

OBTENÇÃO DE VANILINA: OPORTUNIDADE BIOTECNOLÓGICA

Andreas Dausch* e Gláucia Pastore

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-970 Campinas - SP

Recebido em 8/3/04; aceito em 14/12/04; publicado na web em 13/4/05

PRODUCTION OF VANILLIN: A BIOTECHNOLOGICAL OPPORTUNITY. Natural aroma compounds are of major interest to the food and fragrance industry. Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) was isolated from the vanilla beans in 1816 and its world consumption has reached today about 12000 tons per year. But only approximately 50 tons per year are extracted from vanilla pods (*Vanilla planifolia*). The remainder is provided by synthetic vanillin. This review is about alternative processes to produce natural vanillin *de novo* or by biotransformation using biotechnological methods involving enzymes, microorganisms and plant cells.

Keywords: biotransformation; vanillin; review.

INTRODUÇÃO

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um dos compostos aromáticos mais apreciados no mundo e um importante flavorizante para alimentos, bebidas e é usada também em produtos farmacêuticos¹. Ela possui vários efeitos como prevenção de doenças, antimutagênico, antioxidante, conservante e antimicrobiano²⁻⁴.

O aroma de baunilha, ou seja, a vanilina, é obtida da planta *Vanilla planifolia* na forma de gluco-vanilina, na proporção de 2% em peso. A fonte natural da gluco-vanilina (a vagem da baunilha) pode fornecer apenas 20 t métricas das 12000 t métricas consumidas anualmente (cerca de 0,2%)⁵.

A produção de baunilha é um processo trabalhoso e de alto custo (a vanilina de extrato natural rende US\$ 4000 por kg). Existe também a vanilina artificial, comumente derivada de licores de sulfito, produzidos durante o processamento da polpa de madeira para a fabricação de papel⁶. Porém, o extrato sintético de vanilina fornece apenas a nota sensorial principal do “flavour” de baunilha. Além disso, esse tipo de produção rende somente US\$ 12 por kg para a indústria. Esses números demonstram o interesse industrial em encontrar novas alternativas para a produção de vanilina natural, que poderiam fornecer um preço significativamente maior quando comparado à produção sintética de vanilina.

A distinção entre a vanilina natural e a sintética pode ser feita através de vários métodos analíticos como, por ex., análises de isótopos. Nesta análise é feito um perfil de isótopos usando um espectro de massa (¹³C EMPI) ou o método de ressonância magnética nuclear (²H-RMN) onde é possível distinguir a origem natural ou sintética da vanilina, já que a percentagem de ¹³C na vanilina de origem da orquídea *Vanilla planifolia* difere da sintética⁷⁻¹³.

Os métodos de análise usados para controle de qualidade incluem cinzas, acidez total, espectroscopia UV, cromatografia de camada delgada e em papel¹⁴⁻¹⁶, cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência^{17,18}.

De acordo com as normas européias e norte-americanas, classificam-se como produtos “naturais”, os compostos obtidos de fontes biológicas, como as biotransformações em que se empregam as enzimas ou suas células vivas de fontes naturais. Para a indústria, tem-se tornado cada vez mais importante o uso de compostos

aromatizantes que possam ser denominados “naturais”, a fim de obter a aceitação do consumidor.

A vanilina produzida biotecnologicamente é considerada um produto natural e pode ser produzida com baixos custos, a partir do uso de fontes renováveis. Ela pode ser produzida biotecnologicamente através de extratos enzimáticos ou enzimas purificadas, microorganismos e cultura de células de planta⁵. Os principais precursores para a produção biotecnológica de vanilina são eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico e outros menos utilizados¹⁹.

Recentemente, foi desenvolvida uma alternativa para obtenção de vanilina, tendo a glicose como precursor. A D-glicose é transformada, utilizando-se *Escherichia coli* recombinante, em ácido vanílico, o qual é, subsequentemente, reduzido a vanilina, utilizando-se a atividade de aldeído desidrogenase²⁰.

Devido à toxicidade celular da vanilina, esta não é facilmente formada em grandes quantidades em sistemas microbiológicos. Em geral, concentrações de vanilina acima de 1 g/L inibem o crescimento de microrganismos. Neste caso, torna-se difícil encontrar vanilina no sistema microbiano, mas pode-se encontrar álcool vanílico ou ácido vanílico²¹. A álcool vanílico oxidase do fungo *Penicillium simplicissimum* foi descrita como um catalisador da oxidação de álcool vanílico para vanilina^{22,23}.

A biotransformação do ácido ferúlico, eugenol, isoeugenol e outros em vanilina pode ser feita enzimaticamente. Um rendimento de vanilina de até 17 g/L foi obtido pelo tratamento de isoeugenol com lipoxidase. Enquanto que o eugenol tratado com lipoxidase resultou em concentrações bem mais baixas que 0,5 g/L, o ácido ferúlico não pode ser transformado em vanilina usando-se lipoxidase. Economicamente, esses resultados ainda não são viáveis²⁴.

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE VANILINA POR MICRORGANISMOS

A bioconversão de ácido ferúlico e outros precursores nos seus correspondentes aldeídos, álcoois e ácidos carboxílicos por microrganismos oferece a possibilidade de produção de vanilina natural²⁵. A produção de compostos aromáticos por fermentação microbiológica tem muitas vantagens comparada à síntese química e enzimática (enzimas puras ou extratos enzimáticos). Em relação à síntese química, as vantagens de se usar microrganismos são: acesso à atividade e especificidade enzimáticas, condições bran-

*e-mail: dausch@fea.unicamp.br

das de reação, o que torna possível reduzir custos e a possibilidade de produzir os aromas diretamente no alimento. Em relação à síntese enzimática, as vantagens de se usar microrganismos são a reciclagem de cofatores necessários nas reações enzimáticas, a disponibilidade de enzimas e cofatores do próprio sistema biológico do microrganismo e uma atividade enzimática estável²⁶.

As limitações da síntese biotecnológica utilizando-se microrganismos são o rendimento baixo do produto, pois o mesmo não é acumulado; a toxicidade do substrato e do produto aos microrganismos; e tempos longos de fermentação. Algumas fermentações são difíceis de proceder, devido à morfologia dos microrganismos (dificuldades de aeração, alta viscosidade, etc.)²⁷. Os subprodutos apresentam 'off flavours' (e.g. vinila guaiacol), os quais devem ser removidos completamente, caso o produto seja utilizado em indústria de flavorizantes.

A formação de vanilina utilizando-se bactérias foi estudada. Isoeugenol ou eugenol foram usados na biotransformação, utilizando-se espécies de *Corynebacterium*²⁸, *Serratia* e *Enterobacter*²⁹. Vanilina, ácido ferúlico e ácido vanilínico foram identificados como intermediários no metabolismo de eugenol de *Pseudomonas*^{28,30}. Foi investigado um plasmídeo catabólico de *Pseudomonas* sp. para o metabolismo de ácido ferúlico³¹.

As vias β -oxidativas e não β -oxidativas foram descritas na bioconversão do ácido ferúlico em vanilina por *Pseudomonas fluorescens*³². As vias não β -oxidativas da degradação de ácido ferúlico foram estudadas, recentemente, com o microrganismo termofílico *Bacillus* sp. retirado de madeira em decomposição e fontes de água quente³³. Existe um terceiro caminho para a degradação de ácido ferúlico em vanilina. Este mecanismo não direto e não- β -oxidativo foi estudado no microrganismo *Delftia acidovorans*. Este caminho poderia levar a um novo processo biotecnológico para a produção de vanilina³⁴.

A biotransformação em vanilina foi realizada em duas etapas, sendo que na primeira o recombinante *Escherichia coli* XL1-Blue (pSKvaom-PcalAmcalB) transformou eugenol em ácido ferúlico, com rendimento de 14,7 g/L, depois de uma fermentação de 30 h. O gene *vaoA* foi retirado do *Penicillium simplicissimum* CBS 170.90, produzindo a enzima álcool vanílico oxidase. Os genes *calA* e *calB* foram retirados de *Pseudomonas* sp. HR199, produzindo as enzimas álcool coniferílico desidrogenase e aldeído coniferílico desidrogenase. Na segunda etapa, o recombinante *Escherichia coli* (pSKeche/Hfcs) fez a conversão do ácido ferúlico em vanilina, com rendimento de 0,3 g/L³⁵.

Streptomyces setonii acumulou vanilina até uma concentração de 6,4 g/L e um rendimento molar de 68%. Guaiacol e ácido vanílico também foram produzidos e participam no aroma de vanilina.

O efeito tóxico do formaldeído produzido durante a degradação de monômeros de lignina, como a vanilina e o ácido vanílico, foi estudado com o microrganismo *Burkholderia cepacia* TM1. Encontraram-se duas enzimas que podem ser usadas na detoxificação através da incorporação do formaldeído³⁶.

A bactéria *Nocardia* sp. NRRL 5646 foi utilizada na conversão de ácido vanílico e ácido o-benzil vanílico em vanilina, usando células completas ou preparação de enzimas. A enzima ácido carboxílico redutase de *Nocardia* sp., que depende de ATP e NADPH, reduziu quantitativamente o ácido vanílico em vanilina³⁷.

O microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 foi analisado e encontraram-se dois genes essenciais, *ferA* e *ferB*, responsáveis pela degradação do ácido ferúlico a vanilina. O gene *ferB* tem uma similaridade na seqüência dos aminoácidos de 40 até 48% com as enzimas encontradas em *Pseudomonas* e *Amycolatopsis*. Já o gene *ferA* possui uma similaridade de 31% com uma enzima encontrada no *Pseudomonas mendocina* 35³⁸.

Dois genes responsáveis pela degradação de vanilina em *Pseudomonas* sp. HR199 produzindo a enzima protocatecóico 3,4-dioxigenase foram caracterizados molecularmente^{39,40}. Posteriormente, o catabolismo de ácido ferúlico em *Pseudomonas* sp. HR199 foi analisado bioquímica e geneticamente⁴¹. *Pseudomonas fluorescens* E118 pode ser usado para a produção de ácido ferúlico através de eugenol com um rendimento de 6,1 g/L⁴².

A bactéria *Bacillus coagulans* foi isolada de madeira em decomposição, a qual utiliza como fonte de carbono. Tendo em vista este fato, a bactéria pode apresentar uma facilidade para crescer na presença de ácido ferúlico. Neste caso a biotransformação foi testada como a linhagem de *Bacillus coagulans* BK07, a qual mostrou uma rápida descarboxilação de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol, o qual foi imediatamente convertido em vanilina e oxidado para ácido vanílico. O ácido vanílico foi, então, desmetilado e obteve-se ácido protocatecóico⁴³.

O microrganismo *Streptomyces setonii*, através do metabolismo do ácido ferúlico, é capaz de produzir vanilina e ácido protocatecóico⁴⁴.

Escherichia coli recombinante foi usada como biocatalisador na produção de vanilina, utilizando como substrato a glicose. Primeiramente, a glicose foi convertida em ácido vanílico, que foi então reduzido a vanilina pela enzima aril aldeído desidrogenase, isolada de *Neurospora crassa*²⁰.

Alguns fungos podem ser usados na bioconversão de ácido ferúlico em ácido vanílico e vanilina. Como ex. podem-se citar os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e o basidiomiceto *Pycnoporus cinnabarinus*^{45,46}. Foi analisada a produção de vanilina através de *Pycnoporus cinnabarinus* usando [5-2H] ácido ferúlico⁴⁷. A produção de vanilina através de ácido ferúlico em presença de celobiose produziu vanilina e álcool vanílico⁴⁸⁻⁵⁰. *Pycnoporus cinnabarinus* foi usado para a produção de vanilina de ácido vanílico com rendimento de 1260 mg/L⁵¹. A biotransformação de ácido ferúlico em ácido vanílico pode ser feita através do microrganismo *Sporotrichum thermophile* com um rendimento de 4798 mg/L⁵².

Em concentrações de vanilina acima de 1 g/L ocorre uma inibição do crescimento de microrganismos. Uma maneira possível de superar esse problema é utilizar um solvente aquoso-orgânico em um sistema de duas fases, acumulando vanilina na fase orgânica e reduzindo sua concentração na fase aquosa. Lee *et al.*⁵³ reportaram um rendimento superior de biotransformação do ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol utilizando o n-pentano, n-hexano ou n-octano como fase orgânica. Outra maneira de aumentar o rendimento é a extração contínua do produto pela extração da fase sólida⁵⁴.

A β -ciclodextrina foi utilizada para separar e concentrar vanilina pela formação de complexos de inclusão e gerou resultados satisfatórios, como o aumento de rendimento de vanilina²⁰. A habilidade das ciclodextrinas de formar complexos de inclusão estáveis com moléculas orgânicas provocou uma mudança nas propriedades físicas dos ligantes, incluindo sua solubilidade em meios aquosos, e diminuiu a inibição do substrato e do produto⁵⁵⁻⁵⁷.

A absorção de vanilina por polímeros especiais e sua posterior remoção a altas temperaturas permite a diminuição da concentração de vanilina na fase aquosa, reduzindo os problemas da inibição através da toxicidade celular da vanilina e permitindo a extração do produto⁵⁸. Pela aplicação de um adsorvente seletivo usando *Phanerochaete chrysosporium*, a formação de álcool vanílico foi reduzida com sucesso e o rendimento de vanilina aumentou⁵⁹. A vanilina foi oxidada para ácido vanílico pela aldeído óxido-redutase reversível e o ácido vanílico foi reduzido para álcool vanílico pela álcool desidrogenase⁶⁰.

A bioconversão com temperaturas elevadas, próximas à de ebulição da água, foi reportada para *Pyrococcus furiosus*²⁵.

Além dos precursores já mencionados acima, aldeído protocatecico, ácido cafeico e estilbenos fenólicos foram utilizados como substrato para a biotransformação em vanilina⁶¹⁻⁶⁶.

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE VANILINA POR CULTURA DE CÉLULAS DE PLANTA

A biotransformação de compostos sintéticos e naturais utilizando culturas de células de plantas é um método possível para a síntese de vanilina e que tem recebido bastante atenção⁶⁷. As plantas são fontes de diversas substâncias químicas inclusive aromas, drogas, pigmentos e agroquímicos. Algumas das reações que ocorrem em células de plantas são complexas e não podem ser alcançadas facilmente por caminhos sintéticos. Para produzir essas reações complexas, as células de plantas, a cultura de órgãos e as enzimas de plantas são os biocatalisadores adequados. As reações mediadas por biocatalisadores (oxidações, reduções, hidroxilações, metilações, acetilações, isomerizações, glicosilações, esterificações, etc.) são produzidas em valores de pH e temperatura não extremos e são regio e estereosseletivas⁶⁸.

Fitormônios e elicitores são necessários para produzir vanilina através de culturas de tecidos de plantas⁶⁹. Por ex., um extrato aquoso de micélios de *Aspergillus niger* foi usado como um elicitador de fungos¹⁹. Além disso, diversas biotransformações, como a do ácido ferúlico e vanilil-amina em capsaicina e vanilina, foram efetuadas utilizando células de plantas e fitormônios^{70,71}. O crescimento celular máximo acontece durante a fase em que as células estão indiferenciadas, ou seja, em que as células desenvolvem somente metabolismo primário. Muitos compostos aromáticos são produzidos somente a partir do metabolismo secundário, que ocorre só durante a fase em que as células já estão diferenciadas. O problema é que nesta fase de células diferenciadas o crescimento celular é baixo⁷².

PATENTES/APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Recentemente foi mostrada uma boa aplicação industrial para a produção de vanilina, através de um processo fermentativo do ácido ferúlico, no qual empregou-se o microrganismo *Amycolatopsis*, cuja produção de vanilina atingiu a concentração de 11,5 g/L⁷³⁻⁷⁵. No processo fermentativo com o fungo *Pycnoporus* a mesma reação levou somente a uma produção de 46 mg/L de vanilina^{76,77}.

A Kraft General Foods descreveu o processo no qual *Pseudomonas putida* ATCC 55180 acumulou uma concentração de até 210 mg/L de vanilina, através do ácido ferúlico, em 54 dias. Tal concentração pode ser obtida pela adição de um agente redutor (tiol glicol) à cultura de fermentação para reduzir a produção de ácido vanílico, favorecendo a produção de vanilina. A biotransformação do eugenol em vanilina apresentou uma concentração de apenas 3,6 mg/L de vanilina. Nesse sentido, o ácido ferúlico apresenta-se como um melhor substrato para a produção de vanilina⁷⁸.

Um acúmulo de até 280 mg/L de vanilina foi obtido pela linhagem de *Pseudomonas* sp. TK2102 (FERM P-12689) através do eugenol. Além disso, nesta reação foram identificados outros metabólitos que incluem álcool coníferflico, aldeído coníferflico, álcool vanílico e ácido ferúlico⁷⁹.

A bactéria *Serratia marcescens* oxidou o isoeugenol em vanilina em concentrações de até 3,8 g/L (com um rendimento teórico de 5% e velocidade de biotransformação de apenas 0,018 g/L por h). O eugenol como precursor apresentou um menor rendimento de vanilina (apenas 18 mg/L) por um período de 13 dias⁸⁰.

Aminoácidos aromáticos (metoxitirosina) foram usados como

substratos iniciais para a produção de vanilina utilizando *Proteus vulgaris* CMCC2840.

Uma nova dioxigenase (*Pseudomonas* sp) foi patenteada, a qual clivou estilbenos naturais, uma matéria-prima em potencial para a produção de vanilina⁸¹.

Enzimas sintéticas foram patenteadas e produzem, além de outros, ácido ferúlico, vanilina e ácido vanílico⁸².

A produção de vanilina em cultura de *Vanilla planifolia* e em plantas intactas, inclusive células e plantas transgênicas, foi patenteada, mas o rendimento obtido não foi economicamente interessante⁸³. É provável que, no futuro, novos sistemas microbiológicos, que acumulem uma maior concentração de vanilina, sejam descobertos⁸⁴.

CONCLUSÃO

Pelo que foi estudado, observa-se que o melhor método atual para a produção de vanilina biotecnologicamente é o método de Haarman e Reimer⁷³, que utiliza *Amycolatopsis* e rende 11,5 g/L na cultura de fermentação^{74,75}.

A área de biotransformação para a obtenção de vanilina precisa ser mais pesquisada. Existe uma boa possibilidade de se encontrar novos microrganismos que podem ser usados para aplicações práticas e mais viáveis para a indústria.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento tecnológico – CNPq – Brasil.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.omikron-online.de/cyberchem/aroinfo/0541-aro.htm>, acessada em Abril 2004.
2. Cerrutti, P.; Alzamora, S. M.; *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *29*, 379.
3. Farthing, D.; Sica, D.; Abernathy, C.; Fakhry, I.; Roberts, J. D.; Abraham, D. J.; Swerdlow, P.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *726*, 303.
4. Shaughnessy, D. T.; Woodrow, S. R.; DeMarini, D. M.; *Mutat. Res.* **2001**, *480*, 55.
5. Berger, R. G.; *Aroma Biotechnology*, Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2000.
6. Clark, G. S.; *Perfum. Flav.* **1990**, *15*, 45.
7. Bricout, J.; Fontes, J. C.; Merlivat, L.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1974**, *57*, 713.
8. Derbesy, M.; Touche, J.; *Parfums, Cosmét., Arômes* **1978**, *21*, 97.
9. Hoffman, P.; Salb, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27*, 352.
10. Krueger, D. A.; Krueger, H. W.; *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 1265.
11. Krueger, D. A.; Krueger, H. W.; *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 323.
12. Martin, G. G.; Remaud, G.; Martin, G. J.; *Flavour Fragrance J.* **1993**, *8*, 97.
13. Fayet, B.; Fraysse, C.; Tisse, C.; Pouliquen, I.; Guerere, M.; Lesgards, G.; *Anal.* **1995**, *23*, 451.
14. Heath, H. B.; *Flavor Technology: Profiles, Products, Applications*, AVI Publishing: Westport, 1978.
15. Association of Official Analytical Chemistry; *Official Methods of Analyses*, 15th ed., AOAC: Arlington, 1990, vol. 2.
16. Hui, Y. H.; *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Wiley: New York, 1992, vol. 4.
17. Luque, M.; Luque-Pérez, E.; Ríos, A.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *410*, 127.
18. Pillonela, L.; Bosseta, J. O.; Tabacchib, R.; *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2002**, *35*, 1.
19. Ramachandra, R. S.; Ravishankar, G. A.; *Process Biotechnol.* **1999**, *35*, 341.
20. Li, K.; Frost, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10545.
21. Dudai, N.; Larkov, O.; Putievsky, E.; Lerner, H. R.; Ravid, U.; Lewinsohn, E.; Mayer, A. M.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 375.
22. van den Heuvel, R. H. H.; Fraaije, M. W.; Laane, C.; van Berkel, W. J. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2954.
23. van den Heuvel, R. H. H.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A.; Laane, C.; van Berkel, W. J. H.; *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2001**, *11*, 185.

24. Markus, P. H.; Roos, R.; Peters, A. L.; *US pat. 5,358,861* **1993**.
25. van den Ban, E. C. D.; Willemen, H. M.; Wassink, H.; Laane, C.; Haaker, H.; *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, 25, 251.
26. Holland, H. L.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 2, 77.
27. Berger, R. G.; Onken, J.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 51, 158.
28. Tadasa, K.; Kayahara, H.; *Agric. Biol. Chem.* **1983**, 47, 2639.
29. Rabenhorst, J.; *DE pat. 19,960,106* **2001**.
30. Tadasa, K.; Kayahara, H.; *Agric. Biol. Chem.* **1977**, 41, 925.
31. Andreoni, V.; Bestetti, G.; *FEMS Microbiol. Ecol.* **1988**, 53, 129.
32. Gasson, M. J.; Kitamura, Y.; McLauchlan, W. R.; Narbad, A.; Parr, A. J.; Parsons, E. L. H.; Payne, J.; Rhodes, M. J. C.; Walton, N. J.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 4163.
33. Peng, X.; Misawa, N.; Harayama, S.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 1417.
34. Plaggenborg, R.; Steinbüchel, A.; Priefert, H.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, 205, 9.
35. Overhage, J.; Steinbüchel, A.; Priefert, H.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 6569.
36. Mitsui, R.; Kusano, Y.; Yurimoto, H.; Sakai, Y.; Kato, N.; Tanaka, M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 6128.
37. Li, T.; Rosazza, J. P. N.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 684.
38. Masai, E.; Harada, K.; Peng, X.; Kitayama, H.; Katayama, Y.; Fukuda, M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 4416.
39. Overhage, J.; Kresse, A. U.; Priefert, H.; Sommer, H.; Krammer, G.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 951.
40. Walton, N. J.; Narbad, A.; Faulds, C. B.; Williamson, G.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 490.
41. Overhage, J.; Priefert, H.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 4837.
42. Furukawa, H.; Zenho, S.; Iwasawa, Y.; Morita, H.; Yoshida, T.; Nagasawa, T.; *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 96, 404.
43. Karmakar, B.; Vohra, R. M.; Nandanwar, H.; Sharma, P.; Gupta, K. G.; Sobti, R. C.; *J. Biotechnol.* **2000**, 80, 195.
44. Sutherland, J. B.; Crawford, D. L.; Pometto, A. L.; *Can. J. Microbiol.* **1983**, 29, 1253.
45. Lesage-Meesen, L.; Delattre, M.; Haon, M.; Thibault, J.-F.; Ceccaldi, B. C.; Brunerie, P.; Asther, M.; *J. Biotechnol.* **1996**, 50, 107.
46. Bonnin, E.; Brunel, M.; Gouy, Y.; Lesage-Meesen, L.; Asther, M.; Thibault, J.-F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 28, 70.
47. Krings, U.; Pilawa, S.; Theobald, C.; Berger, R. G.; *J. Biotechnol.* **2001**, 85, 305.
48. Lesage-Meesen, L.; Delattre, M.; Haon, M.; Thibault, J.-F.; Ceccaldi, B. C.; Asther, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 393.
49. Bonnin, E.; Grangé, H.; Lesage-Meesen, L.; Asther, M.; Thibault, J.-F.; *Carbohydr. Polym.* **2000**, 41, 143.
50. Falconnier, B.; Lapiere, C.; Lesagne-Meesen, L.; Yonnet, G.; Brunerie, P.; Colonna Ceccaldi, B.; Corrieu, G.; Asther, M.; *J. Biotechnol.* **1994**, 37, 123.
51. Stentelaire, C.; Lesage-Meesen, L.; Oddou, J.; Bernard, O.; Bastin, G.; Ceccaldi, B. C.; Asther, M.; *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, 89, 223.
52. Topakas, E.; Kalogeris, E.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Christakopoulos, P.; *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2003**, 36, 561.
53. Lee, I.-Y.; Volm, T. G.; Rosazza, J. P. N.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 23, 261.
54. Krings, U.; *Tese de Doutorado*, Universität Hannover, Alemanha, 1994.
55. Böddeker, K. W.; Gatfield, I. L.; Jähnig, I.; Schorn, C.; *J. Membr. Sci.* **1997**, 137, 155.
56. Stentelaire, C.; Lesagne-Meesen, L.; Delattre, M.; Haon, M.; Sigoillot, J. C.; Ceccaldi, B. C.; Asther, M.; *J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 14, 285.
57. Ma, K.; Hutchins, A.; Sung, S. S.; Adams, M. W. W.; *Biochem.* **1997**, 94, 9608.
58. Ramachandra, R. S.; Aswathanarayana, R. G.; *J. Biotechnol.* **2000**, 76, 137.
59. Samejima, M.; Saburi, Y.; Yoshimoto, T.; Nakazama, T.; *Mukuzai Gakkaishi* **1985**, 31, 956.
60. Habu, N.; Samejima, M.; Yoshimoto, T.; *Mukuzai Gakkaishi* **1988**, 33, 728.
61. Habu, N.; Samejima, M.; Yoshimoto, T.; *Mukuzai Gakkaishi* **1989**, 35, 26.
62. Samejima, M.; Abe, S.; Saburi, Y.; Yoshimoto, T.; *Cell. Chem. Technol.* **1988**, 22, 279.
63. Hagedorn, S.; Kaphammer, B.; *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, 48, 773.
64. Alfermann, A. W.; Reinhard, E.; *Plant Cell Biotechnol.* **1988**, 275.
65. Giri, A.; Dhingra, V.; Giri, C. C.; Singh, A.; Ward, O. P.; Narasu, M. L.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 175.
66. Bar, R.; *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 2.
67. van Uden, W.; Woerdenbag, H. J.; Pras, N.; *Plant Cell Tissue Cult.* **1994**, 38, 103.
68. Qi, Z. H.; Hedges, A. R.; *Flavour Technol.* **1995**, 231.
69. Funk, C.; Brodelius, P.; *Phytochemistry* **1990**, 29, 845.
70. Stockigt, J.; *Agro-Ind-Hi-Tech* **1993**, 4, 25.
71. Sudhakar, J. T.; Ravishankar, G. A.; Venkataraman, L. V.; *Plant Cell Tissue Cult.* **1996**, 44, 117.
72. Scragg, A. H.; *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, 55, 221.
73. Rabenhorst, J.; Hopp R.; *DE pat. 19,532,317* **2000**.
74. Achterholt, S.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A.; Priefert, H.; *US pat. 2,003,092,143* **2003**.
75. Achterholt, S.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A.; Priefert, H.; *US. pat. 2,004,203,123* **2004**.
76. Gross, B.; Asther, M.; Corrieu, G.; Brunerie, P.; *FR pat. 2,661,189* **1991**.
77. Yukio, W.; Ainda, T.; Hashimoto, N.; *JP pat. 5,227,980* **1993**.
78. Labuda, I. M.; Goers, S. K.; Keon, K. A.; *US pat. 5,128,253* **1992**.
79. Washisu, Y.; Tetsushi, A.; Hashimoto, N.; Kanisawa, T.; *JP pat. 5,227,980* **1993**.
80. Rabenhorst, J.; Hopp, R.; *DE pat. 3,920,039* **1991**.
81. Yoshimoto, T.; Samejima, M.; Hanyu, N.; Koma, T.; *JP pat. 2,195,871* **1990**.
82. Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A.; Priefert, H.; *US. pat. 2,003,228,670* **2003**.
83. Podstolski, A.; Havkin-Frenkel, D.; *WO pat. 9,903,975* **1999**.
84. Ramanchandra Rao, S.; Ravishankar, G. A.; *Biotechnol. Adv.* **2002**, 20, 101.