RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 22/08/2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Paula Chequer Gouveia Mól

Purificação e imobilização de β-glicosidase do fungo *Thermoascus aurantiacus* em criogéis supermacroporosos

São José do Rio Preto
2021

Paula Chequer Gouveia Mól

Purificação e imobilização de β-glicosidase do fungo *Thermoascus aurantiacus* em criogéis supermacroporosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – 2016/17812-6
CAPES

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
Coorientador: Prof[a]. Dr[a]. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo e Prof. Dr. Luis Antonio Minim.

São José do Rio Preto
2021

M717p

Mól, Paula Chequer Gouveia

Purificação e imobilização de beta-glicosidase do fungo Thermoascus aurantiacus em criogéis supermacroporosos / Paula Chequer Gouveia Mól. -- São José do Rio Preto, 2021

111 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Roberto da Silva

Coorientador: Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo e Luis Antonio Minim

1. Beta-glicosidase. 2. Adsorção. 3. Criogel. 4. Troca iônica. 5. Interação hidrofóbica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Paula Chequer Gouveia Mól

Purificação e imobilização de β-glicosidase do fungo *Thermoascus aurantiacus* em criogéis supermacroporosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP–2016/17812-6
CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Del Bianchi
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Silvio Silverio da Silva
USP – Câmpus de Lorena

Profª. Drª. Luana Pereira de Moraes
UENF – Campos dos Goytacazes

São José do Rio Preto
22 de fevereiro de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas, por me permitir chegar até aqui e colocar sempre pessoas maravilhosas e do bem no meu caminho.

A Helena, minha princesinha que veio durante a minha trajetória no doutorado, pelo amor mais puro e sincero e que me dá forças para buscar as minhas realizações.

Aos meus pais, Marcus e Ana Cristina, e minhas irmãs, Daniela e Fernanda, pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os momentos

Ao Cezar, pelo amor, companheirismo e por sonhar sempre comigo.

Ao meu orientador, Prof. Roberto da Silva, pelos ensinamentos, conselhos e pela confiança depositada em mim até quando eu duvidava.

A Lizzy, minha querida corientadora e amiga, por toda paciência e por sempre me ensinar.

Ao meu outro corientador, Prof. Luis Antônio Minim, que sempre me incentivou e abriu as portas para mim.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia, pelo excelente convívio e ajuda durante o tempo em que estive em São José do Rio Preto.

A todo pessoal do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos, do DTA/UFV, pela torcida e por sempre me acolherem com carinho.

As professoras Vânia e Ana Carolina, que carinhosamente me ajudaram quando precisei.

Aos professores Ellen e Vanildo, pelos ensinamentos e sugestões que me deram durante o exame de qualificação.

A todos os demais professores e funcionários do DETA, que me deram condições de realizar este trabalho.

A todos os funcionários do IBILCE, que direta ou indiretamente nos auxiliam.

A FAPESP, pela bolsa concedida e por permitir a realização deste trabalho (Processo 2016/17812-6).

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

Aos meus amigos de Rio Preto, que tornaram a minha estadia lá muito mais divertida.

A Francilene, que cuidou e cuida da minha pequena com tanto zelo, me permitindo realizar este trabalho.

RESUMO

As β-glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β-(1,4) terminais, função essencial a muitos processos biológicos, sendo, portanto, de grande interesse para a bioquímica e a biotecnologia. Este trabalho teve como objetivo a obtenção e o posterior estudo da purificação e imobilização da β-glicosidase do fungo termofilico *Thermoascus aurantiacus* em suportes supermacroporosos de poliacrilamida produzidos em condições de congelamento (conhecidos como criogel). A enzima foi produzida por fermentação em estado sólido utilizando sabugo de milho como substrato. A primeira coluna utilizada (Capítulo II) foi obtida por modificação química do criogel pela introdução dos grupos iônicos 2-(dimetilamino)etil metacrilamida (DMAEMA). Os experimentos de adsorção foram realizados em diferentes valores de pH e os resultados de rendimento (%) e fator de purificação foram calculados e submetidos a ANOVA a 95% de significância. O pH teve efeito significativo ($p<0,05$) no rendimento, sendo que o melhor resultado foi obtido em pH 5,0 (82%). O fator de purificação não variou e os resultados foram considerados baixos uma que vez que a eluição utilizada foi isocrática (1,25-1,33). Entretanto, por meio de SDS-PAGE verificou-se que o extrato bruto foi parcialmente purificado, independentemente do valor de pH. A segunda coluna sintetizada (Capítulo III) foi obtida pela incorporação do aminoácido L-fenilalanina na superfície do criogel, e utilizada em testes de imobilização de β-glicosidase via interação hidrofóbica. A adsorção foi inicialmente estudada em função do pH e verificou-se que o maior fator de purificação foi obtido em pH 3,0. Em seguida, o efeito da temperatura e da forca iônica de diferentes soluções salinas na adsorção e consequentemente na atividade da enzima imobilizada foi avaliado. Além disso, a reutilização do biocatalisador foi investigada por sete ciclos consecutivos e não foi observado decréscimo na sua atividade específica. Nos dois casos, as colunas de criogéis produzidos foram caracterizadas em termos de suas propriedades morfológicas e hidrodinâmicas. Os resultados obtidos no trabalho mostram que os criogéis produzidos podem ser um potencial meio de separação e imobilização de proteínas.

Palavras-chave: β-glicosidase. Adsorção. Criogel. Interação hidrofóbica. Troca iônica

ABSTRACT

β-glucosidases are enzymes that hydrolyze terminal β-(1,4) glycosidic bonds, an essential function to many biological processes, that is of great interest in biochemistry and biotechnology. The purpose of this study encompasses the obtaining and posterior purification and immobilization studies of β-glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* in supermacroporous supports of polyacrylamide produced in freezing conditions (knows as cryogel). The enzyme was produced by solid state fermentation using corn cob as substrate. The first cryogel column used (Chapter II) was obtained by chemical modification of the cryogel by the introduction of the ionic groups 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate. The adsorption experiments were carried out in different pH conditions and the results of yield (%) and purification factors were calculated and submitted to ANOVA at 95% of significance level. The efficiency was considerably affected ($p<0.05$) by the pH and the best result was achieved at pH 5.0 (82%). Purification factors did not vary and the results were low since isocratic elution was performed (1.25-1.33). However, SDS-PAGE was also realized to investigate purity and it was verified that the crude extract was partially purified, regardless of the pH. The second column synthetized (Chapter III) was obtained by the incorporation of the aminoacid L-phenylalanine on the cryogel surface and was used in β-glucosidase immobilization tests via hydrophobic interaction. The adsorption was initially studied as a function of the pH and the highest purification factor was found at pH 3.0. Then, the effect of the temperature and ionic strength of different saline solutions on adsorption and consequently on the activity of the immobilized enzyme was evaluated. In addition, the reuse of the biocatalyst was investigated for seven consecutive cycles and no decrease on its the specific activity was observed. In both cases, the cryogel columns produced were characterized in terms of their morphological and hydrodynamic properties. The results obtained in this work show that the cryogels produced can be potential supports of protein separation and immobilization.

Keywords: β-glucosidase. Adsorption. Cryogel. Ion Exchange. Hydrophobic interaction

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

CAPÍTULO III

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO II

CAPÍTULO III

LISTA DE ABREVIATURAS

***p*NPG**	*p*-nitrophenyl-β—D-glucopyranoside
DMAEMA	2-(dimethylamino)ethyl methacrylate
Aam	Acrylamide
AGE	Allyl glycidyl ether
APS	Ammonium persulfate
ANOVA	Analysis of variance
ATR	Attenuated total reflectance
CV	Column volume
DSC	Differential scanning calorimeter
FTIR	Fourier transform infrared spectrophotometry
HETP	Height equivalente to theoretical plate
TEMED	N,N,N´,N´-tetramethyl-ethylenediamine
MAAm	N,N´-methylene-bis-acrylamide
UV	Ultraviolet
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

LISTA DE SÍMBOLOS

U	Activity unit
U/mg	Activity unit per milligram
C	Celsius degree
cm	Centimeter
g	gram
X g	Gravitational force unit
h	Hour
kg	Kilogram
L	Liter
m	Meter
min	Minute
µL	Microliter
µm	Micrometer
µm	Micromol
mg	Milligram
mM	Millimeter
m	Minute
nm	Nanometer
Pa	Pascal
%	Percentage
S	Second
V	Volt
v/v	Volume – volume ratio
w/v	Weight – volume ratio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇAO GERAL

As β-glicosidases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e que são responsáveis pela hidrólise de ligações β-glicosídicas em dissacarídeos e oligossacarídeos, liberando moléculas de glicose. As β-glicosidases desempenham papéis em diversos estágios biológicos e por isso são consideradas enzimas biologicamente e industrialmente importantes. Dentre suas aplicações biotecnológicas, a que mais se destaca é a degradação da biomassa para produção de etanol de segunda geração. Entretanto, aplicações nas áreas farmacêuticas, de alimentos e de bebidas vêm cada vez mais recebendo atenção, tanto em pesquisas quanto em aplicações tecnológicas.

Em processos industriais, a utilização de enzimas que apresentem termoestabilidade é desejada uma vez que grande parte destes processos ocorrem em altas temperaturas devido às suas vantagens, tais como altas taxas reacionais, diminuição da viscosidade dos fluidos, aumento da solubilidade de substratos e minimização dos riscos de contaminação. Dessa forma, o estudo e a obtenção de enzimas termoestáveis são importantes na enzimologia aplicada. Enzimas estáveis em altas temperaturas são geralmente secretadas por microrganismos termofilicos, como o fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus*, o qual cresce bem em biomassa lignocelulósica proveniente de resíduos como bagaço de cana, farelo de trigo e sabugo de milho. A fermentação em estado sólido é um processo fermentativo particularmente adequado para substratos sólidos, uma vez que apresenta vantagens como alta produtividade, estabilidade dos produtos finais, baixos consumos de água e energia, entre outros.

Os processos catalisados por enzimas constituem uma alternativa aos processos químicos convencionais, entretanto, as enzimas ainda são mais onerosas, principalmente em função do grau de pureza desejado e das várias etapas de purificação requeridas. Assim, o desenvolvimento de novos materiais e técnicas é necessário visando a diminuição dos custos finais de obtenção. Dentre as etapas de purificação, as separações cromatográficas são bastante utilizadas devido à eficiência e à pureza obtida.

A imobilização de enzimas é uma estratégia onde, teoricamente, a enzima fica retida em um suporte, seja por interações químicas de baixa energia ou por ligação covalente, para ser utilizada por tempo indefinido. A imobilização apresenta muitas vantagens como reutilização do biocatalisador, diminuindo os custos de aquisição de novos, facilidade de separação dos produtos e aumento da estabilidade química e térmica das enzimas. Além disso, o processo de imobilização possibilita a aplicação do sistema em processos contínuos ou semi-contínuos.

Porém, o método de imobilização e o tipo de interação entre o suporte e a enzima afetam diretamente a estabilidade e a atividade catalítica recuperada.

A escolha do material a ser utilizado como suporte de separação e ou imobilização é um dos fatores determinantes na eficiência do processo. Os criogéis são géis poliméricos produzidos em condições de congelamento e têm sido considerados promissores na separação de biomoléculas. Suas propriedades como elevada porosidade e baixa resistência ao escoamento, permitem o processamento de extratos brutos e meios viscosos e ou pouco clarificados, o que pode contribuir para a diminuição do número de etapas de *downstream*. Além disso, são materiais quimicamente estáveis, de fácil preparo e baixo custo e, dessa forma, têm sido testados na purificação e imobilização de uma grande variedade de enzimas com resultados satisfatórios. Contudo, estudos referentes ao preparo dos suportes e da sua reutilização ainda são necessários para ampliar o conhecimento acerca destes materiais. Além disso, enzimas diferentes apresentam estruturas moleculares diferentes, resultado também, em interações diferentes com os suportes.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a utilização de criogéis supermacroporosos, baseando-se tanto nas técnicas de adsorção por troca iônica quanto na de interação hidrofóbica, como um possível protocolo de purificação e imobilização da enzima β-glicosidase.

5. CONCLUSÃO GERAL

A β-glicosidase foi produzida por fermentação em estado sólido, objetivando-se a utilização de subprodutos geralmente descartados.

Os criogéis utilizados como suporte foram sintetizados no laboratório e tiveram suas principais características morfológicas e hidrodinâmicas avaliadas, e os resultados experimentais obtidos indicaram a sua adequabilidade para utilização em ensaios de purificação e imobilização da β-glicosidase produzida.

A avaliação geral dos resultados obtidos mostrou que os criogéis produzidos possuem potencial de aplicação na purificação e imobilização da β-glicosidase, uma vez que a enzima manteve sua atividade catalítica após a etapa de adsorção, o que é essencial para a continuação dos estudos destes processos. Por meio da cromatografia de troca iônica, foi possível observar purificação parcial do extrato bruto utilizado.

Entretanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos visando otimizar a interação da enzima com o suporte e consequentemente melhorar parâmetros como eficiência de separação, eficiência de imobilização, fator de purificação, entre outros.

Além disso, por meio da revisão de literatura realizada, foi possível concluir que embora grande parte dos resultados obtidos com a imobilização de β-glucosidase sejam significativos, o número de enzimas imobilizadas realmente implantando no mercado ainda é baixo, o que requer constantemente a pesquisa pelo método, tipo de suporte e fonte de enzima que seja o mais adequado possível para a aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

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**, 2020, In press.

AGRAWAL, R.; VERMA, A. K.; SATLEWAL, A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable β-glucosidase for improving the sugarcane juice properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 472-482, 2016.

AHMED, A.; NASIM, F. u-H.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β-glucosidase: Sources, production and applications. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v. 5, p. 31-46, 2017(a).

AHMED, A.; ASLAM, M.; ASHRAF, M.; NASIM, F. u-H.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β-Glucosidases: Screening, Characterization, Cloning and Applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 57-73, 2017(b).

ANDRABI, S. M.; TIWARI, J.; SINGH, S.; SARKAR, J.; VERMA, N.; KUMAR, A. Supermacroporous hybrid polymer cryogels for efficient removal of metallic contaminants and microbes from water. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, n. 20, p. 636-645, 2016.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; LOZINSKY, V. I.; FEXBY, S.; BULLOW, L.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Chromatographic of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v. 977, p. 27-38, 2002.

BAJPAI, A. K.; SAINI, R. Preparation and characterization of novel biocompatible cryogels of poly (vinyl alcohol) and egg-albumin and their water sorption study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 49-61, 2006.

BAK, J.; LEE, T.; SEO, E.; LEE, Y.; JEONG, H.M.; KIM, B-S.; LEE, H. Thermoresponsive graphene nanosheets by functionalization with polymer brushes. **Polymer**, v. 53, n. 2, p. 316-323, 2012.

BAKHSPOUR, M.; IDIL, N.; PERÇIN, I.; DENIZLI, A. Biomedical applications of polymeric cryogels. **Applied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 553, 2019.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007.

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**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015.

BEDINO, S.; TESTORE, G.; OBERT, F. Comparative study of glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miehe. Purification and characterization of intracellular β-glucosidase. **Italian Journal of Biochemistry**, v. 34, p. 341-355, 1985.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 25-58, 1994.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.

BORGES, D. G.; JUNIOR, A. B.; FARINAS, C. S.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized β-glucosidase. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 206-213, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 15-31, 2013.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozymes and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-181, 2001.

BUCHMEISER, M. R. Polymeric monolithic materials: Synthesis, properties, functionalization and applications. **Polymer**, v. 48, p. 2187-2198, 2007.

CAIRNS, J. R. K; ESEN, A. β-Glucosidases**. Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n.20, 3389-3405, 2010.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): and expert resource for glycogenomics**. Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-D238, 2009.

CARVALHO, B. M. A; CARVALHO, L. M.; SILVA JR, W. F.; MINIM, L. A.; SOARES, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; DA SILVA, S. L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with cooper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

CAZY. Carbohydrate-Active enZYmes. Available in <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> Access in 01/17/2021.

ÇELIK, A.; DINCER, A.; AYDEMIR, T. Characterization of β-glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 406-414, 2016.

CHANG, Y. K.; CHASE, H. A. Development of operating conditions for protein purification using expanded techniques: The effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 512-546, 1996.

CHANG, M-Y.; JUANG, R-S. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β-glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 1, p. 93-98, 2007.

CHANG, J.; LEE, Y-S.; FANG, S-J.; PARK, D-J.; CHOI, Y-L. Hydrolysis of isoflavone glycoside by immobilization of β-glucosidase on a chitosan-carbon in two-phase system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 465-470, 2013.

CHANG, F.; XUE, S.; XIE, X.; FANG, W.; FANG, Z.; XIAO, Y. Carbohydrate-binding module assisted purification and immobilization of β-glucosidase onto cellulose and application in hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 2, p. 185-191, 2018.

CHEN, K.; LO, Y-C.; LIU, C-W.; YU, R-C.; CHOU, C-C.; CHENG, K-C. Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobilizer for β-glucosidase. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 79-85, 2013.

CHEN, T.; YANG, W.; GUO, Y.; YUAN, R.; XU, L.; YAN, Y. Enhancing catalytic performance of β-glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 63, p. 50-57, 2014.

CHERIAN, E.; DHARMENDIRAKUMAR, M.; BASKAR, G. Immobilization of cellulase onto MnO_2 nanoparticles for bioethanol production by enhanced hydrolysis of agricultural waste. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 36, p. 1223-1229, 2015.

CHO, E. J.; JUNG, S.; KIM, H. J.; LEE, Y. G.; NAM, K. C.; LEE, H-J.; BAE, H-J. Co-immobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silicananoparticles for the degradation of cellulose. **Chemical Communications**, v. 48, p. 886-888, 2012.

CONVELY, R.T. **Thermal stability of polymers**. New York: Marcel Dekker, 1970.

COUTINHO, T. C.; ROJAS, M. J.; TARDIOLI, P. W.; PARIS, E. C.; FARINAS, C. S. Nanoimmobilization of β-glucosidase onto hydroxyapatite. **International Journal of Macromolecules**, v. 119, p. 1042-1051, 2018.

DA SILVA, R.; LAGO, E. V.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase in solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

DA SILVA, T. M.; PESSELA, B. C.; DA SILVA, J. C. R.; LIMA, M. S.; JORGE, J. A.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Immobilization and high stability of an extracellular β-glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 95-100, 2014.

DAS, A.; PAUL, T.; GHOSH, P.; HALDER, S. K.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Kinetic study of a glucose tolerant β-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6 n. 1, p. 53-61, 2014.

DAVE, B. R.; SUDHIR, A. P.; PARMAR, P.; PATHAK, S.; RAYKUNDALIYA, D. P.; SUBRAMANIAN, R. B. Enhancement of cellulase activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*; optimisation of statistical design response surface methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 2, n. 2., p. 108-115, 2013.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structure and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

DE ALMEIDA, R. F.; NAVES, E. R.; DA MOTA, R. P. Soil quality: enzymatic activity of soil β-glucosidase. **Global Journal of Agricultural Research and Reviews**, v. 3, 146, n. 2, p. 150, 2015.

DE ANDRADES, D.; GRAEBIN, N. G.; KADOWAKI, M. K.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Immobilization and stabilization of different β-glucosidase using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 672-678, 2019.

DE OLIVEIRA, A. C. F.; NEVES, I. C. O.; SARAIVA, J. A. M.; DE CARVALHO, M. F. F.; BATISTA, G. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; DE RESENDE, J. V. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 11, p. 2012-2024, 2019.

DENG, X.; HE, T.; LI, J.; DUAN, H-L.; ZHANG, Z-Q. Enhanced biochemical characteristics of β‐glucosidase via adsorption and cross‐linked enzyme aggregate for rapid cellobiose hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 43, p. 2209–2217, 2020.

EROL, K.; CEBECI, B. K.; KOSE, K.; KOSE, D. A., 2019. Effect of immobilization on the activity of catalase carried by poly(HEMA-GMA) cryogels. **International Journal of Biological** Macromolecules, v. 123, p. 738-743, 2019.

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. Cryogels tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 24-35, 2014

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better catalysts. **Enzyme Research**, v. 2010: 862537, 2010.

FERNER, M. J.; MULLER, G.; SCHUMANN, C.; KAMPEIS, P.; ULBER, R.; RADDATZ, H. Immobilisation of glycosidases from commercial preparation on magnetic beads. Part 1. Characterisation of immobilised glycosidases with a particular emphasis on β-glucosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 123, p. 23-28, 2016.

FERNER, M. J.; MULLER, G.; SCHUMANN, C.; SHAIKH, Y.; KAMPEIS, P.; ULBER, R.; RADDATZ, H. Immobilisation of glycosidases from commercial preparation on magnetic beads. Part 1. Aroma enhancement in wine using immobilised glycosidases. **Vitis**, v. 57, p. 129-136, 2018.

FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F.; GONÇALVES, G. R. F.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Alternatives for characterizing macroporous polyacrylamide monolithic ion-exchange columns. **Polymer Engineering and Science**, v. 58, p. 1717-1725, 2018.

FURUSAWA, T.; SUZUKI, M.; SMITH, J.M. Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse technique. **Catalysis Reviews**, v. 31, n. 43-76, 1976.

GEBLER, J. C.; GILKES, N. R.; CLAEYSSENS, M.; WILSON, D. B. BÉGUIN, P.; WAKARCHUK, W. W.; KILBURN, D. G. MILLER JR., R. C.; WARREN, R. A.; WITHERS, S. G. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 18, p. 12559-12561, 1992.

GERONIMO, L.; PAYNE, C. M.; SANDGREN, M. Hydrolysis and transglycosylation transition states of glycoside hydrolase family 3 β-glucosidases differ in charge and puckering conformation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 41, p. 9452-9459, 2018.

GÓMEZ, J. M.; ROMERO, M. D.; FERNÁNDEZ, T. M. Immobilization of β-glucosidase on carbon nanotubes. **Catalysis Letters**, v. 101, p. 275-278, 2005.

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; VERÍSSIMO, L. A. A.; FONTAN, R. C. I. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1068-1069, p. 71-77, 2017.

GONZÁLEZ-POMBO, P.; FARINA, L.; CARRAU, F.; BATISTA-VIEIRA, F.; BRENA, B. M. A novel extracelular β-glucosidase from *Issatchenkia terrícola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 385-389, 2011.

GRADE, L. C.; MOREIRA, A. A.; VAREA, G. d. S.; MANDARINO, J. M. G.; SILVA, J. B. d.; IDA, E. I.; RIBEIRO, M. L. L. Soybean β-glucosidase immobilisated on chitosan beads and its application in soy drink increase the aglycones. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 766-773, 2014.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes market size, share & trends analysis report**. Available in: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Access in: 12/06/2020.

GUIOCHON, G. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, p. 6-49, 2006.

GUO, K. W. Immobilization methods of enzymes: Part I. *In:* SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, N.; RAMTEKE, P. W.; MISHRA, P. K. **Approaches to enhance industrial production of fungal cellulases**. Gewerbestrasse: Springer Nature Switzerland, 2019, pp 127-136.

HACKEMANN, E.; HASSE, H. Influence of mixed electrolytes and pH on adsorption of bovine serum albumin in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1521, p. 73-39, 2017.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemistry Journal**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HIXON, K. R.; LU, T.; SELL, S. A. A comprehensive review of cryogels and their role in tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 62, p. 29-41, 2017.

HU, S.; WANG, D.; HONG, J. A simple method for beta-glucosidase immobilization and its application in soybean isoflavone glycosides hydrolysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 39-48, 2018.

IRFAN, M.; GHAZANFAR, M.; REHMAN, A. U.; SIDDIQUE, A. Strategies to reuse cellulase: immobilization of enzymes (Part II). *In*: SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, N.; RAMTEKE, P. W.; MISHRA, P. K. **Approaches to enhance industrial production of fungal cellulases**. Gewerbestrasse: Springer Nature Switzerland, 2019, pp 137-148.

JAIN, A.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A. K. Structural, morphological and thermal characterization of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylonitrile) (P (HEMA-co-AN)) cryogels: evaluation of water sorption potential and cytotoxicity. **Journal of Polymer Research**, v. 111, p.1-14, 2017.

JANSON, J. C.; RYDÉN, L. (2011). **Protein purification: principles, high-resolution methods and applications**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.

JENG, W-Y., WANG, N-C.; LIN, M-H.; LIN, C-T.; LIAW, Y-C.; CHANG, W-J.; LIU, C-I.; LIANG, P-H.; WANG, A. H-J. Structural and functional analysis of three β-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. **Journal of Structural Biology**, v. 173, n.1., p. 46-56, 2011.

JUNG, Y. R.; SHIN, H. Y.; SONG, Y. S.; KIM, S. B.; KIM, S. W. Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of β-glucosidase with cellobiose and glucose. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 702-706, 2012.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, D. B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungi *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, 1099-1104, 2003.

KARAGULYAN, H. K.; GASPARYAN, V. K.; DECKER, S. R. Immobilization of fungal beta-glucosidase on silica gel and kaolin carriers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 39-47, 2008.

KARKEHABADI, S.; HELMICH, K. E.; KAPER, T.; HANSSON, H.; MIKKELSEN, N-E.; GUDMUNDSSON, M.; PIENS, K.; FUJDALA, M.; BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D.; PHILLIPS JR., G. N.; SANDGREEN, M. Biochemical characterization and crystal strucutures of a fungal family 3 β-glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 31624-31637, 2014.

KARKEHABADI, S.; HANSSON, H.; MIKKELSEN, N. E.; KIM, S.; KAPER, T.; SANDGREN, M.; GUDMUNDSSON, M. Structural studies of a glycoside hydrolase family 3 β-glucosidase from the model fungus *Neurospora crassa*. **Acta Crystallographica Section F**, v. 74, n. 12, p. 787-796, 2018.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β-glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28-38, 2012.

KRISCH, J.; TAKÓ, M.; PAPP, T.; VÁGVOLGYI, C. Characteristics and potential use of β-glucosidases from Zygomycetes. *In*: MENDEZ-VILAS, A. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010, p .891-896.

LEE, H-L.; CHANG, C-K.; JENG, W-Y.; WANG, A. H-J.; LIANG, P-H. Mutations n the substrate entrance region of β-glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability. **Protein Engineering Desing & Selection**, v. 25, n. 11, p. 733-740, 2012.

LEITE, R. S. R.; GOMES, E., DA SILVA, R. Characterization and comparison of termo-stability of purified β-glucosidase from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1101-1106, 2007.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E., DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β-glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LENHOFF, A. M. Ion-exchange chromatography of proteins: the inside story. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3559-3567, 2016.

LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. New York: John Wiley & Sons, 1999.

LIANG, W.; CAO, X. Preparation of a pH-sensitive polyacrylate amphiphilic copolymer and its application in cellulase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 140-146, 2012.

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

LIN, F. Y.; CHEN, C. S.; CHEN, W. F.; YAMAMOTO, S. Microcalorimetric studies of the interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI): effects of concentration, pH value, and temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 192, p. 281-289, 2001.

LITZINGER, S.; FISCHER, S.; POLZER, P.; DIEDERICHS, K.; WELTE, W.; MAYER, C. Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N-acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35675-35684, 2010.

LIU, W.; HONG J.; BEVAN, D.R; ZHANG, Y. H. P. Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1087-1094, 2009.

LIU, D-M.; CHEN, J.; SHI, Y-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzyme immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.

LOZINSKY, V. I.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, p. 163-188, 2001.

LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. Trends in Biotechnology, v. 21, p. 445-450, 2003.

MARASOVIC, M.; MARASOVIC, T.; MILOS, M. Robust nonlinear regression in enzyme kinetic parameters estimation. **Journal of Chemistry**, v. 2017, n. 2., p. 1-12, 2017.

MELANDER, W.; HORVÁTH, C. Salt effect on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 188, n.1, p. 200-215, 1997.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. d. L. C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalyst in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, p. 109-115, 2011.

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; ELLER; M. R.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; MINIM, L. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and capture of β-glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, London, v. 82, p. 75-83, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.029.

MONTEIRO, L.M.O.; PEREIRA, M.G.; VICI, A.C.; HEINEN, P.R.; BUCKERIDGEM, M.S.; POLIZELI, M.L.T.M. Efficient hydrolysis of wine and grape juice anthocyanins by *Malbranchea pulchella* β-glucosidase immobilized on MANAE-agarose and ConA-Sepharose supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 18, p. 313-324, 2019.

MURRAY, P.; ARO, N.; COLLINS, C.; GRASSICK, A.; PENTILLÃ, M.; SALOHEIMO, M.; TUOHY, M. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression and Purification**, v. 38, n. 2, p. 248-257, 2004.

NASCIMENTO, I.S.; SILVA, D.L.; PEREIRA, T.B.; GONÇALVES, G.R.F.; VERÍSSIMO, L.A.A.; VELOSO, C.M.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Capture of lectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds in a single step using a supermacroporous ion-exchange cryogel. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 17, n. 177-187, 2018.

NASEER, S.; OUYANG, J.; CHEN, X.; PU, S.; GUO, Y.; ZHANG, X.; LI, D.; YANG, C. Immobilization of β-glucosidase by self-catalysis and compared to crosslinking with glutaraldehyde. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, n. 1490-1495, 2020.

NEVES, I.C.O.; RODRIGUES, A.A.; VALENTIM, T.T.; MEIRA, A.C.F.O.; SILVA, S.H.; VERÍSSIMO, L.A.A. DE RESENDE, J.V. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. **Journal of Chromatography B**, v. 1161, p. 122435, 2020.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An overview of techniques in enzyme immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157-163, 2017.

NIJIKKEN, Y.; TSUKADA, T.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; WAKAGI, T.; SHOUN, H.; FUSHINOBU, S. Crystal structure of intracellular family 1 β-glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete crysosporium*. **FEBS Letters**, v. 581, p. 7, p. 1514-1520, 2007.

NISHIDA, V.S.; DE OLIVEIRA, R.F.; BRUGNARI, T.; CORREA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; CASTOLDI, R.; DE SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Immobilization of Aspergillus awamori β-glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1206-1213, 2018.

NIU, K.; LIU, Z.; FENG, Y.; GAO, T.; WANG, Z.; ZHANG, P.; DU, Z.; GAO, D.; FANG, X. A novel strategy for efficient disaccharides synthesis from glucose by β-glucosidase. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, p. 45, 2020.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Optimisation of β-glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gel. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 105-111, 1998.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two β-glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiologica**, v. 353, p. 117-127, 2003.

PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDERBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v. 353, n. 1, p. 117-127, 2001.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M., STAHLBERG, J.; BECKHMAN, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PETRENKO, Y. A.; IVANOV, R. V.; LOZINSKY, V. I.; PETRENKO, A. Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 150, p. 543-546, 2001.

PHADUNGCHAROEN, N.; WINOTAPUN, W.; KHOMNIVAWANIT, A.; KRATAICHAN, F.; ROJANARATA, T. Facile and green fabrication of biocatalytic chitosan beads by one-step genipin-mediated β-glucosidase immobilization for production of bioactive genistein. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 14, p. 100187, 2019.

PINOTTI, L. M.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORREGO, A. H.; GUISAN, J. M.; PESSELA, B. C. Stabilization of glycosylated β-glucosidase by intramolecular crosslinking between oxidized glycosidic chains and lysine residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 325–337, 2020.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 543-551, 2008.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 143-159, 2001.

RAJAN, S. S.; YANG, X.; COLLART, F.; YIP, V. L. Y.; WITHERS, S. G.; VARROT, A.; THOMPSON, J.; DAVIES, G. J.; ANDERSON, W.F. Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD^+/Mn^{2+} - dependent phospho-α-glucosidase from *Bacillus subtilis*. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1619-1629, 2004.

SAMAYAM, I. P; HANSON, B. L.; LANGAN, P.; SCHALL, C. A. Ionic-liquid induced changes in cellulose structure associated with enhanced biomass hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 3091-3098, 2011.

SANNINO, F.; CONSTANTINI, A.; RUFFO, F.; ARONNE, A.; VENEZIA, V.; CALIFANO, V. Covalent immobilization of β-glucosidase into mesoporous sílica nanoparticles from anhydrous acetone enhances its catalytic performance. **Nanomaterials**, v. 10, p. 108, 2020.

SANTOS, C. A.; ZANPHORLIIN, L. M.; CRUCELLO, A.; TONOLI, C. C. C.; RULLER, R.; HORTA, M. A. C.; MURAKAMI, M. T; DE SOUZA, A. P. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH_1 β—glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 71, 2016.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategy to develop enzyme biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012.

SAVINA, I. N.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Anion-exchange supermacroporous monolithic matrices with grafted polymer brushes of N,N-dimethylaminoethyl-methacrylate. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 2, p. 199-205, 2005.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. **Protein structure: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1989, p. 1-19.

SEGATO, F.; DAMÁSIO, A. R. L.; DE LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A.; Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588-613, 2014.

SILVA, F. A. B.; FLORENZANO, F. H.; PISSETTI, F. L. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network based on poly(dimethylsiloxane) and poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]. **Journal of Sol-gel Science and Technology**, v. 72, p. 227-234, 2014.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β-glucosidase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; PANDEY, A. The industrial production of enzymes. In: SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. **Industrial Biotechnology: sustainable growth and economic success**. New York: John Wiley & Sons, 2010, p. 207-226.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R.R. **Biotecnologia aplicada à agroindústria**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2017, p. 529-568.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; GRECO, E.; MANENTI, I.; PIFFERI, P. G. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilized by inclusion in chitosan gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 80-89, 2002.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; KAUSAR, M. A.; SAEED, M.; GUPTA, V. K.; SINGH, R.; RAMTEKE, P. W. Advances in nanomaterials induced biohydrogen production using waste biomass. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123094, 2020.

STRAATHOF, A. J. J. The proportion of downstream costs in fermentative production process. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**. Oxford: Elsevier, 2011, p. 811-814.

SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization of β-glucosidase and its aroma increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 83-89, 2010.

SUI, Y.; CUI, Y.; XIA, G.; PENG, X.; YUAN, G.; SUN, G. A facile route to preparation of immobilized cellulase on polyurea microspheres for improving catalytic activity and stability. **Process Biochemistry**, v. 87, p. 73-82, 2019.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8-19, 2012.

TAN, I. S.; LEE, K. T. Immobilization of β-glucosidase from *Aspergillus niger* on k-carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 386-394, 2015.

TRIBOLO, S.; BERRIN, J-G.; KROON, P.A.; CZJZEK, M.; JUGE, N. The crystal structure of human cytosolic beta-glucosidase unravels the substrate aglycone specificity of a family 1 glycoside hydrolase. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, n. 5, p. 964-975, 2007.

TSAI, C-T.; MEYER, A. S. Enzymatic celulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of β-glucosidase immobilized in calcium alginate. **Molecules**, v. 19, p. 19390-19406, 2014.

TU, M.; ZHANG, X.; KURABI, A.; GILKES, N.; MABEE, W.; SADDLER, J. Immobilization of β-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 151–156, 2006.

TÜRKMEN, D.; DENIZLI, A. PHEMA based composite cryogels with loaded hydrophobic beads for lysozyme purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 859-865, 2014.

TURU, I. C.; TURKCAN-KAYHAN, C.; KAZAN, A.; YILDIZ-OZTURK, E.; AKGOL, S.; YESIL-CELIKTAS, O. Synthesis and characterization of cryogel structures for isolation of EPSs from *Botryococcus braunii*. **Carbohydrate Polymer**, v. 150, p. 378-384, 2016.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 26-33, 2012.

UYGUN, M. Dye-attached cryogels for reversible alcohol dehydrogenase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 959, p. 42-48, 2014.

VAZ, R. P.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 127-135, 2016.

VENEZIA, V.; SANNINO, F.; COSTANTINI, A.; SILVESTRI, B.; CIMINO, S.; CALIFANO, V. Mesoporous sílica naoparticles for β-glucosidase immobilization by templating with a green material: tannic acid. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 302, n. 110203, 2020.

VERÍSSIMO, L. A. A.; MÓL, P. C. G., SOARES, W. C. L.; MINIM, V. P. R.; HESPANHOL, M. C., MINIM, L. A. Development of a bioreactor based on lipase entrapped in a monolithic cryogel for esterification and interesterification reactions. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 17, n. 177-187, 2018.

VERMA, M. L.; CHAUDHARY, R.; TSUZUKI, T.; BARROW, C. J.; PURI, M. Immobilization of β-glucosidase on magnetic nanoparticles improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 2-6, 2013.

VERMA, M. L.; PURI, M.; BARROW, C. J. Recents trends in nanomaterials immobilized enzyme for biofuel production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 108-119, 2016.

VIEIRA, A. P.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; DE MELO, J. C. P.; SILVA FILHO, E. C.; AIROLDI, C. Cooper sorption from aqueous solution and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp, **Chemical Engineering Journal**, v. 161, n. 1-2, 99-105, 2010.

VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, G. M.; TARDIOLI, P. W.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M. β-glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1-2, p. 47-53, 2011.

VIJAYABASKAR, M. S.; VISHVESHWARA, S. Insights into the fold organization of TIM barrel from interaction energy based structure networks. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 5, p. e1002505, 2012.

WAHAB, R. A.; ELIAS, W.; ABDULLAH, F.; GHOSHAL, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, p. 104612, 2020.

WATANABE, A.; SUZUKI, M.; UJIIE, S.; GOMI, K. Purification and enzymatic characterization of a novel β-1,6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, v. 3, p. 259-264, 2016.

WEI, C.; ZHOU, Y.; ZHUANG, W.; LI, G.; JIANG, M.; ZHANG, H. Improving the performance of β-glucosidase using a microreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n.4, p. 377-384, 2018.

WIERENGA, R. K. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. **FEBS Letters**, v. 492, n. 3, p. 193-198, 2001.

WOOD, T. M.; BHAT, K. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

XIA, Y.; YANG, L.; XIA, L. High-level production of a fungal β-glucosidase with application potentials in the cost-effective production of Trichoderma reesei cellulase. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 55-60, 2018.

XIN, D.; YANG, M.; CHEN, X.; ZHANG, J. The access of *Trichoderma reesei* 6A to cellulose is blocked by isolated hemicelluloses and their derivatives in biomass hydrolysis. **RSC Advances**, v. 6, p. 73859, 2016.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 6701-6708, 2006(a).

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 1, p. 103-110, 2006(b).

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of suppot materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, p. 92, 2018.

ZHANG, X.; LIU, W.; CHEN, Y.; GONG, A.; CHEN, C.; XI, F. Self-condensing vinyl polymerization of acrylamide. **Polymer Bulletin**, v. 43, p. 39-34, 1999.

ZHANG, J.; WANG, D.; PAN, J.; WANG, J.; ZHAO, H.; LI, Q.; ZHOU, X. Efficient resveratrol production by immobilized β-glucosidase on cross-linked chitosan microsphere modified by L-lysine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 29-34, 2014.

ZHENG, P.; WANG, J.; LU, C.; XU, Y.; SUN, Y. Immobilized β-glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 683-687, 2013.

ZHOU, Z.; JU, X.; ZHOU, M.; XU, X.; FU, J.; LI, L. An enhanced ionic liquid-tolerant immobilized cellulase system via hydrogel microsphere for improving in situ saccharification of biomass. **Bioresource Technology**, v. 294, p. 122146, 2019.