

ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE *T. REESEI* NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA SOB EFEITOS DA SONICAÇÃO DIRETA E INDIRETA

J. M. GASPAROTTO¹; L. B. WERLE²; M. A. MAINARDI²; M. A. MAZUTTI³; S. L. JAHN³

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós graduação em Engenharia de Química

²Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Engenharia Química

³Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: jmgasparotto@gmail.com

RESUMO – Neste trabalho foi estudada a hidrólise enzimática de bagaço de cana não tratado sob sonicação direta e indireta utilizando enzimas celulolíticas de *T. reesei* produzidos por fermentação em estado sólido. Hidrólises foram realizadas utilizando um sistema de sonda ultrassônica de alta intensidade de 400 W e 24 kHz. As variáveis investigadas foram amplitude de oscilação, o ciclo e concentração de enzima. Os rendimentos máximos de hidrólise foram 31.3 g.kg⁻¹ e 60.6 g.kg⁻¹ sob sonicação direta e indireta, respectivamente. A condição otimizada obtida para a hidrólise de sonicação indireta foi a concentrações de enzima maior que 209,5 µl.g⁻¹, sob irradiação de ultrassom contínua e amplitude de oscilação de 20%, que corresponde a uma fonte de ultrassom de 60 W.cm⁻². A irradiação ultrassom indireta demonstrou ser uma tecnologia mais promissora para ser utilizado em reação enzimática devido a seus efeitos mais positivos sobre o rendimento de hidrólise.

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento do custo de combustíveis fósseis, aliado à grande geração de gases causadores do efeito estufa gerado pela queima dos mesmos vem causando uma grande preocupação mundial e gera uma necessidade do desenvolvimento de biocombustíveis mais baratos e menos nocivos ao meio ambiente. Uma alternativa que vem sendo amplamente estudada nos últimos anos é a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica, especialmente àquelas provenientes de resíduos agroindustriais, extremamente abundantes em países com larga extensão territorial como é o caso do Brasil (Soccol *et al.*, 2010). As matérias primas lignocelulósicas são bastante promissoras, pois são naturais, abundantes e renováveis, e o etanol produzido a partir desses materiais pode ser uma potencial fonte de combustíveis em longo prazo (Goh *et al.*, 2010).

Dentre as possíveis rotas tecnológicas para a produção de etanol de segunda geração, proveniente de resíduos lignocelulósicos, a rota enzimática vem ganhando uma maior atenção da comunidade acadêmica devido a suas condições mais brandas de operação e a mínima formação de subprodutos (Soccol *et al.*, 2010). Apesar dos esforços, a produção comercial de etanol lignocelulósicos em larga escala ainda não é uma realidade, principalmente devido aos altos custos inerentes das enzimas celulolíticas usadas na etapa inicial de hidrólise da matéria

prima (Cardona *et al.*, 2010).

A produção de celulases por fermentação em estado sólido de resíduos lignocelulósicos e a subsequente aplicação do extrato enzimático cru produzido na hidrólise de biomassa pode ser uma alternativa para tornar o processo de sacarificação menos dispendioso (Jorgensen *et al.*, 2010). Taxas aceitáveis de hidrólise enzimática, porém, vêm sendo obtidas somente após um pré-tratamento da biomassa, o que torna o substrato mais suscetível ao ataque das enzimas (Alvira *et al.*, 2010). Muitos autores têm demonstrado que a sacarificação da celulose pode ser melhorada eficientemente com a utilização de pré-tratamento com ultrassom (Benazzi *et al.*, 2013; Bussemake *et al.*, 2013; Alvira *et al.*, 2010). Mais recentemente, o efeito do ultrassom no poder catalítico de enzimas (Szabó e Csiszár, 2013; Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013; Leães *et al.*, 2013a) e na eficiência de hidrólise (Benazzi *et al.*, 2013; Leães *et al.*, 2013b) vem sendo estudados.

Os efeitos do ultrassom podem ser baseados na direta interação com espécies moleculares ou no fenômeno de cavitação. No campo da biotecnologia, o ultrassom com baixas frequências tem ganhado muita atenção recentemente na intensificação de processos enzimáticos. O ultrassom tem um efeito direto nas moléculas da enzima e favorece a transferência de massa em processos heterogêneos por meio da criação de turbulências locais geradas da cavitação acústica. Além disso, o impacto mecânico produzido pelo colapso das bolhas formadas durante a cavitação promove a abertura da superfície sólida ao ataque das enzimas. Porém, se a intensidade do ultrassom for muito alta, as enzimas podem sofrer desnaturação (Szabó e Csiszár, 2013; Gogate *et al.*, 2009). As aplicações de ultrassom são baseadas em três diferentes métodos: aplicação direta ao produto, acoplado ao equipamento ou submerso em um banho de água. O método mais estudado para aumentar a atividade enzimática é aquele em que o ultrassom fica submerso em um banho de água, já que o equipamento possui menores custos, é versátil e simples, além de ter baixa intensidade de ultrassom (Leães *et al.*, 2013a). A aplicação direta de ultrassom ao produto, como tem uma intensidade de ultrassom maior, é amplamente estudada em processos de emulsificação, homogeneização, extração, cristalização, pasteurização a baixas temperaturas, ativação e inativação de enzimas, redução de tamanho de partícula, alteração de viscosidade, entre outros processos (Patist *et al.*, 2008). Porém, o efeito da aplicação direta de ultrassom de alta intensidade na atividade enzimática de celulases é pouco estudado (Nguyen *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho é avaliar a hidrólise enzimática de bagaço de cana não tratado sob sonicação direta e indireta, usando extrato enzimático celulolítico cru de *Trichoderma reesei*. Para isso, as enzimas celulolíticas foram produzidas por fermentação em estado sólido e o extrato enzimático cru produzido foi utilizado nos experimentos, que foram realizados usando uma sonda ultrassônica de alta intensidade (400W e 24kHz). As variáveis investigadas na sonicação direta e indireta foram amplitude de oscilação, pulso e concentração de enzima, e as variáveis fixas foram temperatura, pH e razão sólido/líquido de 45°C, 4,8 e 0,05, respectivamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microorganismos, meio de cultura e substrato sólido.

O micro-organismo *Trichoderma reesei* NRRL – 6156 foi obtido do Serviço de Pesquisa Agrícola do departamento de Agricultura dos Estados Unidos. A cultura estoque de *T. reesei* foi propagada utilizando o meio de cultura Ágar/batata/dextrose (meio PDA). Depois de serem devidamente autoclavados a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, o meio de cultura foi vertido para as placas de Petri e, quando frio, pequenas porções de micro-organismo foram inoculadas na superfície. Em seguida, as mesmas foram transferidas para um estufa microbiológica com temperatura controlada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias. Para o preparo do pré-inóculo, os conídios das culturas esporuladas nas placas foram suspensas em 5 mL de água estéril pelo método de raspagem. Então, 5 mL da suspensão foram transferida para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido com composição previamente estabelecida (em g.L^{-1} : 2,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 de MgSO_4 , 1,0 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10,0 de extrato de levedura, 10,0 de glicose, 150,0 de água de maceração de milho, e $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$ de Tween 80), e este foi incubado num agitador orbital durante 2 dias a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e 120 rpm. Todas as condições experimentais foram definidas com base em pesquisa bibliográfica e testes preliminares.

O bagaço de cana foi obtido em uma microdestilaria localizada dentro da Universidade Federal de Santa Maria. No laboratório, o mesmo foi processado até um tamanho de partícula final de 8 mesh. O substrato sólido para a produção da enzima foi composto por bagaço de cana como fonte de carbono principal, suplementadas com farelo de soja e água de maceração de milho.

2.2. Produção de enzimas celulolíticas

As fermentações em estado sólido foram realizadas utilizando 70g de substrato seco em um biorreator de leito fixo com aeração forçada. O ar borbulhado em água antes da entrada do reator para garantir a entrada de ar úmido, saturado. O substrato sólido era composto de cana de açúcar suplementado com 1% em peso de farelo de soja e 65% de umidade. Antes da inoculação, o material era autoclavado a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos para garantir a esterilização. A fermentação era realizada em biorreator de leito fixo, com aeração forçada, a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante quatro dias. Essas condições experimentais foram definidas em experimentos preliminares. Após o término da fermentação, as enzimas celulolíticas eram extraídas usando 1500 mL de tampão 50 mM de acetato de sódio/ ácido acético ($\text{pH} = 4,8$) em um shaker orbital a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante uma hora. O extrato enzimático cru era mantido sob refrigeração (aproximadamente 4°C) até sua utilização nos experimentos de hidrólise.

2.3 Hidrólise de bagaço de cana assistida por ultrassom usando enzimas celulolíticas brutas

O sistema experimental para a sonicação direta era composto de um reator encamisado (1 L de capacidade) conectado a um banho termostático (temperatura com precisão de $\pm 2,0^\circ\text{C}$) para controle de temperatura, um processador de ultrassom de alta intensidade de 400 W, a frequência de 24 kHz com amplitude ajustável de 20 a 100 % e fator de pulso entre não-operação e irradiação acústica ajustável entre 0 a 100 % (Hielscher, modelo UP400S), equipado com uma sonda de titânio, de 7 mm (modelo H7 Tip 7) apresentando uma potência acústica densidade de 300 W.cm^{-2} . Para sonicação indireta o sistema era o mesmo, exceto para o reator, que foi trocado por um copo de sonicação com capacidade para 5 tubos de

ensaio de 15 mL atuando como reatores. A o copo de sonicação com tubos de ensaio foi imerso no banho termostático durante a hidrólise para manter constante a temperatura e a sonda ultrassônica foi acoplada no meio do copo em contato direto com a água, enquanto a hidrólise foi realizada nos tubos de ensaio, o que caracteriza o processo de sonicação como indireto.

Os efeitos da concentração do extrato bruto enzimático ($50\text{-}250\ \mu\text{L.g}^{-1}$), a amplitude de oscilação (20 - 40 %) e do ciclo de pulso (0,4 a 1,0) sobre a hidrólise do bagaço de cana de açúcar foram avaliadas por meio de um planejamento experimental composto central rotacional (CCRD) com 15 corridas e mais 3 pontos centrais. Todas as experiências foram realizadas a $45 \pm 2\ ^\circ\text{C}$, utilizando tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, durante 2 horas. O volume final para experimentos de sonicação direta foi de 500 mL enquanto que para sonicação indireta foram 10 mL, mantendo a razão sólido/líquido para todos os experimentos em 0,05 % em peso. Todas as condições experimentais foram definidas com base em pesquisa bibliográfica e testes preliminares. Para aumentar o rendimento de hidrólise, reduzindo a adsorção da enzima não produtiva sobre a lignina do substrato. Foi adicionado também de 1 % de Tween 80 em cada experimento (Szabó e Csiszár, 2013). O mesmo planejamento foi realizado para sonicação direta e indireta para fins de comparação.

Após a hidrólise, uma alíquota de solução foi filtrada por filtração no vácuo (papel filtro qualitativo Whatman, nº 1) e o sobrenadante foi utilizado para determinar a quantidade de açúcares fermentescíveis pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Os resultados foram expressos em termos de gramas de açúcares fermentáveis por quilograma de material sólido seco, que representam o rendimento da hidrólise.

2.4 Análise dos resultados estatísticos

Todos os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considerando um nível de significância de 90%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de enzimas celulíticas

O extrato enzimático bruto obtido por fermentação em estado sólido utilizado para a hidrólise enzimática do bagaço de cana não tratado sob sonicação direta e indireta apresentava atividades de $4,2\ \text{FPU.g}^{-1}$, $7,3\ \text{U.g}^{-1}$, $1.734,8\ \text{U.g}^{-1}$ e $2,5\ \text{U.g}^{-1}$ para a atividade em papel filtro, exo-celulase, xilanase e endo-celulase, respectivamente. É importante salientar que o extrato enzimático bruto obtido tem pelo menos quatro diferentes enzimas que atuam de forma sinérgica para a hidrólise de materiais lignocelulósicos. A Tabela 1 apresenta os rendimentos de açúcares fermentáveis obtidos nos dezessete experimentos do CCRD para a hidrólise enzimática de bagaço de cana assistida por sonicação direta e indireta. Os rendimentos médios em açúcares fermentescíveis (considerando as 17 corridas) foram de 18,3 e $41,4\ \text{g.kg}^{-1}$, respectivamente, para a hidrólise enzimática assistida por ultrassom, direta e indiretamente. Este resultado demonstrou que a utilização de sonicação direta levou a uma significativa diminuição do rendimento em açúcares fermentescíveis (teste de Tukey, $p < 0,05$). Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que uma exposição a ultrassom de alta intensidade pode afetar a estrutura da enzima, levando à sua desactivação. De um modo geral, a produção de açúcares

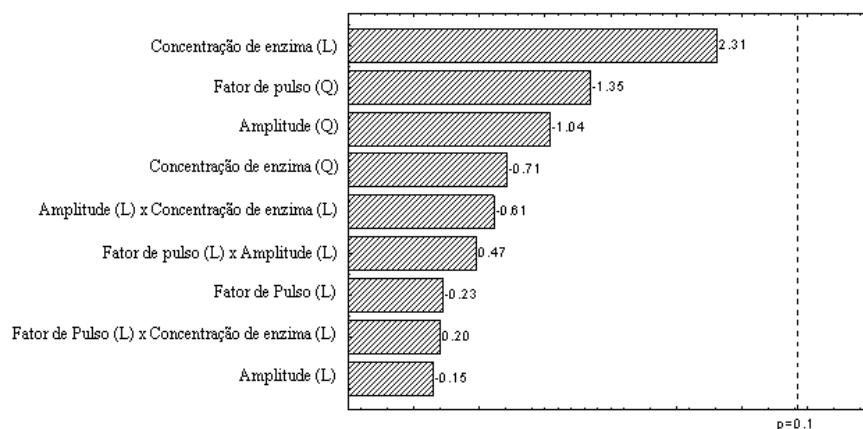
fermentáveis na hidrólise com sonicação indireta foi sempre maior do que para a direta. Os dados da Tabela 1 foram usados para determinar os efeitos das variáveis na produção de açúcares fermentáveis. Os efeitos foram expressos sob a forma de diagrama de Pareto, que são apresentados na Figura 1.

Tabela 1: Matriz do CCRD para avaliar a influência das variáveis independentes sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana sob sonicação direta (SD) e indireta (SI)

Exp.	Fator de pulso (%)	Amplitude (%)	Concentração de enzima ($\mu\text{L.g}^{-1}$)	Rendimento sob SD (g.kg^{-1})	Rendimento sob SI (g.kg^{-1})
1	0,5 (-1)	24 (-1)	90,5 (-1)	19,5	39,6
2	0,9 (1)	24 (-1)	90,5 (-1)	16,9	39,7
3	0,5 (-1)	36 (1)	90,5 (-1)	19,0	39,8
4	0,9 (1)	36 (1)	90,5 (-1)	14,0	32,8
5	0,5 (-1)	24 (-1)	209,5 (1)	31,3	50,4
6	0,9 (1)	24 (-1)	209,5 (1)	23,9	60,6
7	0,5 (-1)	36 (1)	209,5 (1)	18,8	45,1
8	0,9 (1)	36 (1)	209,5 (1)	22,2	56,1
9	0,4 (-1,68)	30 (0)	150 (0)	9,0	41,3
10	1,0 (1,68)	30 (0)	150 (0)	12,8	45,1
11	0,7 (0)	20 (-1,68)	150 (0)	8,3	52,5
12	0,7 (0)	40 (1,68)	150 (0)	16,7	50,4
13	0,7 (0)	30 (0)	50 (-1,68)	6,3	15,9
14	0,7 (0)	30 (0)	250 (1,68)	22,2	43,9
15	0,7 (0)	30 (0)	150 (0)	18,6	27,9
16	0,7 (0)	30 (0)	150 (0)	30,6	29,9
17	0,7 (0)	30 (0)	150 (0)	21,5	32,3

Para hidrólise sob sonicação direta (Figura 1a), nenhuma das variáveis estudadas foi estatisticamente significativa na faixa avaliada. Os efeitos lineares e quadráticos da amplitude de oscilação e fator de pulso, embora não significativos, foram negativos e isso pode ter ocorrido devido às altas amplitudes testadas (20 a 40 %), o que afetou negativamente a eficiência de hidrólise, uma vez que a enzima pode ser desnaturada sob potências de ultrassom mais altas. Em geral, baixos rendimentos foram obtidos nestes testes, não ultrapassando o rendimento de $31,3 \text{ g.kg}^{-1}$. Isso pode ter ocorrido devido à baixa atividade do extrato enzimático bruto, combinado com o baixíssimo intervalo de concentração de enzima utilizado e o efeito negativo da amplitude de oscilação. O efeito linear referente à concentração de enzima atingiu um p-valor perto de significância estatística ($p = 0,113$) e teve um efeito positivo sobre o rendimento, como pode ser visto na Figura 1a. Aumentando a concentração de enzima é possível notar um aumento no rendimento de hidrólise. Os efeitos negativos da amplitude de oscilação e do fator de pulso indicam que a alta energia de sonicação pode ter causado danos irreversíveis à estrutura de enzimas, corroborando o efeito positivo para a concentração de enzima, uma vez que quanto maior é a desativação da enzima mais enzima é necessária para realizar a hidrólise.

(a)



(b)

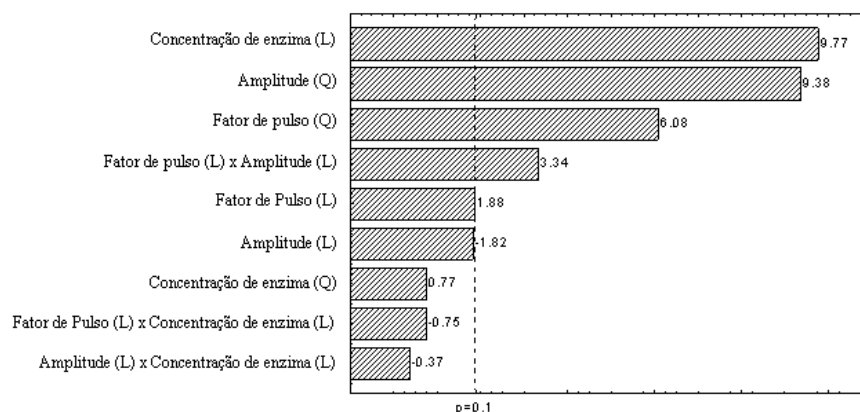


Figura 1: Gráficos de Pareto mostrando os efeitos de lineares, quadráticos e termos de interação das variáveis independentes sobre o rendimento em açúcares fermentescíveis de hidrólises sob sonicação (a) direta e (b) indireta.

Para hidrólise sob sonicação indireta (Figura 1b), as variáveis significativas ($p < 0,1$) foram os efeitos lineares para concentração de enzima, fator de pulso e amplitude de oscilação, quadrático para o fator de pulso e amplitude de oscilação, e o efeito da interação entre o fator de pulso e concentração de enzima. Efeitos lineares positivos foram verificados para o fator de pulso e concentração de enzima que levou a um efeito positivo da interação entre essas variáveis. Em outras palavras, aumentando a concentração de enzima, bem como o fator de pulso podem ser obtidos rendimentos elevados. Por outro lado, o efeito linear para amplitude de oscilação apresentou efeito negativo, indicando que o aumento da potência de ultrassom diminui o rendimento, provavelmente devido à desativação enzimática. Os efeitos quadráticos para o fator de pulso e amplitude de oscilação foram positivos, indicando a presença de um ponto mínimo para essas variáveis na faixa estudada. A interpretação correta dos efeitos quadráticos é importante, pois eles estão indicando que, dentro da faixa estudada para cada variável pode ser encontrado um ponto ou região sobre o rendimento é o mais baixo. Por exemplo, o efeito linear para amplitude de oscilação foi negativo, mas o quadrático foi positivo. Uma conclusão direta de que a diminuição da amplitude de oscilação irá levar a um aumento no rendimento é errada, pois em amplitudes de oscilação entre 20 e 40 %, existe um ponto em que o rendimento é mínimo.

A fim de ajudar a seleção de variáveis independentes que vai levar a uma produção máxima de açúcares fermentáveis, um modelo empírico que apresenta os termos significativos ($p < 0,1$), relativo à hidrólise sonora indireta é apresentado na Equação 1:

$$AF = 29.82 + 1.52 \cdot FP + 5.40 \cdot FP^2 - 1.47 \cdot A + 8.31 \cdot A^2 + 7.87 \cdot CE + 3.25 \cdot FP \cdot CE \quad (1)$$

onde AF é o rendimento de açúcares fermentáveis (g.kg^{-1}) obtido pela hidrólise sob sonicação indireta, FP, A e EC são o fator de pulso, a amplitude de oscilação e a concentração da enzima, codificados, respectivamente. Este modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA). Pelo teste F, foram obtidos valores calculados cerca de dezoito vezes maior do que aquele tabulado para significância com $p = 0,1$, e o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,96907. O alto valor para o coeficiente de determinação indica bom ajuste dos dados experimentais, permitindo a utilização de tais modelos para prever o desempenho do processo, bem como usá-los como ferramenta para a otimização de processos.

Como vimos, o ultrassom é muito utilizado para o pré-tratamento da biomassa, mas o número de trabalhos utilizando-o para intensificação da hidrólise enzimática é limitado. Silva *et al.* (2013) relataram rendimento máximo de açúcares fermentáveis de 217 g.kg^{-1} para a hidrólise de bagaço de cana realizada utilizando GLP pressurizado combinado com sonicação indireta. Neste presente trabalho, o rendimento máximo obtido para hidrólise enzimática do bagaço de cana com sonicação indireta foi de $60,6 \text{ g.kg}^{-1}$. Considerando que o presente trabalho foi realizado com extrato enzimático cru produzido em laboratório, em concentrações de enzimas bastante baixas, utilizando apenas a tecnologia de sonicação indireta em bagaço de cana sem nenhum tratamento prévio, pode-se considerar que o resultado obtido é bastante bom, e, apresentam potencial para atingir rendimentos muito maiores, caso a faixa de concentração de enzima seja aumentada.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi demonstrado que há uma enorme diferença entre o uso de sonicação direta e indireta na hidrólise de material lignocelulósico. Um aumento considerável no rendimento da hidrólise foi obtido em experiências sob sonicação indirecta. O rendimento máximo de hidrólise foram $31,3 \text{ g.kg}^{-1}$ e $60,6 \text{ g.kg}^{-1}$ sob sonicação direta e indirecta, respectivamente. Estes resultados podem ser considerados como valores razoáveis, uma vez que foi usada uma concentração extremamente baixa de enzima, e que existe um potencial para aumentar esses rendimentos através do aumento da concentração de enzima. O estado otimizado para a hidrólise de sonicação indirecta é a concentração de enzima mais elevada do que $209,5 \mu\text{l.g}^{-1}$, a irradiação de ultrassom contínua e amplitude de oscilação de 20%, que corresponde a uma fonte de ultrassom de 60 W.cm^{-2} . A irradiação ultrassom indirecta mostrou-se uma tecnologia mais promissora para ser utilizada em reação enzimática devido a seus efeitos positivos sobre o rendimento de hidrólise.

6. REFERÊNCIAS

ALVIRA P., TOMAS-PEJO E., BALLESTEROS M., NEGRO M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 4851–4861, 2010.

- BENAZZI T., CALGAROTO S., ASTOLFI V., DALLA ROSA C., OLIVEIRA C., MAZUTTI M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 52, p. 247-250, 2013.
- BUSSEMAKE M.J., ZHANG D. Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications. *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52(10), p. 3563–3580, 2013.
- CARDONA C.A., QUINTERO J.A., PAZ I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour. Technol.*, vol. 101, p. 4754–4766, 2010.
- GOGATE P.R., KABADI A.M. A review of applications of cavitation on biochemical engineering/technology. *Biochem. Eng. J.*, vol.44, p. 60-72, 2009.
- GOH C.S., TAN K.T., LEE K.T., BHATIA S. Bio-ethanol from lignocellulose: status, perspectives and challenges in Malaysia. *Bioresour. Technol.*, vol.101, p. 4834–4841, 2010.
- JORGENSEN H., OLSSON L.. Production of cellulases by penicillium brasilianum IBT 20888 – effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb. Technol.*, vo. 38, p. 381–390, 2006.
- LEÃES E.X., LIMA D., MIKLASEVICIUS L., RAMON A.P., DAL PRÁ V., BASSACO M.M., TERRA L.M., MAZUTTI M.A. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* , vol. 2, p.21-25, 2013a.
- LEÃES E.X., ZIMMERMANN E., SOUZA M., RAMON A.P., MEZADRI E.T., DAL PRÁ V., TERRA L.M., MAZUTTI M.A. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of cassava waste to obtain fermentable sugars. *Biosystems Engineering*, vol. 115(1), p.1–, 2013b.
- MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid and reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.*, vo. 31, p. 426–427, 1959.
- NGUYEN T.T.T., LE V.V.M. Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex. *Int. Food Res. J.*, vol. 20, p. 557-563, 2013.
- PATIST A., BATES B.. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 9, p. 147–154, 2008.
- SILVA J.R.F.S., CANTELLI K.C., TRES M.V., DALLA ROSA C., MEIRELLES M.A.M., SOARES M.B.A., OLIVEIRA D., OLIVEIRA J.V., TREICHEL H., MAZUTTI M.A. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 2, p. 102–107, 2013.
- SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.S., MEDEIROS A.B.P., KARP S.G., BUCKERIDGE M., RAMOS L.P., PITARELO A.P., FERREIRA-LEITÃO V., GOTTSCHALK L.M.F., FERRARA M.A., BON E.P.S., MORAES L.M.P., ARAÚJO M.A., TORRES F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.*, vol. 101, p. 4820-4825, 2010.
- SZABÓ O.E., CSISZÁR E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. *Carbohydrate Polymers*, vol. 98, p. 1483– 1489, 2013.
- WANG J., CAO Y., BAOGUO S., WANG C., MO Y. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, p. 534–540, 2011.
- WANG Z. , Lin X, Li P, Zhang J, Wang S, Ma H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresour. Technol.*, vol. 117, p. 222–227, 2012.