocessos. 2016. (Exposição).

XIII EEBBA (Encontro de Engenharia Biotecnológica e Biociências de Assis). 2016. (Encontro).

VII Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2015. (Simpósio).

SUPERVISÃO CIENTÍFICA

Iniciação científica:

Ilana Sessak. Imobilização de glucoamilase em poliácido láctico (PLA). Início: 2022. Iniciação científica (Graduando em Bacharelado em Química) - Instituto de Química - UNESP/Araraquara.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
à minha mãe e à minha família por todo o amor, incentivo, ajuda e apoio e
aos meus amigos pela convivência e apoio ao longo de minha trajetória acadêmica*

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes seis longos anos de Pós-graduação, acredito que o principal aprendizado que tive foi o de que é praticamente impossível passar por esse período sozinho e sem o apoio de pessoas queridas e importantes. E eu tive a sorte de, ao longo desta jornada, conhecer e encontrar pessoas maravilhosas as quais, cada uma em sua particularidade, me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço, primeiramente, a minha família, por todo o apoio emocional e financeiro e por acreditarem nos meus objetivos juntos comigo ao longo de todo o período da Graduação e Pós Graduação. Em especial à minha mãe, Ângela Eliza, por nunca ter soltado minha mão ao longo de todos estes anos. Muito obrigado por tudo e por serem meu porto seguro.

Agradeço a Prof^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini por ter me aceito em seu laboratório e em seu grupo de pesquisa. Muito obrigado pelos anos de orientação, ensinamentos, conselhos e amizade, indispensáveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço a Prof^a Dr^a Ariela Veloso de Paula pela sua indispensável co-orientação. Muito obrigado por todos os ensinamentos, conselhos, amizade e paciência, sem os quais não seria possível concluir este trabalho.

Agradeço a banca examinadora por ter aceito avaliar o trabalho e pela disponibilidade.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e me acompanharam ao longo de toda a trajetória acadêmica: Cintia Marcelo de

Oliveira, Pedro Henrique Lopes Cardoso e Khalil Nogueira Nicolau. Obrigado por todo o apoio, suporte, conversas, desabafos e, principalmente, por não permitirem que eu desistisse frente aos momentos difíceis.

Agradeço aos amigos que a cidade de Araraquara me presenteou ao longo destes anos, os quais eu levarei para sempre em meu coração. Em especial, a minha grande amiga e que me proporcionou memórias inesquecíveis, Giulliana. Muito obrigado por tudo. Por todas as conversas, desabafos, risadas e momentos especiais! *“Tamo junto ou não tamo?”* Obrigado!

Agradeço aos amigos e parceiros que a Pós Graduação me presenteou e que me ajudaram em diferentes momentos: Fauller, Jonatas, Bia, Gabi, Naiara, Will, Fábio, Bruno, Lucas, João, Dani G. Dani R. Lélis, Helô e Cecília.

Agradeço aos meus queridos e inesquecíveis companheiros de laboratório: Ilana e Mateus. Muito obrigado por toda a ajuda e pelos momentos de descontração.

Agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa ENZITAG, por terem me acolhido e me ajudado em diversos momentos.

Agradeço aos amigos que estiveram perto, ainda que alguns longe em presença, ao longo dessa trajetória: Seda, Tatu, Caçula, Tânia, Fabi, Nathalia O., Fernanda O., Letícia O., Cristina Z. Guilherme Arthur, Vinicius C., Fernanda P., Luciana B., Thais G., Nathalia B. Cuca, Mari, Mano Vini, Victor E.

Agradeço a Livia F., que entrou na minha vida recentemente, mas foi de grande importância durante a reta final do Doutorado. Muito obrigado.

Agradeço a minha terapeuta Ludmila A. por ter me acompanhado ao longo dos pouco mais de 4 anos do Doutorado e me ajudado a manter o mínimo de saúde mental durante todo o processo.

Agradeço aos meus amigos de quatro patas que já não estão mais neste plano, mas que foram muito importantes ao longo de toda essa jornada e grandes companheiros: Meg, Léia e Luke.

Agradeço ao Prof Dr Murilo Daniel de Melo Innocentini pela parceria e por ter cedido, gentilmente, as amostras de geopolímero necessárias para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof Dr Julián Paul Martinez Galan pelas valiosas colaborações.

Agradeço a Dr^a Daniela Remonatto e ao Prof Dr Hamilton Cabral por terem aceitado o convite para avaliarem o trabalho durante o Exame de Geral de Qualificação e por suas considerações e sugestões para o trabalho.

Agradeço as técnicas e aos técnicos de laboratório do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Ana Lúcia, Adriana, Ivan, Mateus e Flávio por não medirem esforços durante os momentos que precisei de ajuda e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço ao Instituto de Química de Araraquara, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e a Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Araraquara, juntamente com todos os seus funcionários, pela estrutura, oportunidade e serviços prestados.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e todos seus docentes pelos 11 anos de formação e ensino público, gratuito e de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado e minha eterna gratidão.

*“...And then one day you find ten years have got behind you
No one told you when to run, you missed the starting gun.”*

Pink Floyd – Time

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a imobilização covalente de glucoamilase fúngica comercial em suportes obtidos por manufatura aditiva e posterior aplicação dos derivados na hidrólise do amido em reatores enzimáticos. Suportes de poli-ácido láctico (PLA) e de geopolímero, inéditos no contexto das glucoamilases, foram utilizados na imobilização da enzima. Os suportes de PLA foram funcionalizados com grupamentos amino a partir de dois diferentes agentes, separadamente: hexametilenodiamina (HMDA) e etilenodiamina (EDA). Os suportes de geopolímero foram funcionalizados com 3-aminopropil trietoxisilano (APTES). Foram avaliados a influência do pH de imobilização e do carregamento enzimático (fixado em 10 e 200 mg de proteína/g de suporte) e os derivados foram caracterizados físico-quimicamente. Planejamentos experimentais do tipo DCCR foram empregados visando a determinação do pH e da temperatura ótimos da enzima solúvel e dos derivados. O pH ótimo determinado para a enzima em sua forma solúvel (4,93) não sofreu alteração após a imobilização em suportes de geopolímero, enquanto que a imobilização em suportes de PLA funcionalizados com EDA contribuiu para uma ligeira alteração (pH 5,5). Por outro lado, a temperatura ótima de atividade manteve-se a mesma para a enzima solúvel e após a imobilização em suportes de PLA (50 °C) enquanto que a imobilização em suportes de geopolímero contribuiu para uma ligeira alteração deste valor para 55,5 °C). A imobilização em suportes de geopolímero contribuiu para uma elevação da estabilidade e do tempo de meia-vida frente ao seu pH ótimo de atividade ($K_d = 0,01 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 101,93 \text{ h}$), o mesmo não tendo sido observado após a imobilização em suportes de PLA ($K_d = 0,11 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 6,59 \text{ h}$), enquanto que a estabilidade frente às temperaturas ótimas de ambos os derivados obtidos (PLA e geopolímero) foi inferior à demonstrada pela enzima em sua forma solúvel ($K_{d\text{PLA}} = 1,36 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2\text{PLA}} = 0,51 \text{ h}$; $K_{d\text{Geop.}} = 1,77 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2\text{Geop.}} = 0,40 \text{ h}$). Os derivados foram utilizados por cinco ciclos de hidrólise em reatores de tanque agitado, com destaque para as conversões próximas às máximas obtidas pelo uso dos derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de PLA em seis horas de reação (93,44%) e em 24 horas para os derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de geopolímero (91,55%). Os resultados obtidos demonstram o potencial de aplicação dos suportes de PLA e de geopolímero para a imobilização de

glucoamilase, fornecendo opções promissoras para a hidrólise do amido em reatores enzimáticos, facilitando o reuso de biocatalisadores. Esta característica é inatingível com as enzimas em sua forma solúvel, além de contribuir para a sustentabilidade e eficiência dos processos enzimáticos industriais.

Palavras chave: *amilases, enzimas imobilizadas; manufatura aditiva; planejamento experimental; hidrólise*

ABSTRACT

This study aimed to covalently immobilize commercial fungal glucoamylase onto supports obtained through additive manufacturing, and subsequently apply the derivatives to starch hydrolysis in enzymatic reactors. Poly-lactic acid (PLA) and geopolymer supports, novel in the context of glucoamylases, were used for enzyme immobilization. PLA supports were functionalized with amino groups using two different agents, separately: hexamethylenediamine (HMDA) and ethylenediamine (EDA). Geopolymer supports were functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). The influence of immobilization pH and enzyme loading, fixed at 10 and 200 mg protein/g support, was evaluated, and the derivatives were physicochemically characterized. DCCR experimental designs were employed to determine the optimal pH and temperature of the soluble enzyme and derivatives. The optimal pH determined for the enzyme in its soluble form (4.93) did not change after immobilization on geopolymer supports, while immobilization on PLA supports functionalized with EDA contributed to a slight change (pH 5.5). On the other hand, the optimal activity temperature remained the same for the soluble enzyme and after immobilization on PLA supports (50 °C), while immobilization on geopolymer supports contributed to a slight change in this value to 55.5 °C. Immobilization on geopolymer supports contributed to an increase in stability and half-life at its optimal pH ($K_d = 0.01 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2} = 101.93 \text{ h}$), which was not observed after immobilization on PLA supports ($K_d = 0.11 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2} = 6.59 \text{ h}$), while stability at the optimal temperatures of both derivatives obtained (PLA and geopolymer) was lower than that demonstrated by the enzyme in its soluble form ($K_{d\text{PLA}} = 1.36 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2\text{PLA}} = 0.51 \text{ h}$; $K_{d\text{Geop.}} = 1.77 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2\text{Geop.}} = 0.40 \text{ h}$). The derivatives were used for five hydrolysis cycles in stirred-tank reactors, with emphasis on conversions close to the maximum obtained using the derivatives obtained from immobilization on PLA supports in six hours of reaction (93.44%) and in 24 hours for the derivatives obtained from immobilization on geopolymer supports (91.55%). The results obtained demonstrate the potential application of PLA and geopolymer supports for the immobilization of glucoamylase, providing promising options for starch hydrolysis in enzymatic reactors, facilitating the reuse of biocatalysts. This characteristic is unattainable with enzymes in their soluble form, and also contributes to the sustainability and efficiency of industrial enzymatic processes.

Keywords: *amylase, immobilized enzymes; additive manufacturing; experimental design; hydrolysis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais do amido. a) amilose; b) ponto de ramificação da amilopectina; c) agrupamento entre amilose e amilopectina nos grânulos de amido.	31
Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.	32
Figura 3. Mecanismos de reação dos diferentes tipos de amilases. A) mecanismo inversor de configuração anomérica B) mecanismo retentor de configuração anomérica.....	37
Figura 4. Métodos físicos e químicos empregados na imobilização de enzimas.	42
Figura 5. Suportes de PLA projetados em CAD para imobilização de glucoamilase comercial.....	56
Figura 6. Suportes de geopolímero utilizados para imobilização de glucoamilase comercial.....	60
Figura 7. Mecanismo de reação de aminólise envolvido na incorporação dos grupamentos amina nos suportes de PLA.....	72
Figura 8. Alteração da cor do suporte após etapa de ativação com glutaraldeído. a) sem exposição ao reagente b) após exposição.	73
Figura 9. Espectrometria em infravermelho do suporte de PLA (a), do suporte após a funcionalização, (b) do suporte funcionalizado e ativado, (c), do derivado de PLA (d) e da enzima solúvel (e).	80
Figura 10. Espectrometria em infravermelho do suporte de geopolímero (a), do suporte após a funcionalização, (b) do suporte funcionalizado e ativado, (c), do derivado de geopolímero (d).	82
Figura 11. Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da glucoamilase solúvel (A) e dos derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes de PLA (B).	90
Figura 12. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no delineamento de composto central rotacional	

(DCCR), para a máxima atividade de glucoamilase solúvel(A) e derivados obtidos a partir da imobilização de glucoamilase em suportes de PLA (B).91

Figura 13. Superfície de resposta obtida para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.....	96
Figura 14. Perfil dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no delineamento de composto central rotacional (DCCR), para a máxima atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.....	97
Figura 15. Estabilidade operacional dos derivados obtidos através da imobilização covalente de glucoamilase em suportes de PLA. *100%: 9,18 U/g.	105
Figura 16. Estabilidade operacional dos derivados obtidos através da imobilização covalente de glucoamilase em suportes de geopolímero *100%: 7,22 U/g.....	106
Figura 17. Hidrólise enzimática do amido e conversão em glicose por meio da ação de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA.....	108
Figura 18. Hidrólise enzimática do amido e conversão em glicose por meio da ação de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de geopolímero	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização.	45
Tabela 2. Exemplos de enzimas imobilizadas em suportes obtidos por manufatura aditiva.	49
Tabela 3. Valores reais e codificados das variáveis utilizadas nos delineamentos de composto central rotacional.	64
Tabela 4. Influência do agente funcionalizante e do pH de imobilização, na presença (ST) e na ausência (SNT) de NaBH ₄ na imobilização de glucoamilase em suportes de PLA.	68
Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA) para os valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização dos derivados em função do agente funcionalizante, adição de NaBH ₄ e pH de imobilização.	70
Tabela 6. Avaliação da influência do pH na imobilização de glucoamilase em suportes de geopolímero.	75
Tabela 7. Influência do carregamento enzimático de suportes de PLA sob a atividade enzimática e o rendimento de imobilização da glucoamilase.	77
Tabela 8. Influência do carregamento enzimático de suportes de geopolímero sob a atividade enzimática e o rendimento de imobilização da glucoamilase.	78
Tabela 9. Matriz do planejamento experimental (DCCR) e resultados experimentais e previstos para a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA em função do pH e da temperatura.	84
Tabela 10. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase solúvel.	85

Tabela 11. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.	86
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase solúvel.	88
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.	89
Tabela 14. Matriz do planejamento experimental (DCCR) e resultados experimentais e previstos para a atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.	92
Tabela 15. Coeficientes de regressão dos efeitos do pH e da temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero.	93
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para os efeitos pH e temperatura na atividade de glucoamilase imobilizada em suportes de geopolímero	95
Tabela 17. Constantes de desativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima solúvel e imobilizada em suportes de PLA e geopolímero.	100
Tabela 18. Constantes de desativação enzimática pelo efeito do pH ótimo de atividade (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima solúvel e imobilizada em suportes de PLA e geopolímero.....	102

Sumário

1. Introdução	25
2. Revisão bibliográfica.....	30
2.1. Amido	30
2.2. Amilases	32
2.2.1. Mecanismo de ação das glucoamilases.....	35
2.2.2. Estrutura das glucoamilases	37
2.3. Aplicação industrial das glucoamilases	38
2.4. Métodos e suportes utilizados para imobilização enzimática.....	42
2.4.1. Imobilização de enzimas utilizando-se suportes obtidos por manufatura aditiva	48
3. Objetivos	54
4. Material e métodos	55
4.1. Materiais.....	55
4.2. Imobilização da glucoamilase comercial em suportes impressos de PLA 55	
4.2.1. Design dos suportes 3D de PLA.....	55
4.2.2. Funcionalização dos suportes de PLA.....	56
4.2.3. Ativação dos suportes de PLA	57
4.2.4. Imobilização em suportes de PLA	57
4.3. Imobilização da glucoamilase comercial em suportes impressos de geopolímero.....	58
4.3.1. Impressão dos suportes de geopolímero	58
4.3.2. Troca iônica.....	60
4.3.3. Funcionalização e ativação dos suportes de geopolímero	61
4.3.4. Imobilização em suportes de geopolímero	61
4.4. Avaliação da influência do carregamento enzimático na imobilização de glucoamilase	61
4.5. Determinação da atividade de glucoamilase	62
4.6. Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford ..	63
4.7. Caracterização físico química da enzima solúvel e dos derivados obtidos	63
4.7.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática	63
4.7.2. Estabilidade ao pH e temperatura	64
4.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	65
4.9. Ensaios de estabilidade operacional dos derivados obtidos a partir da imobilização em suportes de PLA e em suportes de geopolímero	66

4.10. Hidrólise enzimática do amido em reatores enzimáticos de tanque agitado operando em batelada	66
5. Resultados e discussão	68
5.1. Imobilização de glucoamilase em suportes de PLA e em suportes de geopolímero.....	68
5.2. Influência do carregamento enzimático na imobilização de glucoamilase	76
5.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier dos suportes de PLA e de geopolímero	79
5.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de glucoamilase solúvel e imobilizada em suportes de PLA	83
5.5. Estabilidade pH e temperatura	99
5.5.1. Estabilidade frente a temperatura da glucoamilase solúvel e dos derivados de PLA e geopolímero	99
5.6. Estabilidade operacional das glucoamilases imobilizadas em suportes de PLA.....	104
5.7. Hidrólise enzimática do amido utilizando glucoamilase imobilizada em suportes de PLA.....	108
6. Conclusões	114
7. Referências	115

1. Introdução

A aplicação industrial de enzimas microbianas tem crescido notavelmente nas últimas décadas, e, paralelamente, os avanços no campo da Microbiologia Industrial e da Engenharia Bioquímica favoreceram a expansão das possibilidades de aplicação destes biocatalisadores (ARBIGE *et al.*, 2019; JEMLI *et al.*, 2016). Como consequência, tem-se observado uma diminuição progressiva na utilização industrial de catalisadores químicos que, além de apresentarem custo elevado, frequentemente requerem condições severas de reação como altas temperatura e pressão, envolvendo processos que resultam em maior consumo de energia e geração de subprodutos indesejáveis, com grande impacto negativo sobre o meio ambiente (SINDHU *et al.*, 2017). Nesse sentido, o uso de enzimas como biocatalisadores industriais apresenta algumas vantagens tanto sob o ponto de vista econômico, visto que atuam sob condições moderadas de pH, temperatura e pressão, quanto em relação às questões ambientais, pois são biodegradáveis e apresentam elevada especificidade ao substrato sem a geração de subprodutos ou produtos tóxicos ao ambiente (JEMLI *et al.*, 2016).

As amilases, enzimas que realizam a degradação do amido, ocupam um lugar de destaque na indústria, sobretudo no setor alimentício o qual depende amplamente destas biomoléculas para a produção de bebidas alcoólicas, pães e xaropes com alto teor de açúcares (KUMAR *et al.*, 2023; SAINI *et al.*, 2017). Além disso, as amilases também são empregadas nas indústrias têxtil, de papel, de detergente e, mais recentemente, têm sido estudadas para a aplicação na sacarificação de subprodutos amiláceos visando a obtenção de etanol de segunda geração (KUMAR *et al.*, 2023; KUMAR; CHAKRAVARTY, 2018).

Devido à sua complexidade estrutural, caracterizada por apresentar diferentes pontos de clivagem ao longo de sua molécula, o amido é hidrolisado por diferentes tipos de amilases, que são classificadas quanto ao seu local de ação em: endoamilases, exoamilases e amilases desramificantes, liberando diversos produtos de interesse industrial tais como a glicose e derivados de malto e ciclodextrina (POLIZELI *et al.*, 2016).

Uma das enzimas mais antigas e amplamente utilizada na indústria de alimentos é a glucoamilase (1,4- α -D-glucanoglucohidrolase, EC 3.2.1.3), cuja principal aplicação é a sacarificação do amido ou dextrinas em glicose, um produto essencial para inúmeros processos de fermentação em uma grande variedade de indústrias de alimentos e bebidas. Também conhecida como amiloglucosidase, a glucoamilase é uma exoamilase, produzida principalmente por fungos, responsável pela hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula do amido. Mais recentemente, o potencial das glucoamilases para sacarificar matérias primas amiláceas tem sido estudado a fim de se empregar a glicose resultante na produção de etanol biológico (KUMAR *et al.*, 2023). O interesse neste biocombustível tem crescido consideravelmente nas últimas décadas como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, justificada tanto pela possibilidade de depleção destas reservas quanto pela questão ambiental (LI *et al.*, 2022; XU; WANG, 2017). Nesse sentido, o setor sucroalcooleiro brasileiro, tradicionalmente dominado pela cana-de-açúcar, tem experimentado uma diversificação significativa nos últimos anos. As usinas flexíveis, que são aquelas de cana-de-açúcar adequadas para produzir etanol de milho no período da entressafra da cana, têm se multiplicado, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país, o que

tem contribuído para o crescimento da produção de etanol de milho (ZIERO *et al.*, 2021). Segundo dados divulgados pela UNICA (Associação Brasileira da Indústria de Cana-de-Açúcar) em outubro de 2024, a produção quinzenal de etanol de milho representou 16,31% do biocombustível fabricado no Centro-Sul, atingindo 327,43 milhões de litros. Além disso, no acumulado desde o início da safra 2024/2025, a produção de etanol de milho atingiu 4,13 bilhões de litros, representando um avanço de 27,35% na comparação com igual período do ano de 2023 (UNICA, 2024).

Apesar das vantagens do uso de enzimas em substituição aos catalisadores químicos em processos industriais, sua aplicação industrial exige uma boa relação custo/efetividade, a fim de se justificar sua competitividade em termos econômicos. Uma importante limitação para a aplicação das enzimas em escala industrial é a manutenção de sua estabilidade e atividade catalítica ao longo do processo, juntamente com a inviabilidade de reuso destas quando na forma solúvel (ARBIGE *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a imobilização de enzimas tem se mostrado uma estratégia interessante, sendo definida como a associação física ou química de uma enzima a um suporte ou uma matriz sólida, insolúvel em água e inerte, através de diferentes técnicas como adsorção, ligação covalente, confinamento ou afinidade. A imobilização, pelas ligações estabelecidas entre suporte e enzima, pode proteger significativamente a configuração da proteína de modo a reter ao máximo a atividade e estabilidade enzimáticas (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, pode possibilitar o reuso dos biocatalisadores, contribuindo para a redução dos custos associados às etapas de produção e, quando necessário, purificação da enzima bem como de separação do produto. A imobilização de

enzimas também influencia na simplificação das etapas de *downstream*, bastando a simples adição ou remoção da enzima imobilizada do meio reacional para a interrupção rápida e precisa das reações enzimáticas, permitindo assim um maior controle do processo juntamente com a possibilidade de otimização do *design* de reatores (BASSO; SERBAN, 2019).

A escolha do suporte ao qual a enzima será imobilizada representa uma etapa importante para que o processo de imobilização ocorra, sendo necessário que a interação com o suporte garanta que a atividade catalítica seja mantida em um nível satisfatório. Desta forma, o suporte deve atender a alguns requisitos como insolubilidade nas condições reacionais e alta afinidade pela enzima, estabilidade térmica e química, presença de grupos funcionais reativos, fácil disponibilidade e, além disso, ser preferencialmente de baixo custo (ZDARTA *et al.*, 2018).

A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, tem se popularizado nas últimas décadas, contribuindo para o avanço em diversas áreas da ciência (HASSAN *et al.*, 2024). Essa tecnologia consiste na criação de objetos tridimensionais a partir de um modelo digital, e, por meio da adição sucessiva de material, camada por camada, obtêm-se o objeto desejado (REMONATTO *et al.*, 2023; SHAO *et al.*, 2022). A flexibilidade e a precisão da impressão 3D têm aberto novas possibilidades para a produção de matérias e objetos personalizados, incluindo suportes para imobilização de enzimas (DOS SANTOS *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020; REMONATTO *et al.*, 2023; SHAO *et al.*, 2022, 2024). Com a popularização desta técnica, nota-se uma crescente tendência do seu uso para se produzir suportes enzimáticos personalizados quanto a dimensão e porosidade. Além disso, a impressão 3D permite a

utilização de uma ampla variedade de materiais como biopolímeros, metais e cerâmicas, possibilitando a criação de suportes com diferentes propriedades (REMONATTO *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o presente trabalho propõe a utilização de manufatura aditiva (impressão 3D) para obtenção de dois diferentes suportes enzimáticos (PLA e geopolímero) para a imobilização de glucoamilases.

O poliácido láctico (PLA), um biopolímero biodegradável e *eco-friendly*, destaca-se como uma opção promissora para a imobilização de enzimas. Suas propriedades, como a biocompatibilidade, a possibilidade de ser processado por manufatura aditiva (impressão 3D), e seu custo relativamente baixo, o tornam um material atrativo para a produção de suportes para a imobilização de enzimas. (FARAH *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017).

Os geopolímeros, por sua vez, apresentam elevada porosidade e composição semelhante à das zeólitas (materiais frequentemente empregados na imobilização de enzimas), o que os torna materiais promissores para esta finalidade. Essa característica, combinada com a possibilidade de serem aplicados à impressão 3D, visando a obtenção de suportes personalizados, confere aos geopolímeros uma grande versatilidade. Além disso, a composição química dos geopolímeros pode ser ajustada para otimizar suas propriedades mecânicas, térmicas e químicas, tornando-os materiais adequados para diversas aplicações em biotecnologia. (FRANCHIN *et al.*, 2017).

Diferentes técnicas e suportes têm sido utilizados para a imobilização de amilases, no entanto, o uso de PLA e geopolímero para a imobilização de glucoamilases não tem sido citado na literatura, justificando assim a importância e relevância do presente trabalho.

6. Conclusões

O presente trabalho explorou a aplicação da impressão 3D na fabricação de suportes de PLA e suportes de geopolímero para a imobilização da glucoamilase de *Aspergillus niger* A7095, demonstrando a versatilidade da impressão 3D na criação de suportes personalizados para a imobilização de enzimas, abrindo novas possibilidades para otimização de processos biocatalíticos.

Os resultados obtidos indicam a possibilidade de reutilização da enzima, destacando-se a melhora da estabilidade frente ao pH ótimo de atividade observado pela imobilização em suportes de geopolímero e o melhor desempenho na hidrólise do amido obtido pelos derivados de PLA.

Nesse sentido, embora pesquisas futuras sejam necessárias para explorar as condições de imobilização e modificação dos suportes e da enzima, visando uma melhora da estabilidade dos derivados obtidos, o presente trabalho contribuiu não apenas para o avanço da ciência de imobilização enzimática, ao propor o uso de impressão 3D no design de novos suportes para imobilização de glucoamilases, mas também oferece soluções práticas para aumentar a eficiência e a sustentabilidade dos processos enzimáticos.

7. Referências

- ADHIKARI, S.; PRAMANIK, N. Application of immobilized enzymes in the food industry. **Enzymes in Food Biotechnology**, [s. l.], p. 711–721, 2019.
- AGGARWAL, S.; CHAKRAVARTY, A.; IKRAM, S. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 167, p. 962–986, 2021.
- AI, Y.; JANE, J.-L. Understanding Starch Structure and Functionality. In: SJÖÖ, Malin; NILSSON, Lars (org.). **Starch in Food: Structure, Function and Applications**. Seconded. [S. l.]: Woodhead Publishing, 2018. p. 151–178.
- AKHOND, M.; PASHANGHEH, K.; KARBALAEI-HEIDARY, H. R.; ABSALAN, G. Efficient Immobilization of Porcine Pancreatic α -Amylase on Amino-Functionalized Magnetite Nanoparticles: Characterization and Stability Evaluation of the Immobilized Enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 180, p. 954–968, 2016.
- ALMEIDA, V. O.; PASCOAL, A. M.; FERREIRA, M. C.; MORAIS, R. R.; MORAES, M. G.; BATISTA, K. A.; FERNANDES, K. F. Molecular structure of amylopectin/amylose from *Solanum lycocarpum* starch after enzymatic hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 100, n. June 2019, p. 1–8, 2020.
- AMIRBANDEH, M.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; GAILLARD, C. Triazine-functionalized chitosan-encapsulated superparamagnetic nanoparticles as reusable and robust nanocarrier for glucoamylase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 127, p. 119–127, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.001>.

ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1355–1366, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>.

ARULMURUGAN, S.; KAVITHA, H. P.; VENKATRAMAN, B. R. Biological activities of schiff base and its complexes: A review. **Rasayan Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 385–410, 2010.

ASLAN, Y.; SHARIF, Y. M.; SAHIN, O. Covalent immobilization of *Aspergillus niger* amyloglucosidase (ANAG) with ethylenediamine-functionalized and glutaraldehyde-activated active carbon (EFAAC) obtained from sesame seed shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 142, p. 222–231, 2020.

ASLAN, Yakup; SHARIF, Y. M.; ŞAHİN, Ö. Covalent immobilization of *Aspergillus niger* amyloglucosidase (ANAG) with ethylenediamine-functionalized and glutaraldehyde-activated active carbon (EFGAAC) obtained from sesame seed shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 142, p. 222–231, 2020.

BADOEI-DALFARD, A.; MALEKABADI, S.; KARAMI, Z.; SARGAZI, G. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of Km12 lipase: A stable nanobiocatalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 141, p. 874–882, 2019.

BAIG, U.; GONDAL, M. A.; ALAM, M. F.; LASKAR, A. A.; ALAM, M.; YOUNUS, H. Enzyme immobilization and molecular modeling studies on an organic–inorganic polypyrrole–titanium(IV)phosphate nanocomposite. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 39, p. 6976–6986, 2015.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015.

BASSO, A.; SERBAN, S. **Industrial applications of immobilized enzymes—A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019.

BENAMIA, F.; BENOUIS, S.; BELAFRIEKH, A.; SEMACHE, N.; REBBANI, N.; DJEGHABA, Z. Efficient *Candida rugosa* lipase immobilization on Maghnite clay and application for the production of (1R)-(2)-Menthyl acetate. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 71, p. 785–793, 2017.

BERTOFT, E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. **Agronomy**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 56, 2017.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 6, p. 151–160, 2002.

BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL, H. M. N. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 202–219, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>.

CHEN, N.; ZHANG, C.; LIU, Y.; DONG, X.; SUN, Y. Cysteine-modified poly(glycidyl methacrylate) grafted onto silica nanoparticles: New supports for significantly enhanced performance of immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 145, p. 137–144, 2019.

CORNETT, C. A. G.; FANG, T.-Y.; REILLY, P. J.; FORD, C. Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 521–529, 2003.

CRABB, W. D.; MITCHINSON, C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 349–352, 1997.

DA COSTA LUCHIARI, I.; CEDENO, F. R. P.; DE MACÊDO FARIAS, T. A.; PICHELI, F. P.; DE PAULA, A. V.; MONTI, R.; MASARIN, F. Glucoamylase Immobilization in Corncob Powder: Assessment of Enzymatic Hydrolysis of Starch in the Production of Glucose. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 5491–5504, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01379-0>.

DABA, T.; KOJIMA, K.; INOUE, K. Chemical modification of wheat β -amylase by trinitrobenzenesulfonic acid, methoxypolyethylene glycol, and glutaraldehyde to improve its thermal stability and activity. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 53, n. 6–7, p. 420–426, 2013.

DATTA, S.; CHRISTENA, R. L.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s. l.], v. 3, p. 1–9, 2013.

DÍAZ-RODRIGUEZ, A.; DAVIS, B. G. Chemical modification in the creation of novel biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 211–219, 2011.

DOMINGUES, O.; REMONATTO, D.; DOS SANTOS, L. K.; MARTINEZ-GALÁN, J. P.; FLUMIGNAN, D. L.; DE PAULA, A. V. Evaluation of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles in Enzymatic/Chemical

Hydroesterification for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 194, p. 5419–5442, 2022.

DOS SANTOS, L. K.; BOTTI, R. F.; INNOCENTINI, M. D. de M.; MARQUES, R. F. C.; COLOMBO, P.; DE PAULA, A. V.; FLUMIGNAN, D. L. 3D printed geopolymer: An efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 414, p. 128843, 2021.

EMRUZI, Z.; AMINZADEH, S.; KARKHANE, A. A.; ALIKHAJEH, J.; HAGBEEN, K.; GHOLAMI, D. Improving the thermostability of *Serratia marcescens* B4A chitinase via G191V site-directed mutagenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 116, p. 64–70, 2018.

FANG, X.; WANG, X.; LI, G.; ZENG, J.; LI, J.; LIU, J. SS-mPEG chemical modification of recombinant phospholipase C for enhanced thermal stability and catalytic efficiency. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 111, p. 1032–1039, 2018.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 107, p. 367–392, 2016.

FRANCHIN, G.; SCANFERLA, P.; ZEFFIRO, L.; ELSAYED, H.; BALIELLO, A.; GIACOMELLO, G.; PASETTO, M.; COLOMBO, P. Direct ink writing of geopolymeric inks. **Journal of the European Ceramic Society**, [s. l.], v. 37, p. 2481–2489, 2017.

FRASER, N. J.; LIU, J.-W.; MABBITT, P. D.; CORREY, G. J.; COPPIN, C. W.; LETHIER, M.; PERUGINI, M. A.; MURPHY, J. M.; OAKESHOTT, J. G.; WELK,

M.; JACKSON, C. J. Evolution of Protein Quaternary Structure in Response to Selective Pressure for Increased Thermostability. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 11, p. 2359–2371, 2016.

FROTA, E. G.; SARTOR, K. B.; BIDUSKI, B.; MARGARITES, A. C. F.; COLLA, L. M.; PICCIN, J. S. Co-immobilization of amylases in porous crosslinked gelatin matrices by different reticulations approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 165, p. 1002–1009, 2020.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s. l.], v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GEORGE, R.; SUGUNAN, S. Synthesis and characterization of immobilized glucoamylase on mesocellular foams through spectroscopic techniques and catalytic activity of immobilized enzyme. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 50, p. 107–112, 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.245>.

GKANTZOU, E.; SKONTA, A.; TSAKNI, A.; POLYDERA, A.; MOSCHOVAS, D.; SPYROU, K.; AVGEROPOULOS, A.; GOURNIS, D.; HOUHOULA, D.; STAMATIS, H. 3D printed PLA enzyme microreactors: Characterization and application for the modification of bioactive compounds. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 350, p. 75–85, 2022.

GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ROCHA-MARTIN, J.; MORENO-GAMERO, D. Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**,

[s. l.], v. 35, p. 100593, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100593>.

GUISAN, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; BOLIVAR, J. M.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G. The science of enzyme immobilization. *In*: GUISAN, Jose M.; BOLIVAR, Juan M.; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; ROCHA-MARTIN, Javier (org.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols**. 4th. ed. [S. l.: s. n.], 2020. p. 1–26.

GUMEL, A. H.; BALA, M.; SHEHU, A.; ADAM, I. K.; NASIDI, M.; MUHAMMAD, I. U.; IMAM, A. A. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Cocoyam. **Annual Research & Review in Biology**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1–9, 2018.

HAMID, B.; BASHIR, Z.; YATOO, A. M.; MOHIDDIN, F.; MAJEED, N.; BANSAL, M.; POCZAI, P.; ALMALKI, W. H.; SAYYED, R. Z.; SHATI, A. A.; ALFAIFI, M. Y. Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 18, p. 5885, 2022.

HASSAN, M.; MISRA, M.; TAYLOR, G. W.; MOHANTY, A. K. A Review of AI for optimization of 3D Printing of Sustainable Polymers and Composites. **Composites Part C: Open Access**, [s. l.], p. 100513, 2024.

HASSAN, M. E.; YANG, Q.; XIAO, Z. Covalent immobilization of glucoamylase enzyme onto chemically activated surface of κ-carrageenan. **Bulletin of the National Research Centre**, [s. l.], v. 43, n. 1, 2019.

HETTIARACHCHY, N. S.; FELIZ, D. J.; EDWARDS, J. S.; HORAX, R. The use of immobilized enzymes to improve functionality. *In*: PROTEINS IN FOOD PRECESSING. [S. l.: s. n.], 2018. p. 559–597.

HOBBS, L. Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses. *In*: STARCH: CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. [S. l.: s. n.], 2009. p. 797–832.

HSIEH, Y.-P.; LIN, S.-C. Effect of PEGylation on the activity and stability of horseradish peroxidase and L-N-carbamoylase in aqueous phases. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 1372–1378, 2015.

JANECEK, S.; SVENSSON, B. How many α -amylase GH families are there in the CAZy database?. **Amylase**, [s. l.], v. 6, p. 1–10, 2022.

JEMLI, S.; AYADI-ZOUARI, D.; BEN HLIMA, H.; BEJAR, S. Critical Reviews in Biotechnology Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Crit Rev Biotechnol**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 246–258, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ibty20http://informahealthcare.com/bty>. Acesso em: 29 jul. 2021.

JENSEN, T.; ABDELMALEK, M. F.; SULLIVAN, S.; NADEAU, K. J.; GREEN, M.; RONCAL, C.; NAKAGAWA, T.; KUWABARA, M.; SATO, Y.; HANG, D.-H.; TOLAN, D. R.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; ROSEN, H. R.; LANASPA, M. A.; DIEHL, A. M.; JOHNSON, R. J. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 68, p. 1063–1075, 2018.

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

KOSHLAND JR, D. . STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 416–436, 1953.

- KOUKOUVITI, E.; KOKKINOS, C. 3D printed enzymatic microchip for multiplexed electrochemical biosensing. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1186, p. 339114, 2021.
- KUMAR, S.; CHAKRAVARTY, S. Amylases. *In*: NUNES, Carlos Simões; KUMAR, Vikas (org.). **Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and perspectives**. [S. l.]: Academic Press, 2018. p. 163–180.
- KUMAR, N. S. M.; KISHORE, V.; MANONMANI, H. K. Chemical modification of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. for improved activity and thermal stability. **Preparativa Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 433–450, 2014.
- KUMAR, S.; NATH, P.; BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; BHATTACHARJEE, R.; SATYANARAYANA, T. Diversity and biotechnological applications of microbial glucoamylases. *In*: GOYAL, Arun; SHARMA, Kedar (org.). **Glycoside Hydrolases Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology A volume in Foundations and Frontiers in Enzymology**. [S. l.: s. n.], 2023. p. 365–387.
- LEE, J.; PAETZEL, M. Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Acta Crystallographica**, [s. l.], v. 67, p. 188–192, 2011.
- LEMOS, C. M.; FUCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. Glucoamilase: Estrutura e Termoestabilização. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 31, p. 86–94, 2003.
- LI, S.; ZHAO, S.; HOU, Y.; CHEN, G.; CHEN, Y.; ZHANG, Z. Polylactic Acid (PLA) Modified by Polyethylene Glycol (PEG) for the Immobilization of Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 190, p. 982–996, 2020.

LI, J.; ZHAO, R.; XU, Y.; WU, X.; BEAN, S. R.; WANG, D. Fuel ethanol production from starchy grain and other crops: An overview on feedstocks, affecting factors, and technical advances. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 188, p. 223–239, 2022.

LIU, S.; BILAL, M.; RIZWAN, K.; GUL, I.; RASHEED, T.; IGBAL, H. M. N. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 190, p. 396–408, 2021.

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.

LIU, J.; SHEN, X.; ZHENG, Z.; LI, M.; ZHU, X.; CAO, H.; CUI, C. Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 518–525, 2020.

LIU, Q.; XUN, G.; FENG, Y. The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 530–537, 2019.

LÓPEZ MARZO, A. M.; MAYORGA-MARTINEZ, C. C.; PUMERA, M. 3D-printed graphene direct electron transfer enzyme biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 151, p. 111980, 2020.

MARSHALL, R. O.; KOOL, E. R. Enzymatic Conversion of D-Glucose to D-Fructose. **Science**, [s. l.], v. 125, n. 3249, p. 648–549, 1957.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C.

Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 709–802, 2004.

MINGUES, H.; SCHNEPEL, C.; BÖTTCHER, D.; WEISS, M. S.; SPROSS, J.; BORNSCHEUER, U. T.; SEWALD, N. Targeted Enzyme Engineering Unveiled Unexpected Patterns of Halogenase Stabilization. **ChemCatChem**, [s. l.], v. 12, p. 818–831, 2020.

MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases. *In*: REFERENCE MODULE IN LIFE SCIENCES. ENCYCLOPEDIA OF MICROBIOLOGY. [S. l.: s. n.], 2019. p. 107–126.

MOLLER, M. S.; SVENSSON, B. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 40, p. 33–42, 2016.

MONAJATI, M.; TAMADDON, A. M.; YOUSEFI, G.; ABOLMAALI, S. S.; DINARVAND, R. Applications of RAFT polymerization for chemical and enzymatic stabilization of l-asparaginase conjugates with well-defined poly(HPMA). **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 43, p. 11564–11574, 2019.

MONDAL, S.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C. Fungal Enzymes for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *In*: YADAV, A.; SIGH, S.; MISHRA, S.; GUPTA, A. (org.). **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. [S. l.: s. n.], 2019. p. 349–380.

MONDAL, S.; MONDAL, K.; HALDER, S. K.; THAKUR, N.; MONDAL, K. C. Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 45, p. 102509, 2022.

MUKHERJEE, S.; KULKARNI, M.; KULKARNI, S.; NAIK, S. Covalent immobilization of amyloglucosidase on Tulsion® weak base anionic resin: optimization by Box-Behnken DOE followed by thermal characterization. **The Journal of Bioprocess Technology**, [s. l.], p. 293–302, 2013.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Facile synthesis of glucoamylase embedded metal-organic frameworks (glucoamylase-MOF) with enhanced stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 95, p. 511–519, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.084>.

NDOCHINWA, O. G.; WANG, Q.-Y.; AMADI, O. C.; NWAGU, T. N.; NNAMCHI, C. I.; OKEKE, E. S.; MONEKE, A. N. Current status and emerging frontiers in enzyme engineering: An industrial perspective. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, p. 32673, 2024.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 135–152, 2000.

PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. **BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 71–78, 2010.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal Cellulases. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PAZUR, J. H.; ANDO, T. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 234, n. 8, p. 1966–1970, 1959.

PEREIRA, J. de C.; BOCCHINI, D. A.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; GOMES, J. E. G.; SANCHES, R. D. de O.; LIMA JUNIOR, D. S.; PEREIRA, W. E. S.; DA SILVA, G. O.; NASCIMENTO, C. E. de O. Microbial plant material–degrading enzymes: catalysis and application. *In*: INAMMUDIN, Tariq Altalhi; ALROOQI, Arwa (org.). **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science Natural Materials-Based Green Composites 2 : Biomass**. [S. l.: s. n.], 2023. p. 79–120.

PEREIRA, S. E.; FERNANDES, K. F.; ULHOA, C. J. Immobilization of *Cryptococcus flavus* α -amylase on glass tubes and its application in starch hydrolysis. **Starch**, [s. l.], v. 69, n. 3–4, p. 1600189, 2017.

POLIZELI, M. L. T. .; CARVALHO, C. .; POLIZELI, A. M. O sistema amilolítico. *In*: POLIZELI, M.L.T.M; SILVA, T.M. (org.). **Amilases Microbianas**. [S. l.]: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2016.

QUINTANILLA-GUERRERO, F.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A.; TINOCO, R.; GÓMEZ-SUÁREZ, M.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; REGALADO, C. Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 17, p. 8058–8065, 2008.

REICHERT, C.; BORCHARD, G. Noncovalent PEGylation, An Innovative Subchapter in the Field of Protein Modification. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 386–390, 2016.

REMONATTO, D.; FERRARI, B. R.; BASSAN, J. C.; MUSSAGY, C. U.; SANTOS-EBINUMA, V. de C.; DE PAULA, A. V. Utilization of Clay Materials as

Support for *Aspergillus japonicus* Lipase: An Eco-Friendly Approach. **Catalysts**, [s. l.], v. 11, n. 1173, 2021.

REMONATTO, D.; IZIDORO, B. F.; MAZZIERO, V. T.; CATARINO, B. P.; DO NASCIMENTO, J. F. C.; CERRI, M. O.; ANDRADE, G. S. S.; DE PAULA, A. V. 3D printing and enzyme immobilization: An overview of current trends.

Bioprinting, [s. l.], v. 33, p. e00289, 2023.

RINALDI, M.; CATERINO, M.; FERA, M.; MANCO, P.; MACCHIAROLI, R. Technology selection in green supply chains - the effects of additive and traditional manufacturing. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 282, p. 124554, 2021.

ROTH, C.; MOROZ, O. V.; ARIZA, A.; SKOV, L. K.; AYABE, K.; DAVIES, G. J.; WILSON, K. S. Structural insight into industrially relevant glucoamylases: flexible positions of starch-binding domains. **Acta Crystallographica**, [s. l.], v. 74, p. 463–470, 2018.

SAADI, M. A. S. .; MAGUIRE, A.; POTTACKAL, N. T.; THAKUR, S. H.; IKRAM, M.; HART, A. J.; AJAYAN, P. M.; RAHMAN, M. M. Direct Ink Writing: A 3D Printing Technology for Diverse Materials. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 34, p. 2108855, 2022.

SAHA, B. C.; ZEIKUS, J. G. Microbial glucoamylase: Biochemical and Biotechnological features. **Starch/Stärke**, [s. l.], v. 41, p. 57–64, 1989.

SAINI, R.; SINGH SAINI, H.; DAHIYA, A. Amylases: Characteristics and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1895–1871, 2017.

SEMENYUK, P.; TIAINEN, T.; HIETALA, S.; TENHU, H.; ASEYEV, V.;

MURONETZ, V. Artificial chaperones based on thermoresponsive polymers recognize the unfolded state of the protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 536–545, 2019.

SHAO, Y.; GAN, N.; GAO, B.; HE, B. Sustainable 3D-printed β -galactosidase immobilization coupled with continuous-flow reactor for efficient lactose-free milk production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 481, p. 148557, 2024.

SHAO, Y.; LIAO, Z.; GAO, B.; HE, B. Emerging 3D Printing Strategies for Enzyme Immobilization: Materials, Methods, and Applications. **ACS Omega**, [s. l.], v. 7, p. 11530–11543, 2022.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s. l.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

SINDHU, R.; BINOD, P.; MADHAVAN, A.; BEEVI, U. S.; MATHEW, A. K.; ABRAHAM, A.; PANDEY, A.; KUMAR, V. Molecular improvements in microbial alpha-amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 1740–1748, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.098>.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 260, p. 395–403, 2018.

SONG, J. E.; SONG, W. S.; YEO, S. Y.; KIM, H. R.; LEE, S. H. Covalent immobilization of enzyme on aminated woven poly (lactic acid) via ammonia plasma: evaluation of the optimum immobilization conditions. **Textile Research**

Journal, [s. l.], v. 87, n. 10, 2017.

SOUZA, L. T. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In*: RESENDE, Rodrigo R. (org.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. [S. l.]: Blucher, 2016. p. 529–568.

SOY, E.; PYESHKOVA, V.; ARKHYPOVA, V.; KHADRO, B.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; SACCO JR, A.; DZYADEVYCH, S. V.; KURÇ, B. A.

POTENTIALITIES OF ZEOLITES FOR IMMOBILIZATION OF ENZYMES IN CONDUCTOMETRIC BIOSENSORS. **Sensor Electronic and Microsystem Technologies**, [s. l.], v. 7, p. 28–35, 2014.

SU, C.-K.; YEN, S.-C.; LI, T.-W.; SUN, Y.-C. Enzyme-Immobilized 3D-Printed Reactors for Online Monitoring of Rat Brain Extracellular Glucose and Lactate. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 6265–6273, 2016.

SURIYA, J.; BHARATHIRAJA, S.; KRISHNAM, M.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Marine microbial amylases properties and applications. *In*: KIM, Se-Kwon; TOLDRÁ, Fidel (org.). **Advances in Food and Nutrition Research**. [S. l.: s. n.], 2016. p. 161–177.

SYED, F.; ALI, K.; ASAD, M. J.; FRAZ, M. G.; KHAN, Z.; IMRAN, M.; TAJ, R.; AHMAD, A. Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of glucoamylase from *Neurospora sitophila*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 162, p. 309–317, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.002>.

TANIGUCHI, H. Maltotetraose-Producing Amylase of *Bacillus circulans* F—2. *In*: BIOTECHNOLOGY OF AMYLODEXTRIN OLIGOSACCHARIDES. [S. l.: s. n.], 1991.

TARDIOLI, P. W.; VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, G. M.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 409–412, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.011>.

UNICA. **Acompanhamento quinzenal da safra na região Centro-Sul**. [S. l.: s. n.], 2024.

VAIDYA, L. B.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Biological metal organic framework (bio-MOF) of glucoamylase with enhanced stability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 193, n. December 2019, 2020.

VIHINEN, M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 24, p. 329–418, 1989.

VILLA, C. C.; VALENCIA, G. A.; CÓRDOBA, A. L.; ORTEGA-TORO, R.; AHMED, S.; GUTIÉRREZ, T. J. Zeolites for food applications: A review. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 46, p. 101577, 2022.

VUILLEUMIER, S. Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 733S-736S, 1993.

WAHAB, R. A.; ELIAS, N.; ABDULLAH, F.; GHOSHAL, S. K. **On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

WALKER, R. W.; DUMKE, K. A.; GORAN, M. I. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. **Nutrition**, [s. l.], v.

30, n. 7–8, p. 928–935, 2014.

WANG, D.; JIANG, W. Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 126, p. 1125–1132, 2019.

WHITE, J. S.; HOBBS, L. J.; FERNANDEZ, S. Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 39, p. 176–182, 2014.

WONG, J. K. H.; TAN, H. K.; LAU, S. Y.; YAP, P. S.; DANQUAH, M. K. Potential and challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater treatment: A review. **Journal of Enviromental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2019.

WU, C.; ZHOU, G.; JIANG, X.; MA, J.; ZHANG, H.; SONG, H. Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 953–959, 2012.

XU, Y.; WANG, D. Integrating starchy substrate into cellulosic ethanol production to boost ethanol titers and yields. **Applied Energy**, [s. l.], v. 195, p. 196–203, 2017. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.03.035>.

YAZGAN, I.; TURNER, E. G.; CRONMILLER, L. E.; TEPE, M.; OZTURK, TAYLAN, K.; ELIBOL, M. Modification of chitosan-bead support materials with L-lysine and L-asparagine for α -amylase immobilization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 41, n. 423–434, 2017.

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics,

properties, practical utility. **Catalysts**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, J.; DING, S.; GE, Y.; LI, Z. Enhanced removal of crystal violet in water using a facile-fabricated and environmental-friendly laccase immobilized composite membrane. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 98, p. 122–130, 2020.

ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. **ACS Catalysis**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 4503–4513, 2015.

ZHAO, B.; DENG, X.; HE, Y.; XIAO, P.; DHMEES, A. S.; CUI, X. Carbonic anhydrase immobilized on Zn(II)-geopolymer membrane for CO₂ capture.

Biochemical Engineering Journal, [s. l.], v. 208, p. 109364, 2024.

ZHAO, Y.-Z.; YU, W.-L.; ZHENG, H.; GUO, X.; GUO, N.; HU, T.; ZHONG, J. Y. PEGylation with the thiosuccinimido butylamine linker significantly increases the stability of haloalkane dehalogenase DhaA. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 254, p. 25–33, 2017.

ZHU, D.; WU, Q.; HUA, L. Industrial Enzymes. *In*: MOO-YOUNG, M. (org.).

Comprehensive Biotechnology (Third Edition). [S. l.]: Pergamon, 2019. p. 1–13.

ZHUANG, J.; ZHU, J.; CHEUNG, P. C. K.; LI, C. The physical and chemical interactions between starch and dietary fiber: Their impact on the physicochemical and nutritional properties of starch. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 149, p. 104566, 2024.

ZIERO, H. D.; BERNI, M. D.; BULLER, L. S.; VASCONCELOS, L. G.;

DORILEO, I. L.; MUDHOO, A.; FORSTER-CARNEIRO, T. Foresight for corn-to-ethanol mills in the Southern Brazilian Amazon: Energy, economic and environmental analysis. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s.

l.], v. 9, n. 6, p. 106740, 2021.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. **Molecules**, [*s. l.*], v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014.