

DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA CELULOSE POR FUNGOS

Nelson Lima

Secção de Ciências Exactas e da Natureza
Universidade do Minho
4719 BRAGA CODEX
PORTUGAL

ABSTRACT

This review describes briefly the recent developments in enzymatic degradation of cellulose by fungi: 1) chemistry and structure of cellulose; 2) cellulosic materials, and their pretreatments, as substrates for enzymatic degradation; 3) characterization of the wood-rotting; 4) characterization of fungal cellulases and, 5) enzymatic mechanisms involved in the degradation of cellulose.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos verificamos um forte e amplo interesse pela procura e utilização de novas fontes de biomassa renovável devido a uma maior consciencialização dos grandes problemas à escala planetária: como a fome, as reservas limitadas de combustíveis fósseis, a maior necessidade de produtos químicos para a indústria e a ruptura de equilíbrios ambientais.

A produção de biomassa é, provavelmente, um dos mais eficientes métodos

de aproveitamento da energia solar e de acordo com Augustine (2) abençoados os povos que sejam capazes de desenvolver processos eficazes desse aproveitamento.

Neste cenário, a utilização da celulose tem sido encarada como a única fonte de carbono renovável disponível em grandes quantidades na Natureza. Calcula-se que a quantidade de carbono fixado pelo Ciclo de Calvin por ano é de cerca de 10^{11} toneladas (28, 65) sendo metade deste valor celulose (65).

Assim, a existência de grandes quantidades disponíveis de celulose sugere possibilidades muito atractivas de utilização, desde que se obtenha uma hidrólise eficiente por enzimas microbianas (complexo celulásico).

No campo da alimentação a celulose pode ser utilizada para produção de "single cell protein" e as enzimas celulásicas facilitam e aumentam a digestibilidade de produtos celulares vegetais libertando açúcares e solubilizando proteínas (35, 45).

Etanol, acetona e acetato, ácidos orgânicos como o glicoxálico ou tartárico, sorbitol, glicol de etileno e de propileno (65) são alguns dos muitos produtos químicos originados a partir da aplicação de processos tecnológicos para o aproveitamento de materiais celulósicos por hidrólise enzimática. Colocamos em primeiro lugar o etanol uma vez que pode tornar-se um substituto competitivo dos combustíveis fósseis.

Por último, mas não menos importante, um dos problemas ambientais é o das lixeiras de origem urbana e agro-industrial em que, como veremos mais adiante, uma grande percentagem destes lixos são de natureza celulósica os quais poderiam ser reciclados com grandes vantagens quer de custos económicos quer ambientais. Contudo, a sua utilização para a produção de cogumelos comestíveis fica comprometida se estes lixos estiverem contaminados por elementos tóxicos (*e.g.* metais pesados). Outro problema é o aumento de CO_2 na atmosfera e os consequentes aumentos quer da absorção das radiações da região dos infra-vermelhos, quer da temperatura atmosférica (efeito de estufa). Esta questão poderia ser combatida, para além de outras soluções, com uma maior produção de material celulósico (*e.g.* aumento da área florestal) e o uso desse material para fins biotecnológicos (26).

ESTRUTURA QUÍMICA E FÍSICA DA CELULOSE

A celulose é um produto natural. Encontramo-la essencialmente na parede das células vegetais associada com outros compostos. De um modo geral os componentes da parede celular das plantas superiores são pectinas, celulose, hemicelulose, lenhina, suberina, cutinas, ceras, taninos e calose (56).

A celulose é uma biomolécula definida quimicamente como sendo um homo-

polímero linear de unidades de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucosídicas (71). Apresenta a fórmula empírica $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ em que n pode variar entre 300 e 15000 resíduos de β -D-anidroglicopiranosil (44).

A Fig. 1 representa a estrutura conformational de uma porção da molécula de celulose. Esta põe em evidência para além das já referidas ligações, os grupos -OH localizados nos átomos de carbono 2, 3 e 6 de cada resíduo (25) que, como veremos mais adiante, são os responsáveis pela estrutura cristalina desta molécula.

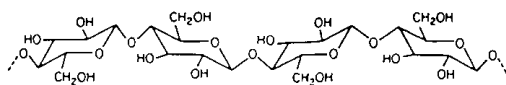


Fig. 1. Representação de uma porção da estrutura conformational da molécula de celulose.

Esta molécula é altamente estável e insolúvel. Os solventes com a capacidade de quebrar as suas ligações (são bons exemplos os ácidos sulfúrico e o P -fosfórico) dão por hidrólise parcial o dissacarídeo redutor β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-piranosido (celobiose) e por hidrólise total o β -D-glucopiranosil (glucose).

As moléculas de celulose organizam-se paralela e tridimensionalmente constituindo uma rede cristalina denominada microfibrila. Estas, formam unidades elementares que surgem devido às ligações de hidrogénio que se estabelecem entre os grupos hidróxilos (Fig. 2).

Uma vez que as propriedades físicas da celulose são condicionantes na hidrólise por enzimas é importante verificar, de acordo com Goodwin e Mercer (25) e Kirk (36), a existência de zonas na microfibrila que não

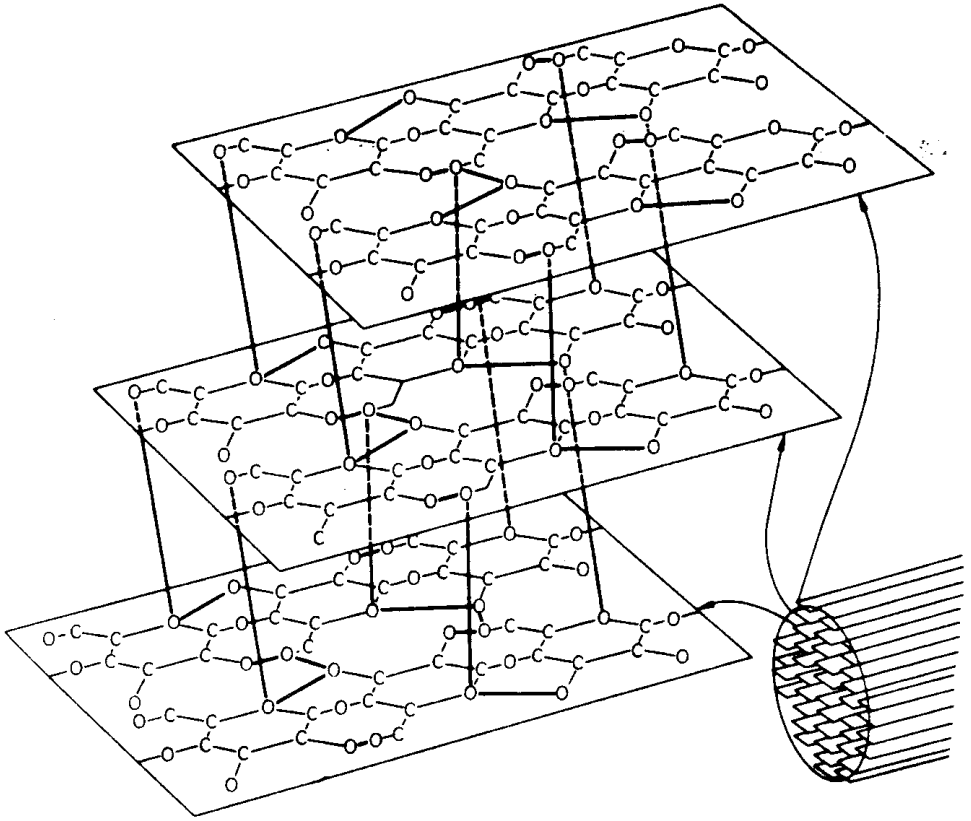


Fig. 2. Modelo tridimensional da estrutura da microfibrila. A cheio estão representadas as ligações de hidrogênio responsáveis pela cristalinidade da celulose (1).

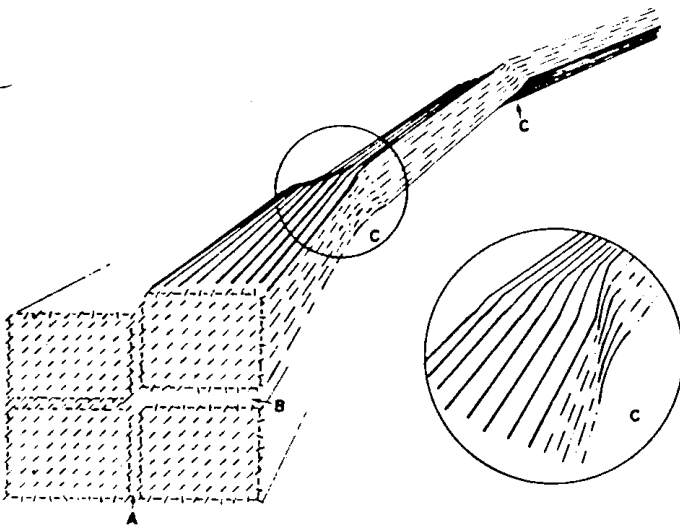


Fig. 3. Representação esquemática das diferentes zonas estruturais das microfibrilas. A - zona altamente ordenada, B - zona ligeiramente desordenada e C - zonas inclinadas e torcidas (36).

apresentam um estado perfeito de ordenamento - áreas paracristalinas - (Fig. 3 B e C). Nestas áreas a celulose está normalmente associada à hemicelulose. Assim, surgem ao longo da microfibrila áreas mais susceptíveis de serem degradadas do que as altamente cristalinas (Fig. 3 A).

A celulose na parede da célula vegetal está organizada tal como se esquematiza na Fig. 4. Na lamela média não existem microfibrilas. Na parede primária estão en-

treaçadas com uma orientação de cerca de 90° com a direcção do eixo axial celular. Na parede secundária, na camada mais ex-terna S_1 as microfibrilas formam dois sistemas helicoidais cruzados com um ângulo de aproximadamente 50° com o eixo axial; na camada S_2 as microfibrilas apresentam-se subverticalmente em relação ao eixo axial e por último, a camada interna S_3 apresenta as microfibrilas em hélice com orientação horizontal em relação ao eixo axial.

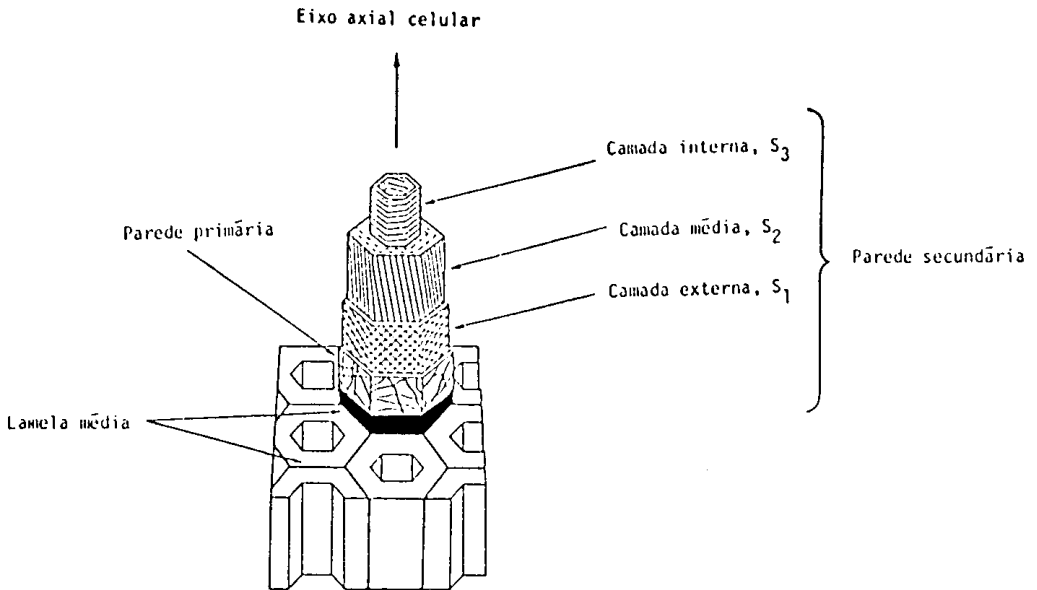


Fig. 4. Representação esquemática da parede da célula vegetal (25).

Nas paredes celulares a celulose encontra-se distribuída pela parede primária com cerca de 30% de peso seco e na parede secundária com cerca de 90% de peso seco (71).

FONTES DE MATERIAL CELULÓSICO

Cowling e Kirk (13) apresentam como exemplos de fontes naturais de celulose o lenho das angiospérmicas com 40-45% de

celulose, 24-40% de hemicelulose e 25-35% de lenhina; o algodão com 80-95% de celulose, 2-20% de hemicelulose e lenhina residual.

Nos resíduos de origem urbana e agro-industrial os materiais celulósicos, tal como os de origem natural, não ocorrem numa forma pura.

Assim, nos lixos domésticos do Continente Português o papel e o cartão representam cerca de 400 Ktoneladas/ano

(aproximadamente 20% do lixo total) (9). Tomando a composição do papel de jornal como exemplo, Tsao e Chiang (71) apresentam os valores de 40-55% para a celulose, 25-40% para a hemicelulose e, finalmente, 18-30% para a lenhina. Nos resíduos agro-industriais salientam-se em Portugal o bagaço de uva e o repiso de tomate com uma produção média anual de 5 Ktoneladas de peso seco para cada caso. Colaço (10) faz corresponder um valor de 1800 toneladas/ano de celulose para o primeiro exemplo e um valor de cerca de 2000 toneladas/ano de celulose para o segundo exemplo.

Muitas outras fontes de material celulósico poderiam ser referidas. Queremos apenas deixar bem claro, com alguns exemplos, a grande quantidade de celulose disponível para ser bioconvertida em produtos de maior valor acrescentado desde que, economicamente rentáveis.

PRETRATAMENTOS DE MATERIAL CELULÓSICO

Como acabamos de referir, a celulose disponível e com interesse para ser biodegradada caracteriza-se pela sua estrutura cristalina e por apresentar outros compostos a ela associados como é o caso da lenhina. Estes dois aspectos constituem a maior barreira a uma hidrólise eficaz (36, 47, 71, 76).

Outros factores secundários que influenciam a hidrólise da celulose e que não devem ser menosprezados são: a área superficial acessível à hidrólise (71, 76); o grau de polimerização da celulose (13, 36, 71, 76) e o teor em humidade da celulose (13, 71, 76).

A aplicação de vários tratamentos à celulose tem como objectivo o aumento da susceptibilidade desta para ser degradada posteriormente por enzimas. Os métodos são de natureza física ou química, sendo os

mais importantes: a moagem que provoca o aumento da área de superfície da celulose (76) e diminui a sua cristalinidade (18, 43); os ácidos fortes (H_2SO_4 e $O-H_3PO_4$) que libertam a lenhina das fibras (71) e reduzem a cristalinidade da celulose (18, 42, 71); o SO_2 que diminui o teor da lenhina (71, 76); o NaOH que remove a lenhina (71, 76), aumenta a área de superfície da celulose (18, 43, 71, 76) e transforma a celulose nativa do tipo I em celulose modificada do tipo II caracterizada por uma estrutura anti-paralela e com diferentes unidades de celobiose (57). O efeito destes vários tratamentos não está completamente compreendido, contudo, eles permitem melhores taxas de rendimento na hidrólise da celulose, sendo estas mais sensíveis à diminuição do índice de cristalinidade do que ao aumento da área superficial susceptível de ser hidrolisada (18).

CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE PODRIDÃO DA MADEIRA

A podridão da madeira é devida a um processo de hidrólise realizada por fungos que ocorre naturalmente. É um problema que tem chamado uma grande atenção a muitos investigadores não só, pelo aspecto imediato de obter uma solução para minimizar os custos da manutenção e segurança das construções de madeira mas também, pela possibilidade de estudar e aperfeiçoar modelos explicativos da degradação da celulose nativa e de outros materiais, normalmente, a ela associados (*e. g.* lenhina).

A podridão da madeira apresenta três tipos: a mole, provocada fundamentalmente por fungos Ascomycetae e Deuteromycetae; a castanha e a branca provocadas por fungos Basidiomycetae (6).

O primeiro tipo, podridão mole, caracteriza-se pelas hifas formarem cavidades na camada S_2 da parede secundária

das células vegetais, com pontuações terminais à volta destas, segundo o alinhamento das microfibrilas. Em secção transversal surge o aspecto de buracos na

parede celular com uma hifa em cada centro (Fig. 5). A celulose e hemicelulose são atacadas mas, a lenhina só o é residualmente (36).

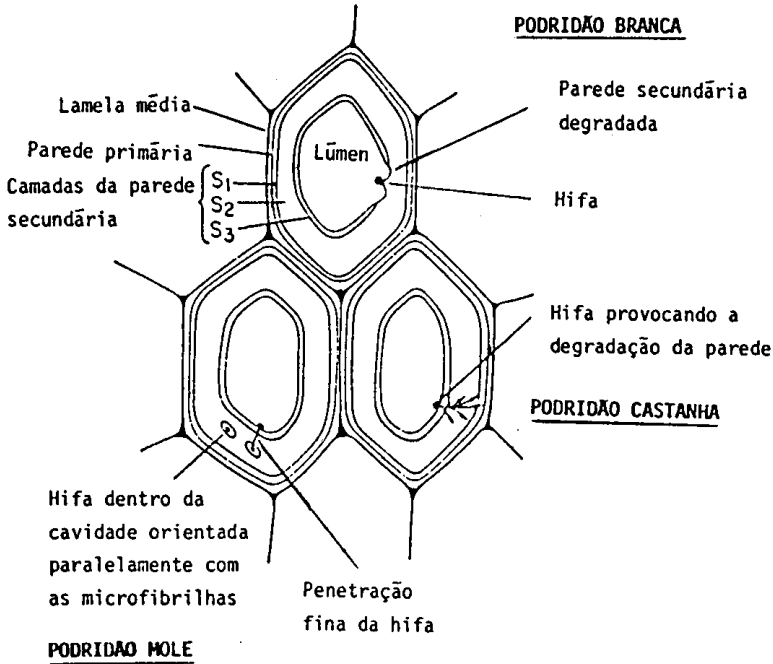


Fig. 5. Diagrama de um corte transversal de células vegetais degradadas pelos três diferentes tipos de podridão (6).

A podridão castanha aparece quando hifas fúngicas perfuram a parede secundária em estreitos orifícios e hidrolisam a celulose e a hemicelulose, ficando a lenhina praticamente inalterada (Fig. 5).

Por último, a podridão branca surge quando fungos degradam para além da celulose e hemicelulose a lenhina. As paredes adjacentes às hifas tornam-se, visivelmente, mais finas de forma que cada hifa fica num sulco. Para cada lado deste sulco o material da parede apresenta áreas mais ou menos degradadas de acordo com a extensão da hidrólise (Fig. 5).

FUNGOS CELULOLÍTICOS

Na Natureza, a degradação da celulose é feita essencialmente por microrganismos. Dentro destes encontramos os fungos que, nos últimos anos, têm sido sujeitos a um estudo intenso no sentido de se obter um maior conhecimento das suas características celulolíticas. Sem querermos ser exaustivos apresentamos uma listagem de fungos que têm vindo a ser caracterizados: *Aspergillus fumigatus* (27, 37), *A. niger* (13, 74), *A. phoenicis* (4, 45), *A. terreus* (16, 22, 23, 24, 48), *A. wentii* (60), *Botryodiplodia*

theobramae (45), o ascomicete termo-tolerante responsável pela podridão mole *Chaetomium cellulolyticum* (7, 8, 28) e ainda o *C. globosum* (60, 70) e *C. thermophile* (70), *Fomes annosus* (13), *Fusarium solani* (37, 77, 80, 81, 84), *Gliocladium virens* (68), *Hypocrea* sp (60), o fungo *Irpex lacteus* (= *Polyporustulipi feriae*) provoca a podridão branca (45) e o fungo basidiomicete *Lenzites trabea* provoca a podridão castanha (29, 45), *Malbranchea pulchella* (70), *Myceliophthora fergusii* (70), *Myrothecium verrucaria* (13, 33), *Neocallimastix frontalis*, fungo anaeróbico isolado por Oprin (53), *Penicillium funiculosum* (= *P. pinophilum*) (81, 84), *P. iriensis* (66), *P. janthinellum* (45), *P. notatum* (13), *P. variabile* (67), *P. vermiculatum* (67), *P. verruculosum* (67), *Phanerochaete chrysosporium* (= *Sporotrichum pulverulentum*) (32, 37, 45, 58, 81, 84), *Piromonas communis* e *Sphaeromonas communis* são dois fungos anaeróbicos também isolados e estudados por Oprin (54, 55), *Sporotrichum cellulophilum* (14, 45.), *S. thermophile* (= *Chrysosporium thermophile*) (12, 70), *Stachybotrys cylindrospora* (60), *Talaromyces emersonii*, fungo termofílico estudado por Tansey (70), Folan e Coughland (21) e Moloney *et al.* (50), *Thermoascus aurantiacus*, também é um fungo termofílico (20, 70, 75), *Thielavia terrestris* (75), *Trichoderma harzianum* (34, 75), *T. koningii* (45, 80, 81, 84), *T. lignorum* (30), *T. reesei* (= *T. viride* QM6a) (38, 39, 41, 45, 63, 73, 81), *T. viride* (45, 52, 81), *T. pilulifera* (60 e, finalmente, *T. ramata* (60).

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO FÚNGICO

Actualmente, admite-se que o complexo celulásico fúngico é formado, essencialmente, por três enzimas actuando

sinergisticamente (11, 40, 47, 72, 78) no sentido de uma completa hidrólise da celulose insolúvel.

A enzima endo-(1->4)- β -D-gluco-nase[(1->4)- β -D-glucanglucanohidrolase], EC 3.2.1.4. (82, 83), também referida como endoglucanase (E) (5, 51, 80), carboximetilcelulase (CMC'ase) (45, 66, 72) ou simplesmente C_x (24, 65, 79) ataca hidroliticamente substratos de celulose amorfa, celulose modificada como carboximetilcelulose ou celulose Walseth e, por último, celo-oligossacarídeos. As endoglucanases surgem fundamentalmente em cinco formas e não apresentam qualquer actividade hidrolítica para a celobiose e para a celulose cristalina (45, 79) exceptuando a EIII de *T. viride* que é muito activa contra celulose cristalina (3).

As endoglucanases actuam aleatoriamente nas ligações β -D-(1->4)-glucosídicas da celulose, produzindo celobiose e celotriose como produtos principais da hidrólise e glucose como produto residual. Contribuem igualmente para a despolimerização da celulose tornando-a mais susceptível à acção das exoglucanases (31, 65). Numa perspectiva estereoquímica Wood *et al.* (85) propõem a necessidade de pelo menos uma das duas endoglucanases estereo-específicas, I ou II, para iniciar o ataque à cadeia de celulose promovendo a formação de diferentes configurações, tipo I ou tipo II, nas extremidades não reduzidas da celulose. Como veremos a seguir, estes tipos de extremidades servirão de substrato para o ataque sequencial de duas outras enzimas, celobiohidrolase I e celobiohidrolase II, do complexo celulásico (78).

Esta enzima é solúvel, termoestável, e tem um peso molecular compreendido entre 11000 e 65000 daltons. A endoglucanase produzida por *Trichoderma* tem como valores óptimos de pH e temperatura 4,8 e 50°C respectivamente (45).

A enzima exo-(1->4)- β -D-glucanase [(1->4)- β -D-glucancelobiohidrolase], EC 3.2.1.91 (83), também referida como exoglucanase (72, 80), celobiohidrolase (CBH) (5, 45, 65, 84) ou C_1 (29, 47) tem pouca capacidade de atacar substratos celulósicos cristalinos como celulose Avicel e Whatman (84) bem como, celulose Walseth e celo-oligossacarídeos. Quanto à carboximetilcelulose e celobiose não apresenta qualquer actividade (45, 79, 84) mas, em contraste, é muito activa contra celulose amorfa "swollen" (78). Esta enzima quando combinada com as outras duas pertencentes ao complexo celulásico desempenha o papel mais importante na hidrólise da celulose cristalina (19).

As celobiohidrolases, tipo I e tipo II, quebram as ligações β -D-(1->4)-glucosídicas removendo das extremidades da cadeia de celulose, que não estejam reduzidas, celobiose (45, 65, 84) e, secundariamente, glucose (65). Wood *et al.* (85) defendem que a remoção da celobiose pela celobiohidrolase I a partir de uma extremidade da cadeia de celulose não reduzida do tipo I exporá outra extremidade da cadeia de celulose com diferente configuração (tipo II) que será atacada pela celobiohidrolase II.

Esta enzima é solúvel, menos termóstável que a endoglucanase, e tem peso molecular compreendido entre 50000 e 65000 daltons. Para a exoglucanase produzida por *Trichoderma* os valores óptimos de pH e temperatura são respectivamente de 4,8 e 50°C. (45).

Por último, a enzima β -D-glucosidoglucohidrolase, EC 3.2.1.21 (11, 45, 83) ou simplesmente β -glucosidase (celobiase) (5, 78) completa a trilogia do sistema enzimático celulásico.

A sua actividade hidrolítica caracteriza-se pela quebra das ligações β -(1->2), β -(1->3), β -(1->4) e β -(1->6) glucosídicas de

dímeros de glucose (45, 65). Ataca substratos como celobiose, celo-oligossacarídeos (inversamente às outras duas enzimas, a actividade aumenta com cadeias moleculares cada vez mais pequenas) e aril- β -glucósidos (salicina e *o*-nitrofenil- β -glucósido) (31, 47). A enzima β -glucosidase não ataca a celulose.

O produto final da actividade hidrolítica da β -glucosidase é a glucose. No entanto, esta enzima na presença de unidades de glucose, pode funcionar como transferase formando álcoois ou outras moléculas de açúcar como dímeros ou oligossacarídeos (45, 65).

A β -glucosidase é uma enzima solúvel, termóstável, com peso molecular de 47000 a 76000 daltons. Apresenta para pH óptimo valores compreendidos entre 4,0 e 5,0 (45).

Quando a hidrólise da celulose é feita por fungos que provocam a podridão branca encontramos no sistema enzimático uma fracção minoritária de enzimas oxidativas. Assim, a celobiose-oxidase EC 1.1.99.18 oxida celobiose e celodextrina para os seus ácidos-ónicos correspondentes usando o oxigénio como aceptor de electrões. A celobiose:quinoma oxidoreductase EC 1.1.5.1 utiliza quinomas como aceitadoras de electrões e faz a união dos processos de degradação da celulose e da lenhina (17).

Por último, nem sempre é possível trabalharmos com enzimas isolada purificadas e, então, neste caso recorreremos ao complexo celulásico para caracterizar a actividade enzimática total. Assim, a FPase, a Avicelase, a Hidrocelulase e a Celulase ($C_1 + C_2$) hidrolisam respectivamente o papel de filtro, celulose Avicel, hidrocelulose e fibras de algodão (45, 47).

MECANISMOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE POR FUNGOS

A celulose, como já referimos, é composta por duas fracções, uma cristalina

e outra paracristalina (amorfa). Estas fracções apresentam diferentes digestibilidades à hidrólise enzimática. Ao longo do tempo, para explicar estas diferenças, têm sido propostos diversos modelos considerando quer a composição da celulose quer as propriedades e modo de acção do complexo celulásico.

Assim, Reese *et al.* (62) propuseram o modelo sequencial da biodegradação da celulose nativa que compreendia dois passos: 1) a conversão da celulose cristalina em celulose amorfa ou modificada (solúvel) pela acção da enzima não hidrolítica C_1 ; 2) completa degradação da celulose solúvel em glucose e celobiose pela acção da enzima hidrolítica C_x . Estes autores consideravam microrganismos celulolíticos só aqueles que possuíam o complexo $C_1 + C_x$.

Segundo Ryu e Mandels (65) este modelo supersimplificado serviu de grande estímulo para uma maior investigação sobre o complexo celulásico permitindo uma

separação, purificação e caracterização dos seus elementos: endoglucanase, celobiohidrolase e β -glucosidase.

Assim, tem-se compreendido a acção individual de cada enzima ou das suas componentes bem como, o efeito sinérgico das enzimas quando o sistema original celulásico é restabelecido (79, 80, 81, 82, 83).

Nesta nova perspectiva, encontramos o modelo simplificado proposto por Ryu *et al.* (64). Estes autores admitem um único passo para a hidrólise das fracções cristalina e amorfa da celulose devido às enzimas do complexo celulásico actuarem em paralelo e sinérgicamente.

Um outro modelo sequencial, adaptado e actualizado a partir do modelo original de Reese *et al.* (62) é o referido por Fan e Lee (19). Este novo modelo não distingue a fracção cristalina da amorfa e apresenta duas reacções: a primeira, caracteriza-se pela conversão em fase sólida da celulose para celobiose pela acção sinérgica da

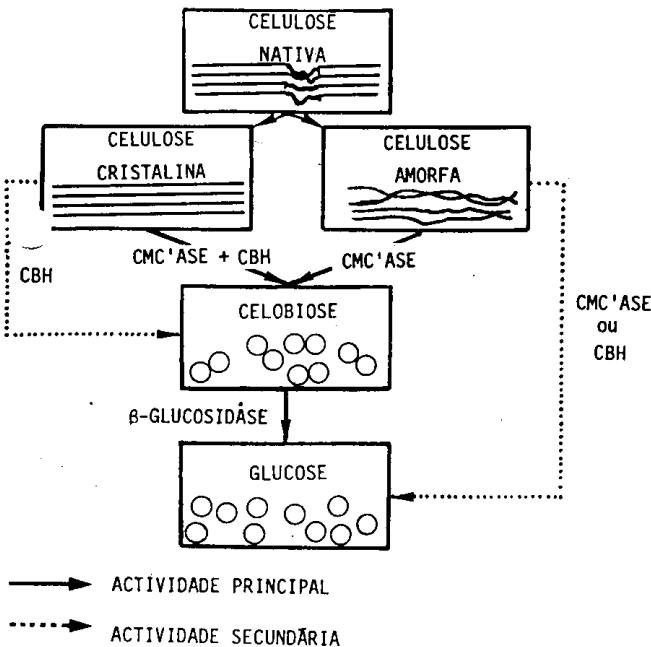


Fig. 6. Esquema do modo de acção do sistema celulásico de fungos na hidrólise da celulose.

endoglucanase e celobiohidrolase; a segunda, é a conversão em fase aquosa da celobiose para glucose pela acção da β -glucosidase.

Por último, o modelo esquematizado na Fig. 6 é o mais eclético e é defendido por Wood e McCrae (79), Ryu e Mandels (65), Ooshima *et al.* (52) e Coughlan e Ljungdahl (11). Este modelo tem em consideração as diferenças, já por nós referidas, da composição física e química da celulose bem como da especificidade de cada enzima do complexo celulásico.

O complexo enzimático celulásico é uma sistema induzido pelo substrato (15, 19, 24, 46, 61, 71) contrariamente ao afirmado por Poincelot e Day (59). A celulose tem sido considerada o melhor indutor deste complexo seguido da lactose, celobiose e sorbose (69).

A síntese da celulase é fortemente reprimida pelos produtos solúveis, principalmente por celobiose e glucose (19, 46, 61, 69).

As actividades da endoglucanase e da celobiohidrolase sofrem uma inibição não competitiva pelos produtos (celobiose e glucose) ao passo que, a actividade da β -glucosidase é fortemente inibida pelo produto (glucose) num mecanismo competitivo (36).

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. ALBERSHEIM, P. (1976). The primary cell wall. In: *Plant Biochemistry*. J. Bonner and J.E. Varner (Eds), Academic Press, New York: 225-274.
2. AUGUSTINE, N.R. (1976). Technology transfer from military requirements to public need. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 1-8.
3. BELDMAN, G., SEARLE-VAN LEEWEN, M.F., ROMBOUITS, F.R. and VORAGEN, F.G.J. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. *European Journal of Biochemistry*, 146: 301-308.
4. BISSET, F. and STERNBERG, D. (1978). Immobilization of *Aspergillus* β -glucosidase on chitosan. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 750-755.
5. BROWN, J.A., OGAWA, K. and WOOD, T.M. (1986). Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microbial Technology*, 9: 527-532.
6. CAMPBELL, R. (1985). Microbiology of stems. In: *Plant Microbiology*. Edw. Arnold Ltd. (Publishers), London: 79-105.
7. CHAHAL, D.S. and HAWKSWORTH, D.L. (1976). *Chaetomium cellulolyticum*, a new thermotolerant and cellulolytic *Chaetomium* I. Isolation, description and growth rate. *Mycologia*, 68: 600-610.
8. CHAHAL, D.S. and WANG, D.I.C. (1978). *Chaetomium cellulolyticum*, growth behavior on cellulose and protein production. *Mycologia*, 70: 160-170.
9. CNA - Comissão Nacional do Ambiente - (1982). *Inventariação dos Resíduos Nacionais*. Resíduos Sólidos Urbanos, vol. I.
10. COLAÇO, M.T.A. (s/data). A produção de S.C.P. a partir de resíduos celulósicos de origem agro-industrial. *Alimentação*: 20-25.
11. COUGHLAN, M.P. and LJUNGDAHL, L.G. (1988). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Eds). Academic Press, London: 11-30.
12. COUTTS, A.D. and SMITH, R.E. (1976). Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31: 819-825.
13. COWLING, E.B. and KIRK, T.K. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 95-123.

14. DANIEL, G.F., NILSSON, T. and SINGH, A.P. (1987). Degradation of lignocelluloses by unique tunnel-forming bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 943-948.
15. DESHPANDE, M.V., SRINIVASAN, M.C. and DESHMUKH, S.S. (1987). Effect of fatty acids on cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its mutants. *Biotechnology Letters*, 9: 301-304.
16. D'SOUZA, J. and VOLFOVA, O. (1982). The effect of pH on the production of cellulases in *Aspergillus terreus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16: 123-125.
17. ERIKSSON, K.-E. (1988). Microbial delignification - basics, potentials and applications. In: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Eds). Academic Press, London: 285-302.
18. FAN, L.T., LEE, Y.-H. and BEARDMORE, D.R. (1981). The influence of major structural features of cellulose rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 419-424.
19. FAN, L.T. and LEE, Y.-H. (1983). Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 2707-2733.
20. FELDMAN, K.A., LOVETT, J.S. and TSAO, G.T. (1988). Isolation of the cellulase enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: 262-272.
21. FOLAN, M.A. and COUGHLAN, M.P. (1979). The cellulase complex in the culture filtrate of the thermophilic fungus, *Talaromyces emersonii*. *International Journal of Biochemistry*, 10: 505-510.
22. GARG, S.K. and NEELAKANTAN, S. (1981). Effect of cultural factors on cellulase activity and protein production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 1653-1659.
23. GARG, S.K. and NEELAKANTAN, S. (1982). Effect of nutritional factors on cellulase enzyme and microbial protein production by *Aspergillus terreus* and its evaluation. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 109-125.
24. GARG, S.K. and NEELAKANTAN, S. (1982). Production of SCP and cellulase by *Aspergillus terreus* from bagasse substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2407-2417.
25. GOODWIN, T.W. and MERCER, E.I. (1983). *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press, 2nd Edition, England: 55-91.
26. GOTTSCHALK, G. (1988). Cellulose degradation and the carbon cycle. In: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Eds), Academic Press, London: 3-8.
27. GRAJEK, W. (1987). Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnology Letters*, 9: 353-356.
28. HECHT, V., SCHUGERL, K. and SCHEIDING, W. (1982). Conversion of cellulose into fungal cell mass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16: 219-222.
29. HERR, D., BAUMER, F. and DELLWEG, H. (1978). Purification and properties of an extracellular β -glucosidase from *Lenzites trabea*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5: 29-36.
30. HERR, D., LUCK, G. and DELLWEG, H. (1978). Formation of cellulases and degradation of cellulose by several fungi. *Journal of Fermentation Technology*, 56: 273-278.
31. HOFSTEN, B.V. (1975). Topological effects in enzymatic and microbial degradation of highly ordered polysaccharides. *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*: 281-295.
32. HOFSTEN, B.V. and HOFSTEN, A.V. (1974). Ultrastructure of a thermotolerant basidiomycete possibly suitable for production of food protein. *Applied Microbiology*, 27: 1142-1148.
33. HULME, M.A. and STRANKS, D.W. (1970). Induction and regulation of production of cellulase by fungi. *Nature (London)*, 226: 469-470.

34. KALRA, M.K., SIDHU, M.S., SANDHU, D.K. and SANDHU, R.S. (1984). Production and regulation of cellulases in *Trichoderma harzianum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 20: 427-429.
35. KHAN, A.W., LAMB, K.A. and SCHNEIDER, H. (1988). Recovery of fermentable sugars from the brewer's spent grains by the use of fungal enzymes. *Process Biochemistry*, December: 172-175.
36. KIRK, T.K. (1983). Degradation and conversion of lignocelluloses. In: *The Filamentous Fungi, Fungal Technology* (Vol. IV), J.E. Smith, D.R. Berry and B. Kristiansen (Eds), Edward Arnold Ltd. (Publishers), London: 266-295.
37. KIRK, T.K. and FARREL, R.L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465-505.
38. KOLAROVA, N. and FARKAS, V. (1981). Sensitivity of various Yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13: 184-187.
39. KUBICEK, C.P. (1981). Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13: 226-231.
40. KUBICEK, C.P., PAND, T., SCHREFELKUNAR, G., GRUBER, F. and MESSNER, R. (1987). O-linked but not N-linked glycosylation is necessary for the secretion of endoglucanase I and II by *Trichoderma reesei*. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 698-703.
41. LADUDOVA, I., FARKAS, V., BAUER, S., LOLAROVA, N. and BRANYIK, A. (1981). Characterization of cellulolytic enzyme complexes obtained from mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12: 16-21.
42. LEE, S.B., SHIN, H.S., RYU, D.D.Y. and MANDELS, M. (1982). Adsorption of cellulase on cellulose: Effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2137-2153.
43. LEE, Y.-H. and FAN, L.T. (1982). Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2383-2406.
44. LEHNINGER, A.L. (1984). *Bioquímica*. Edições Omega, S.A., 2ª Ed., Barcelona: 255-274.
45. MANDELS, M. (1982). Cellulases. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 5: 35-77.
46. MANDELS, M. (1985). Application of cellulases. *Biochemical Society Transactions*, 13: 414-416.
47. MANDELS, M., ANDREOTTI, R. and ROCHE, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 21-33.
48. MILLER, T.F. and SRINIVASAN, V.R. (1983). Production of single cell protein from cellulose by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 1509-1519.
49. MILLETT, M.A., BAKER, A.J. and SATTER, L.D. (1976). Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulase saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 125-153.
50. MOLONEY, A.P., CONSIDINE, P.J. and COUGHLAN, M.P. (1983). Cellulose hydrolysis by the cellulases produced by *Talaromyces emersonii* when grown on different inducing substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 1169-1173.
51. OHMINE, K., OOSHIMA, H. and HARANO, Y. (1983). Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 2041-2053.
52. OOSHIMA, H., SAKATA, M. and HARANO, Y. (1983). Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 3103-3114.

53. ORPIN, C.G. (1975). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 91: 249-262.
54. ORPIN, C.G. (1976). Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology*, 98: 423-430.
55. ORPIN, C.G. (1977). The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life-history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology*, 99: 107-117.
56. PAIS, M.S. (1983). *Noções de Biologia Celular*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa: 21-22.
57. PHILLIPS, G.O. (1989). Rediscovering cellulose. *Chemistry in Britain, October*: 1006-1009.
58. PLATT, M.W., HADAR, Y. and CHET, I. (1984). Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 20: 150-154.
59. POINCELOT, R.P. and DAY, P.R. (1972). Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiology*, 23: 875-879.
60. PYC, R., FIECHTER, A. and GALAS, E. (1977). The production of cellulolytic enzymes by fungal cultures. *European Journal of Applied Microbiology*, 4: 151-158.
61. REESE, E.T. and MANDELS, M. (1980). Production of microbial enzymes for cellulose hydrolysis. *Ciência Biológica*, 5: 11-26.
62. REESE, E.T., SIU, R.G.H. and LEVINSON, H.S. (1950). The biological degradation of insoluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 59: 485-497.
63. ROSS, A., SCHUGERL, K. and SCHEIDING, W. (1983). Cellulase production by *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18: 29-37.
64. RYU, D.D.Y., LEE, S.B., TASSINARI, T. and MACY, C. (1982). Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 1047-1067.
65. RYU, D.D.Y. and MANDELS, M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2: 91-102.
66. STERNBERG, D. (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6: 35-53.
67. SZAKACS, G., RECZEY, K., HERNADI, P. and DOBOZI, M. (1981). *Penicillium verruculosum* WA 30 a new source of cellulase. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11: 120-124.
68. TAKAHASHI, M. and KUTSUMI, S. (1979). Purification and properties of xylanase from *Gliocladium virens*. *Journal of Fermentation Technology*, 57: 434-439.
69. TANIGUCHI, M., KATO, T., MATSUNO, R. and KAMIKUBO, T. (1983). Continuous cellulase production by cell-holding culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18: 218-224.
70. TANSEY, M.R. (1971). Agar-diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Archiv fur Mikrobiologie*, 77: 1-11.
71. TSAO, G.T. and CHIANG, L.-C. (1983). Cellulose and hemicellulose technology. In: *The Filamentous Fungi, Fungal Technology* (Vol. IV), J.E. Smith, D.R. Berry and B. Kristiansen (Eds), Edward Arnold Ltd (Publishers), London: 296-326.
72. UZIEE, M. and SASAKI, T. (1987). Purification and properties of cellulase enzymes from *Robillarda* sp. Y-20. *Enzyme Microbial Technology*, 9: 459-465.
73. VAHERI, M.P., VAHERI, M.E.O. and KAUPPINEU, V.S. (1979). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8: 73-80.
74. VIDMAR, S., TURK, V. and KREGAR, I. (1984). Cellulolytic complex of *Aspergillus niger* under conditions for citric acid production. Isolation and characterization of two β -(1 \rightarrow 4)-glucanhydrolases. *Applied Microbiology Biotechnology*, 20: 326-330.
75. WOJTCZAK, G., BREUIL, C., YAMADA, J. and SADDLER, J.N. (1987). A compari-

- son of the thermostability of cellulases from various thermophilic fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, 27: 82-87.
76. WOOD, D.A. (1985). Useful biodegradation of lignocellulose. *Annual Proceedings of Phytochemical Societies of Europe*, 26: 295-309.
 77. WOOD, T.M. (1969). The cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex. *Biochemical Journal*, 115: 457-464.
 78. WOOD, T.M. (1989). Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. M.P. Coughlan (Ed), Elsevier Applied Science, London and New York: 17-35.
 79. WOOD, T.M. and McCRAE, S.I. (1972). The purification and the properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochemistry Journal*, 128: 1183-1192.
 80. WOOD, T.M. and McCRAE, S.I. (1972). The cellulase of *Trichoderma koningii*. *Biochemical Journal*, 171: 61-72.
 81. WOOD, T.M. and McCRAE, S.I. (1982). Purification and some properties of a (1->4)- β -D-glucanglucohydrolase associated with the cellulase from the fungus *Penicillium funiculosum*. *Carbohydrate Research*, 110: 291-303.
 82. WOOD, T.M. and McCRAE, S.I. (1986). The cellulase of *Penicillium pinophilum*. *Biochemistry Journal*, 234: 93-99.
 83. WOOD, T.M. and McCRAE, S.I. (1986). Purification and properties of a cellobiohydrolase from *Penicillium pinophilum*. *Carbohydrate Research*, 148: 331-344.
 84. WOOD, T.M., McCRAE, S.I. and MACFARLANE, C.C. (1980). The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biochemical Journal*, 189: 51-65.
 85. WOOD, T.M., McCRAE, S.I., WILSON, C.A., BHAT, K.M. and GOW, L.A. (1988). Aerobic and anaerobic fungal cellulases, with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose. In: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Eds). Academic Press, London: 31-52.