

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SOLVENTE, CARBOIDRATO E ÁCIDO GRAXO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AÇÚCARES

Ariela V. de Paula, Jayne C. de Souza Barboza e Heizir F. de Castro*

Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, CP 116, 12606-970 Lorena-SP

Recebido em 21/6/04; aceito em 26/1/05; publicado na web em 30/6/05

STUDY OF THE INFLUENCE OF SOLVENT, CARBOHYDRATE AND FATTY ACID IN THE ENZYMATIC SYNTHESIS OF SUGAR ESTERS BY LIPASES. The aim of this work was to gain knowledge of enzymatic processes for the synthesis fatty acid esters of sugar, with the objective to develop an enzymatic process for the preparation of non-toxic biodegradable surface-active agents derived entirely from renewable resources. A wide range of data were collected for reaction conditions involving different sugars (glucose, fructose and sucrose), fatty acids (oleic, palmitic, lauric), solvents (hexane, heptane and t-butanol) and different sources of lipases in both free and immobilized forms. As a solvent t-butanol provided the best conditions to create a catalytic liquid phase in which the reaction occurs. Sugars were preferentially esterified in the following order: fructose > glucose > sucrose, depending on the enzyme preparation. For fructose no influence was found concerning de acyl donor and similar rates were achieved for all tested fatty acids. Ester synthesis was maximized for substrates containing fructose, lauric or oleic acids, t-butanol and lipase from porcine pancreas immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol particles. Under such conditions molar conversions were higher than 50%.

Keywords: lipase; carbohydrate; esters.

INTRODUÇÃO

As mais diversas reações orgânicas (esterificações, inter-esterificações, trans-esterificações e hidrólises) podem ser efetuadas por rotas de síntese empregando catalisador químico ou bioquímico¹. Por meio da biocatálise grandes melhorias de processo podem ser obtidas, principalmente em relação aos custos operacionais (tempo de reação, gasto de energia, mão-de-obra)². Por esta razão, é cada vez mais crescente o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica². Entre esses, especial atenção tem sido dedicada às enzimas lipolíticas, em função de sua alta atividade catalítica exibida em diversos meios orgânicos, catalisando a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água¹⁻³.

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacológicas (síntese de naxopreno e ibuprofeno), agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biossurfactantes)³⁻⁶.

Dentre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, em função da importância de inúmeros ésteres na vida cotidiana⁷. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolípídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem⁶⁻⁸.

Industrialmente, a esterificação empregando a lipase foi comercializada pela Unichema International para produção de ésteres de ácidos graxos com alto grau de pureza e qualidade, como o miristato de isopropila, palmitato de isopropila e palmitato de 2-etil hexila, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite

a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subsequentes⁷.

Uma outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, principalmente para uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos⁸⁻¹¹. A síntese enzimática destes compostos, em solventes orgânicos, é mais específica e viável que a produção química a partir de vegetais, porque independe de estação, clima e variação geográfica e não requer grandes quantidades de matéria-prima. O mercado mundial para esses compostos está avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor do mercado de aditivos alimentares⁹. Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor¹⁰.

Outro campo de aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres de ácidos graxos e açúcares, que apresentam larga aplicação como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos¹²⁻¹⁴. Além de seu efeito conservante, ésteres de carboidratos e ácidos graxos têm sido associados como agentes antitumor e inibidores do crescimento de plantas. Os ésteres de açúcares são moléculas anfífilas que apresentam, na mesma estrutura, uma parte apolar (hidrofóbica) e uma parte polar (hidrofílica)¹⁵. Em função disso, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) formando um filme molecular, que reduz as tensões interfacial e superficial, atribuindo propriedades únicas aos surfactantes, tais como detergentes, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases¹⁵.

O processo é baseado na esterificação de carboidratos (glicose, frutose, sacarose e sorbitol) com ácidos graxos (esteárico, oléico e linoléico) usando lipases de diferentes fontes¹²⁻¹⁴. Entretanto, a esterificação direta de açúcares com ácidos graxos por lipases é um procedimento bastante complexo, devido à baixa solubilidade dos açúcares em meios orgânicos¹³. Conversões elevadas têm

*e-mail: heizir@dequi.faequil.br

sido reportadas usando piridina como solvente, no entanto, esse tipo de solvente é incompatível com aplicações em aditivos alimentares. Outras soluções são baseadas no uso de açúcares protegidos, que requerem etapas adicionais de síntese^{13,15}.

Nos últimos anos, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas ou desenvolvidas para estudo e otimização de biotransformações¹⁶, como, por ex., imobilização da enzima, modificação enzimática por engenharia genética ou via interação não-covalente “imprinting”, reincubação do produto ou do substrato, modificação do substrato, mapeamento do sítio ativo, estudo da variação do solvente “solvent engineering” e estudo da variação dos doadores acila em reações de síntese¹⁶. Destas, a técnica que utiliza o estudo da variação do solvente é a que apresenta menor custo, maior flexibilidade e velocidade na execução².

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é determinar a influência da polaridade e natureza do solvente, bem como o tipo de carboidrato e tamanho da cadeia do doador do grupo acila na condução de reações de síntese de ésteres de açúcares de ácidos graxos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Como catalisadores foram utilizadas preparações comerciais de lipase imobilizada (Lipozyme e Novozym 435) fornecidas pela Novozymes (Araucária, PR), lipase microbiana de *Candida rugosa*-LCR (Tipo VII, Sigma) na forma livre e imobilizada em sílica de porosidade controlada (SPC)¹⁷ e lipase de pâncreas de porco-LPP (Tipo II, Sigma) na forma livre e imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)¹⁸. Ambas preparações de lipase imobilizadas foram obtidas na presença do agente estabilizante polietilenoglicol (MM-1500). A determinação das atividades lipolíticas dessas preparações foi efetuada pelo método de hidrólise do azeite de oliva¹⁹ (Tabela 1). Como carboidratos foram usados frutose - grau analítico, glicose—Química Moderna ou sacarose - grau comercial e ácido graxo (láurico, palmítico-Merck ou oléico-Reagen) dissolvidos em diferentes solventes orgânicos (heptano, hexano-Reagen ou terc-butanol-Merck). Os substratos foram previamente desidratados com peneira molecular 0,32 cm de diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals.

Tabela 1. Propriedades catalíticas das preparações de lipases testadas

Lipase	Atividade*(U/mg de amostra)
Lipozyme (Novozymes)	210
Novozym 435 (Novozymes)	37
<i>Candida rugosa</i> (LCR)	
forma livre	3400
imobilizada em SPC	153
Pâncreas de porco (LPP)	
forma livre	2156
imobilizada em POS-PVA	571

* Uma unidade de atividade¹⁹ foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por min de reação a 37 °C.

Procedimento de síntese de ésteres de açúcares de ácidos graxos

As sínteses foram realizadas em frascos de 50 mL contendo misturas adequadas de carboidrato (frutose, glicose, ou sacarose) e

ácido graxo (láurico, palmítico ou oléico) dissolvidos em diferentes solventes orgânicos (heptano, hexano ou terc-butanol) e diferentes preparações de lipase livre e imobilizada, em uma proporção de 5 e 10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes, respectivamente. As reações foram conduzidas em uma temperatura de 38 ± 2 °C, por um período mínimo de 24 h em banho termostático com agitação (Modelo 145, Marconi). O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas (1 mL), ao longo da reação e quantificado o teor de ácido graxo.

Teor de ácido graxo

A concentração de ácido graxo foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol p.a. (98°GL, Comercial), empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02N (Merck) e fenolftaleína como indicador²⁰, utilizando bureta digital de 50 mL (Hirshmann Techcolor). A conversão do substrato foi expressa em porcentagem molar do ácido graxo consumido, empregando-se a Equação 1.

$$\% \text{ Molar} = [(C_0 - C) / C_0] \times 100 \quad (1)$$

em que C_0 = concentração inicial do ácido graxo e C = concentração do ácido graxo em um determinado tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência do solvente

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima²¹. Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água necessária à enzima²². Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da camada protéica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para manutenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos²¹.

Neste trabalho, adotando o sistema reacional constituído de ácido oléico/frutose e lipase imobilizada (Lipozyme), foi inicialmente verificada a influência do solvente na formação de oleato de frutose. As reações de esterificação foram efetuadas com frutose e ácido oléico em uma razão molar (1:3) empregando os solventes heptano, hexano ou terc-butanol. O meio reacional foi incubado com 0,25 g de Lipozyme por um período máximo de 48 h (Tabela 2). Em função do bom desempenho apresentado pela Lipozyme como amplamente divulgado na literatura²², esta preparação foi selecionada para efetuar esses testes iniciais.

Tabela 2. Influência do solvente na conversão molar do ácido oléico na síntese do oleato de frutose catalisada por Lipozyme

Solvente	Conversão molar (%)	Taxa de evaporação (g/h)*
Heptano	11,7	0,06
terc-Butanol	9,4	0,05
Hexano	0	0,22

*taxa de evaporação dos solventes empregados na mesma reação de esterificação, utilizando a mesma massa de enzima previamente desnaturada (37 °C, 48 h).

Conversões molares mais elevadas (11,7%) foram obtidas quando se utilizou heptano como solvente. Terc-butanol forneceu uma

conversão molar de 9,4%, enquanto que na presença de hexano não foi observada reação. A utilização do hexano acarretou um aumento na concentração inicial do ácido oléico, provavelmente devido à elevada evaporação desse solvente, mesmo em sistemas fechados na temperatura de 37 °C.

Para verificar uma eventual interferência da evaporação dos solventes no rendimento de reação foram realizados testes para determinar a taxa de evaporação para cada solvente testado, empregando uma massa de 0,25 g de Lipozyme previamente desnaturada. O biocatalisador inativo foi adicionado ao sistema contendo frutose, ácido oléico e solvente, nas mesmas condições usadas nas reações de esterificação, sendo determinada a perda de massa em intervalos de 24 h e concentração de ácido graxo ao final do período total de ensaio. Os experimentos foram realizados em duplicata e foi considerado o solvente como único composto que sofreu evaporação. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2 e confirmam que, nas condições utilizadas, a maior taxa de evaporação (0,22 g solvente/h) foi constatada para substratos preparados com o solvente hexano. As taxas de evaporação dos solventes heptano e terc-butanol foram similares.

Entre os solventes testados, terc-butanol foi selecionado para realização dos testes subsequentes, pois permitiu a solubilização parcial dos materiais de partida (açúcares) sendo, ao mesmo tempo, atóxico e compatível com a atividade enzimática.

Seleção da preparação de lipase

Nesta série de experimentos foram testadas as diferentes preparações enzimáticas, adotando-se o sistema reacional frutose, ácido oléico e terc-butanol. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 1.

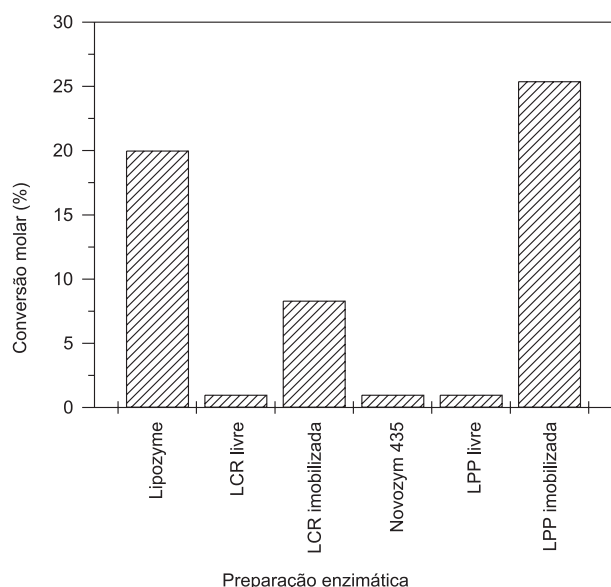


Figura 1. Influência da preparação de lipase na síntese enzimática do oleato de frutose. As reações foram efetuadas com frutose e ácido oléico, em razão molar (1:3), usando terc-butanol como solvente e diferentes preparações de lipase (Lipozyme, Novozym 435), lipase de *Candida rugosa* (LCR) livre e imobilizada em sílica de porosidade controlada e lipase pancreática (LPP livre e imobilizada) por 48 h

Entre as lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Lipozyme e Novozym 435), somente a Lipozyme forneceu resultados satisfatórios (conversões molares de até 20%). Esses resultados serviram de parâmetro de comparação com aqueles alcançados pelas preparações de lipase microbiana de *Candida rugosa* e lipase pancreática nas formas livre e imobilizada.

As lipases (microbiana e pancreática) quando utilizadas em sua forma livre não foram adequadas para catalisar a síntese do oleato de frutose (conversão próxima de zero), confirmando a necessidade de assegurar uma conformação cataliticamente ativa da enzima em solventes orgânicos, por meio de sua insolubilização em suportes sólidos^{23,24}. A imobilização das lipases de *Candida rugosa* e pancreática nos suportes sílica de porosidade controlada e composto híbrido POS-PVA, respectivamente, teve um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização também auxiliou a dispersão homogênea da enzima no meio, o que foi essencial para a condução das reações de síntese²².

Resultados mais promissores foram obtidos com a lipase pancreática imobilizada no suporte híbrido POS-PVA; este derivado forneceu uma conversão molar similar (25,4%) àquela obtida pela Lipozyme (20%), provavelmente devido ao caráter hidrofóbico da matriz de imobilização POS-PVA. Um outro fator que pode ter contribuído para o bom desempenho deste sistema imobilizado pode estar relacionado com a presença do agente estabilizante polietilenoglicol, o qual foi adicionado na etapa de imobilização da lipase no suporte POS-PVA, conforme metodologia anteriormente desenvolvida por Soares *et al.*¹⁷. Reações de síntese catalisadas por lipases imobilizadas na presença de PEG têm demonstrado um desempenho consistente e altamente satisfatório^{23,25,26} devido, provavelmente, às interações hidrofóbicas entre o PEG, a enzima e o suporte.

Considerando que ambos biocatalisadores tiveram desempenhos bastante similares e devido ao elevado custo da Lipozyme²², selecionou-se a lipase pancreática imobilizada em POS-PVA para catalisar as reações de síntese dos ésteres de açúcares.

Influência do carboidrato e ácido graxo no rendimento de esterificação empregando lipase pancreática imobilizada em POS-PVA

Tendo sido selecionado o biocatalisador (lipase pancreática imobilizada em POS-PVA) e o solvente mais adequado para medir a síntese de ésteres de açúcares, verificou-se a influência das outras variáveis (tipo de carboidrato e ácido graxo) no rendimento da reação. As Figuras 2 a 4 apresentam os perfis das curvas de

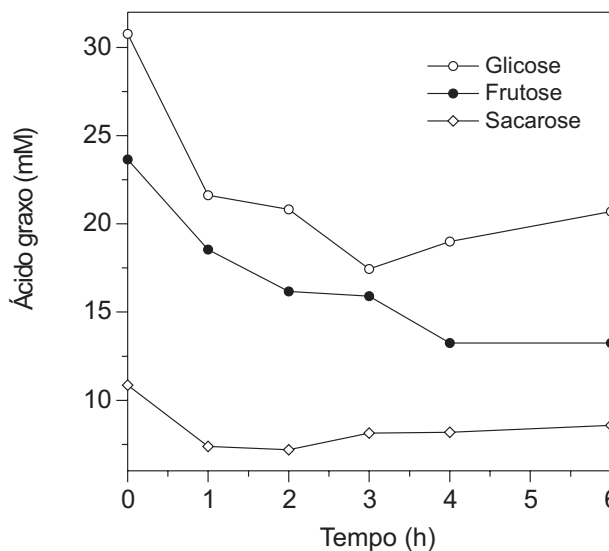


Figura 2. Influência do tipo de carboidrato no consumo do ácido láurico na formação de ésteres de açúcares. As reações foram efetuadas com diferentes carboidratos e ácido láurico em razão molar (1:3), usando terc-butanol como solvente e 0,5 g da lipase pancreática imobilizada em POS-PVA (6 h)

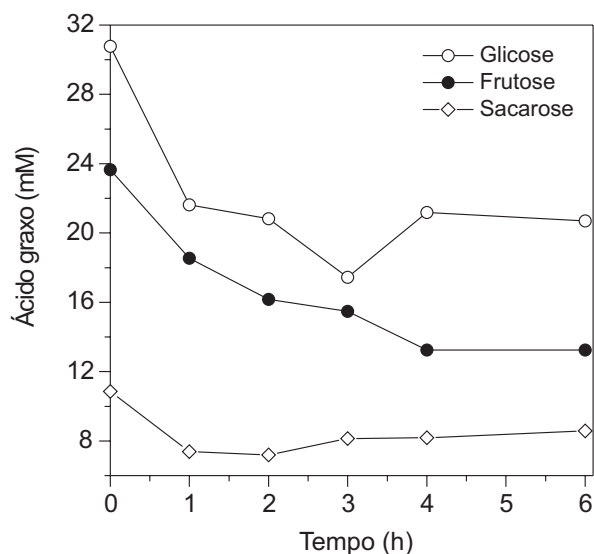


Figura 3: Influência do tipo de carboidrato no consumo do ácido palmítico na formação de ésteres de açúcares. As reações foram efetuadas com diferentes carboidratos e ácido palmítico em razão molar (1:3), usando terc-butanol como solvente e 0,5 g da lipase pancreática imobilizada em POS-PVA (6 h)

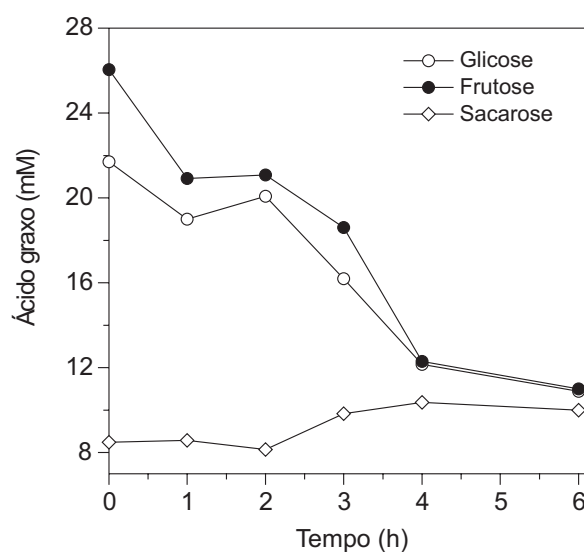


Figura 4: Influência do tipo de carboidrato no consumo do ácido oléico na formação de ésteres de açúcares. As reações foram efetuadas com diferentes carboidratos e ácido oléico, em razão molar (1:3), usando terc-butanol como solvente e 0,5 g da lipase pancreática imobilizada em POS-PVA (6 h)

Tabela 3. Influência do carboidrato e ácido graxo no rendimento da esterificação empregando lipase pancreática imobilizada em POS-PVA

Carboidrato	Ácido graxo	Máxima conversão(%)	Tempo (h)
Glicose	láurico	27,3	2
	palmítico	43,3	3
	oléico	49,8	6
Frutose	láurico	50,0	3
	palmítico	44,0	4
	oléico	52,8	4
Sacarose	láurico	8,4	4
	palmítico	33,7	2
	oléico	4,1	2

Concentração dos açúcares: 450 μ M; concentração de ácidos graxos: 2250 μ M; lipase: 0,5 g LPP imobilizada em POS-PVA; tempo máximo de reação: 6 h

consumo de cada ácido graxo para os três tipos de carboidratos testados. Na Tabela 3 apresenta-se, para cada par carboidrato e ácido graxo testado, a conversão máxima de ácido graxo obtida.

De maneira geral, verifica-se que o ácido palmítico promoveu formação do éster para todos os carboidratos testados, sendo que a reação enzimática ocorreu em ordem crescente (frutose > glicose > sacarose). O ácido oléico foi efetivo para formação do oleato de frutose (52,8%) e oleato de glicose (49,8%), com rendimentos bastante similares. Entretanto, não promoveu conversões eficientes para o carboidrato sacarose, alcançando apenas uma conversão da ordem de 4,1%, possivelmente devido ao tamanho da cadeia deste carboidrato provocando, nesse caso particular, um impedimento estérico da enzima.

O ácido láurico apresentou um comportamento similar ao obtido pelo ácido oléico, entretanto apenas o laurato de frutose foi obtido com rendimentos elevados (conversão de 50%). Entre todos os sistemas reacionais testados, o melhor desempenho foi alcançado pelo par frutose e ácido oléico.

Os resultados obtidos no presente trabalho são bastante satisfatórios, quando comparados com aqueles reportados na literatura, conforme mostrado na Tabela 4. Tais resultados podem ser creditados à especificidade da enzima selecionada e ao suporte de imobilização.

Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos com dados descritos na literatura

Açúcar	Ácido graxo	Solvente	Enzima	Máxima conversão	Ref.
Frutose	Ácido palmítico	2-metil-2-butanol	<i>Candida antarctica</i> imobilizada	28,5%	14
Frutose	Ácido butírico	acetonitrila	LPP imobilizada em PET	10,6% (5 dias)	26
Frutose	Ácido láurico	hexano	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina de troca iônica	85% (4 dias)	28
Frutose	Ácido oléico	terc-butanol	LPP imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico	52,8% (4 h)	Este trabalho

CONCLUSÕES

A reação de síntese foi maximizada quando se utilizou como solvente terc-butanol, pois permitiu a solubilização parcial dos materiais de partida (carboidratos) sendo, ao mesmo tempo, atóxico e compatível com a atividade enzimática. A influência do tipo de açúcar depende da preparação enzimática utilizada, enquanto a conversão do ácido graxo foi dependente do tipo de carboidrato usado. Conversões mais elevadas foram alcançadas quando se empregou frutose como carboidrato (conversão molar > 44%) independente do tipo de ácido graxo. O sistema constituído de frutose, ácido oléico, terc-butanol e lipase imobilizada em POS-PVA (polisiloxano-álcool polivinílico) foi o mais efetivo na obtenção de ésteres de açúcares.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os auxílios financeiros recebidos da FAPESP (Processo N ° 03/00654-9) e CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Faber, K., ed. Em *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*; 3rd ed., Springer Produktions-Gesellschaft: Berlin, 1997, cap. 2.
2. Ayres-Barros, M. R.; *Bol. Biotechnol.* **2002**, *72*, 2.
3. Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T. Em *A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology*; Rehm, H. J.; Stader, P., eds.; 1998, vol. 8A, p. 38.
4. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V. T.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 119.
5. Saxena, R. K.; Ghosh, P. K.; Gupta, R.; Davidson, W. S.; Bradoo, S.; Gulati, R.; *Current Science* **1999**, *77*, 101.
6. Jaeger, K. E.; Ransak, S.; Koch, H. B.; Ferrato, F.; Dijkstra, B. W.; *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 29.
7. Novo Nordisk, Em *Catálogo Informativo*; 1995, p. 30.
8. Yahya, A. R. M.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 438.
9. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Advances* **2001**, *19*, 627.
10. Gatfield, I. L.; *Food Sci. Technol. Today* **1995**, *9*, 237.
11. Gandhi, N. N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 621.
12. Chamouveau, F.; Coulon, D.; Girardin, M.; Ghoul, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 949.
13. Lotie, R.; *Biotechnol. Advances* **1997**, *15*, 1.
14. Cao, L.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 275.
15. Nitschke, M.; Pastore, G. M.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 772.
16. Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 120.
17. Soares, C. M. F.; Castro, H. F.; Santana, M. H. A.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *98/100*, 703.
18. Bruno, L. M.; Lima Filho, J. L.; Melo, E. H. M.; Castro, H. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *113/116*, 189.
19. Soares, C. M. F.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77/79*, 745.
20. Macedo, G.; Pastore, G. M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1997**, *17*, 115.
21. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veger, C.; *Biotechnol. Bioeng* **1987**, *30*, 81.
22. Castro, H. F.; Anderson, W. A.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 544.
23. Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J. M.; Haas, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 11.
24. Tischer, W.; Kasche, V.; *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 326.
25. Rocha, J. M. S.; Gil, M. H.; Garcia, F. A. P.; *J. Biotechnol.* **1998**, *66*, 61.
26. Castro, H. F.; Lima, R.; Roberto, I. C.; *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 1061.
27. Bagi, K.; Simon, L. M.; *Biotechnol. Techniques* **1999**, *13*, 309.
28. Tsitsimpkou, C.; Daflos, H.; Kolisis, F. N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, *3*, 189.