

Seleção de fungos isolados do ambiente com atividade lipolítica

Isolation and selection of lipolytic enzymes-producing fungi

RIALA6/1432

Michelle Cardoso COIMBRA^{1*}, Thiago Okubo Procópio PINTO¹, Vinicius D'ARCADIA CRUZ², Pedro de OLIVA NETO²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000, Brasil. Tel.: (17) 3221-2200. E-mail: mi_ccoimbra@yahoo.com.br

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, SP, Brasil

Recebido: 15.02.2011 - Aceito para publicação: 16.02.2012

RESUMO

Neste estudo, foram isolados e selecionados os micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas, e foi avaliada sua ação sobre diferentes substratos. A enzima foi produzida pela fermentação semissólida com farelo de trigo a 50% de umidade e 120 horas de incubação a 35 °C. A atividade da lipase foi medida por titulação utilizando-se um sistema de reação composto por 4 mL de tampão acetato 50 mM, pH 5,6, 1 g de substrato e 1 mL de extrato bruto enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo. Os substratos testados foram creme de leite, óleo de soja e gordura de coco. Foram isoladas 33 linhagens de fungos, separadas em quatro grupos (A, B, C e D) de acordo com extratos enzimáticos. Os fungos do grupo C apresentaram os maiores valores para atividade lipolítica, sendo de 10,41 e 9,49 µmol/mL no creme de leite; 8,96 e 7,51 µmol/mL no óleo de soja; e 8,52 e 8,14 µmol/mL na gordura de coco. A técnica empregada neste trabalho foi eficiente para efetuar o isolamento de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica. O estudo das linhagens de fungos será relevante para possíveis aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave. lipases, fungos, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

This study aims at isolating and selecting the lipolytic enzymes-producing microorganisms, and at assessing its effect on different substrates. The enzyme production was performed by solid state fermentation with wheat bran for 120 hours of incubation at 35 °C and 50% moisture. The lipase activity was measured by titration using a reaction system consisted of 4 mL of 50 mM acetate buffer, pH 5.6, 1 g of substrate and 1 mL of crude enzyme extract. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmole of fatty acid. The substrates were dairy cream, soybean oil and coconut fat. Thirty-three fungi strains were isolated, which were separated into four groups (A, B, C and D) according to enzymatic extracts. The group C showed the highest values for lipase activity, which were 10.41 and 9.49 µmole/mL in dairy cream, 8.96 and 7.51 µmole/mL in soybean oil and 8.52 and 8.14 µmole/mL in coconut fat. The assay employed in this study showed to be an effective technique for isolating filamentous fungi with high lipolytic activity. Study on fungi lineages and isolates will be crucial for biotechnology purposes.

Keywords. fungi, lipases, solid state fermentation.

INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica aquosa catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídeos, resultando na formação de diacilglicerídeos, moacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol¹. No entanto, dependendo das condições reacionais, como baixa concentração de água, as lipases podem também catalisar a síntese de mono, di ou triacilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol². Muitas lipases são ativas em presença de solventes orgânicos, onde elas catalisam um grande número de reações, incluindo esterificação, transesterificação, acilação regioseletiva de glicóis e mentóis e síntese de peptídeos³.

As lipases são consideradas excelentes biocatalisadores em numerosos processos industriais nas mais diversas áreas, tais como alimentos, processos farmacêuticos, formulação de detergentes, oleoquímica, agroquímica, cosméticos, manufatura de papéis, couro, entre outras. Ainda podem ser ferramentas úteis na fabricação de biossensores para utilização em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes. Além disso, as lipases têm sido utilizadas em terapias enzimáticas e tratamento de dejetos, efluentes e esgoto⁴.

Nos últimos anos, as lipases têm assumido um lugar de destaque no mercado de enzimas, evidenciado pelo aumento da quantidade de informações relatadas na literatura, que atinge uma média de mil publicações por ano. Após proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. O mercado mundial de enzimas aumentou de forma estável, de US\$ 1,0 bilhão em 1995 para US\$ 1,5 bilhões em 2000 e para US\$ 2,2 bilhões em 2006. Uma pesquisa da BBC estimou que a venda global chegaria a US\$ 2,7 bilhões no final de 2012⁵. Tal fato deve-se principalmente a sua versatilidade de aplicações, que as torna especialmente atraentes em aplicações industriais⁶.

As lipases são largamente encontradas na natureza em animais, plantas e micro-organismos. As lipases microbianas são mais utilizadas industrialmente, por apresentarem uma série de vantagens em comparação com as de origem animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria: são facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação, o processo pode ser facilmente conduzido, possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento

de conversão de substrato em produto⁷. Além disso, são enzimas termoestáveis e apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva¹.

No caso da produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES), a utilização de resíduos agroindustriais como suporte para o desenvolvimento do micro-organismo pode ainda reduzir os custos de operação⁸. A seleção de um suporte adequado para a FES é essencial para o bom desempenho do processo. O uso de resíduos agroindustriais, além de representar fontes alternativas, ajuda a minimizar problemas ambientais causados por sua deposição⁹.

Embora os estudos científicos tenham se concentrado mais na aplicação destas enzimas, alguns grupos de pesquisa se dedicam também ao isolamento de micro-organismos produtores de lipases, em busca de novas enzimas com diferentes especificidades de substrato¹⁰.

Hoje, conhece-se um grande número de micro-organismos produtores de lipases, entretanto os micro-organismos conhecidos são um percentual ainda muito baixo da biodiversidade estimada como potencialmente produtora de enzimas em geral e que ainda não foi caracterizada: de 0,2% a 0,6% de bactérias e aproximadamente 5% para fungos. Um método útil para obter novos biocatalisadores é o isolamento de micro-organismos de fontes naturais, seguido de testes de rastreio para identificar a capacidade enzimática desejada, e seleção das melhores performances¹¹.

O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas, bem como avaliar sua ação sobre diferentes substratos: creme de leite de origem bovina, óleo de soja e gordura de coco.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento dos micro-organismos

A coleção fúngica foi obtida distribuindo-se, por vários pontos da cidade de Assis, estado de São Paulo, Brasil, amostras de tecido de algodão embebidas em diferentes substratos obtidos no comércio local: creme de leite da marca Líder ou óleo de soja da marca Soya. Após um mês, os micro-organismos que cresceram em cada tecido foram isolados em placas de Petri contendo o meio ágar batata dextrosado (PDA) pela técnica de esgotamento por estrias e incubados a 25 °C por 48 horas.

As diferentes colônias de fungos isoladas em cada placa de Petri foram repicadas em tubos contendo o meio PDA e, após um período de incubação de 72 horas a 25 °C, armazenadas em geladeira a 5 °C para formação da coleção de cultura, na qual cada micro-organismo foi identificado por duas letras iniciais (MM) e um número. A coleção de cultura foi mensalmente repicada em tubos inclinados para a manutenção das colônias.

Preparação do extrato enzimático bruto de lipase

O extrato bruto foi preparado por fermentação semissólida, inoculando-se 1 mL de suspensão de esporos, obtida por adição de 5 mL de água estéril às culturas de cada fungo da coleção de cultura, em um balão de Erlenmeyer de 500 mL contendo meio composto por farelo de trigo com 50% de umidade, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e pressão de 1 atm por 15 minutos. A inoculação foi feita em duplicata. Findo o tempo de incubação de 120 horas a 37 °C, o meio recebeu 200 mL de água destilada e foi agitado por 30 minutos de modo suave, para evitar a inativação da enzima. Após a agitação, o extrato foi filtrado a vácuo em papel Whatman n. 1 e utilizado como fonte de enzima¹².

Determinação da atividade enzimática da lipase

A atividade da lipase foi medida utilizando-se um sistema de reação composto por 4 mL de tampão em acetato 50 mM, pH 5,6, 1 g de substrato (óleo de soja, gordura de coco ou creme de leite) e 1 mL de extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada em balão de Erlenmeyer de 100 mL e mantida a 30 °C por 60 minutos a 130 rpm. As análises para cada extrato enzimático/substrato foram feitas em duplicatas.

A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona-etanol 1:1 (v/v), e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução KOH 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Foi utilizado como branco a mistura de reação em tempo zero.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo nas condições de ensaio. O cálculo da atividade enzimática da lipase no substrato óleo de soja foi feito a partir de uma curva-padrão de ácido oleico *versus* mililitros de KOH 0,05 N. No substrato creme de leite, foi determinada uma curva-padrão de ácido caproico titulada contra KOH 0,05 N; e, para o substrato gordura de coco, foi utilizada curva-padrão de ácido láurico titulada contra KOH 0,05 N¹³.

Determinação do teor de proteína

A determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos brutos obtidos foi feita pela análise de micro-Kjeldahl, segundo método 13.011 da AOAC¹⁴, que se baseia na determinação do nitrogênio total (NT).

Tratamento estatístico

Os resultados foram obtidos em duplicatas, e as médias dos valores da atividade enzimática dos diversos extratos enzimáticos foram comparadas pela análise estatística multivariada de agrupamento, “Cluster analysis”, separando os extratos em grupos homogêneos. Posteriormente, foi feita uma comparação dos grupos por substrato, utilizando análise gráfica por Box-plot, a fim de se descobrir quais são os extratos enzimáticos que possuem melhor atuação em um maior número de substratos¹⁵. Para realização das análises, foi utilizado o software estatístico Minitab v. 14.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 33 linhagens de fungos, de diversos pontos da cidade de Assis, que formaram a coleção fúngica estudada no presente trabalho. Esses micro-organismos foram testados quanto à capacidade de hidrolisar creme de leite, óleo de soja e gordura de coco, pela produção de lipase extracelular.

Extratos de todas as linhagens estudadas apresentaram atividade lipolítica frente aos substratos avaliados, o que se deve ao fato de os fungos terem sido isolados de meios ricos em gordura, exigindo que o micro-organismo produzisse a enzima lipase para sua multiplicação. Dessa forma, o próprio meio de isolamento funcionou como uma pré-seleção de linhagens fúngicas dotadas de metabolismo capaz de sintetizar enzimas lipolíticas.

Os diversos extratos enzimáticos foram comparados pela análise estatística multivariada de agrupamento, “Cluster Analysis”, separando os extratos em grupos homogêneos de ação enzimática semelhante. Para realizar a análise de agrupamentos, foram realizados os algoritmos de Ward (Figura 1) e “Complete Linkage”. Em ambos os resultados, as linhagens fúngicas foram reunidas em quatro grupos, mostrando estabilidade na análise. Para comprovar a eficácia dos agrupamentos, foram realizados a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5%, que confirmaram a diferença entre os quatro grupos de fungos.

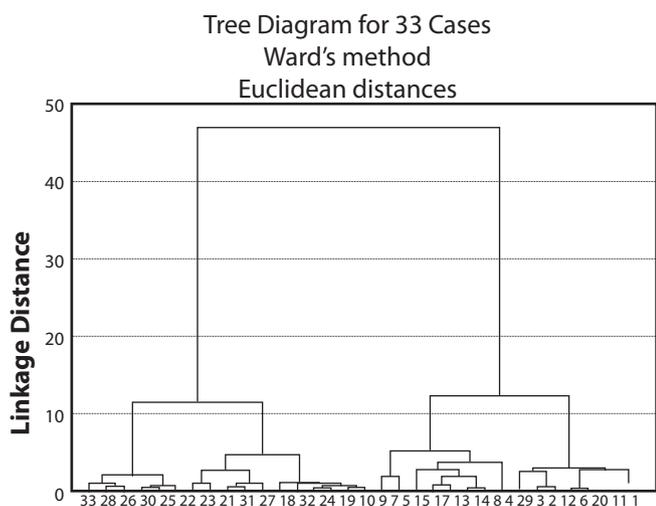


Figura 1. Algoritmo de Ward para análise de agrupamentos

De acordo com a Figura 1, as 33 linhagens fúngicas estudadas foram separadas em quatro grupos homogêneos, que são mostrados a seguir:

- Grupo A: MM 22, MM 25, MM 26, MM 28, MM 30, MM 33.
- Grupo B: MM 9, MM 10, MM 16, MM 18, MM 19, MM 21, MM 24, MM 23, MM 27, MM 31, MM 32.
- Grupo C: MM 4, MM 5, MM 7, MM 8, MM 13, MM 14, MM 15, MM 17.
- Grupo D: MM 1, MM 2, MM 3, MM 6, MM 11, MM 12, MM 20, MM 29.

Após a análise de agrupamentos, foi confeccionado o gráfico Box-plot (Figura 2) para caracterizar os quatro grupos de acordo com a atividade enzimática de cada um, mostrando quais extratos possuem melhor atuação nos substratos.

Como pode ser observado na Figura 2, o grupo C apresenta extratos enzimáticos com maior atividade de lipase em todos os substratos, seguido dos grupos D e B. O grupo A é formado por fungos que apresentaram atividade enzimática mais baixa, também em todos os substratos analisados. Pelo gráfico, também é possível inferir que, nos diferentes grupos, as lipases produzidas pelas linhagens fúngicas apresentaram maior especificidade frente ao substrato creme de leite e menor especificidade com o substrato gordura de coco.

A Tabela 1 apresenta a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de significância de 5% para as médias das atividades enzimáticas correspondentes a cada um dos quatro grupos listados anteriormente.

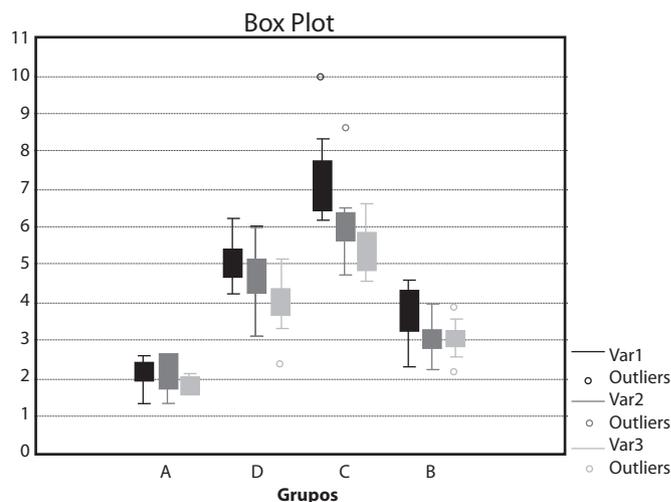


Figura 2. Gráfico Box-plot das médias das atividades enzimáticas das linhagens fúngicas (Var 1 – Creme de leite; Var 2 – Óleo de soja; Var 3 – Gordura de coco)

Tabela 1. Médias das atividades enzimáticas dos grupos A, B, C e D de linhagens fúngicas isoladas em Assis, SP

Grupo	Creme de leite		Óleo de soja		Gordura de coco	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
A	2,10 ^e	0,44	2,1 ^e	0,53	1,78 ^e	0,24
B	2,85 ^f	0,83	3,04 ^e	0,44	2,98 ^f	0,51
C	7,28 ^g	1,27	6,22 ^f	1,13	5,38 ^g	0,72
D	5,23 ^h	0,70	4,88 ^g	0,69	4,20 ^h	0,59

e, f, g, h – em cada substrato, médias de atividade enzimática seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados da tabela confirmam que o grupo C apresentou maior atividade enzimática frente a todos os substratos, porém a ação lipolítica desses fungos é a menos homogênea entre todos os grupos, uma vez que os desvios-padrões das médias do grupo C têm os valores mais altos. O grupo de ação enzimática mais homogênea foi o A, como se pode verificar pelos desvios-padrões com os valores mais baixos. As médias mostradas na Tabela 1 também confirmam que o grupo A teve a menor ação lipolítica frente a todos os substratos.

Para determinar o teor de proteínas do extrato bruto, foram selecionadas, dentro do grupo C, as duas linhagens fúngicas que se mostraram mais eficientes na produção de enzimas lipolíticas específicas para cada substrato. Sendo assim, os fungos testados para o substrato creme de leite foram o MM 7 e MM 5; para

o óleo de soja, os fungos MM 4 e MM 13; por fim, para gordura de coco, os fungos MM 15 e MM 17.

Os fungos mais eficientes na hidrólise do creme de leite tiveram sua origem de seleção em tecido contendo o substrato creme de leite. Já os fungos que apresentaram maior atividade lipolítica no óleo de soja foram isolados de tecido contendo óleo de soja. O substrato gordura de coco não foi utilizado para o isolamento de micro-organismos no presente projeto, fato que possivelmente explica a menor atuação desses fungos na hidrólise da gordura de coco. Os fungos MM5, MM7, MM15 e MM 17 foram isolados do substrato creme de leite, e os fungos MM 4 e MM 13, do substrato óleo de soja.

Como demonstra a Tabela 2, os fungos selecionados mantiveram, na nova fermentação, a mesma atividade enzimática observada na primeira etapa do projeto, mostrando-se realmente eficazes na hidrólise dos substratos creme de leite, óleo de soja e gordura de coco.

Tabela 2. Determinação da atividade enzimática das linhagens fúngicas selecionadas em novo processo de fermentação

Substratos	Fungos	Repetições	µmol/mL	Média	Desvio-padrão
Creme de leite	MM 5	a	9,16	9,49	0,47
		b	9,83		
	MM 7	a	9,99	10,41	0,59
		b	10,83		
Óleo de Soja	MM 4	a	8,78	8,96	0,26
		b	9,15		
	MM 13	a	7,51	7,51	0,00
		b	7,51		
Gordura de coco	MM 15	a	8,52	8,52	0,00
		b	8,52		
	MM 17	a	8,07	8,14	0,11
		b	8,22		

Em estudo sobre produção de lipase por *Aspergillus* spp. realizado por Costa¹², a atividade enzimática do extrato bruto quanto ao substrato óleo de oliva foi de 8,4 µmol/mL e, quanto ao substrato gordura de coco, de 13,8 µmol/mL. Cruz¹³ avaliou a ação da linhagem *Aspergillus* spp. n. 1.068 em creme de leite de vaca, obtendo atividade enzimática frente a esse substrato de 8,16 µmol/mL. Em ambos os estudos, os valores encontrados foram semelhantes aos elucidados no presente trabalho.

A produção de lipase por *Geotrichum candidum* tem sido amplamente relatada na literatura, dada sua

especificidade de hidrólise de acilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição 9¹⁶. O valor relatado para o extrato bruto de uma cepa de *Geotrichum* spp. foi de 6,22 U/mL, após fermentação em meio líquido composto de farinha de soja e trigo em pó como fontes de carbono e extrato de levedura e NH₄NO₃ (nitrato de amônio) como fonte de nitrogênio¹⁷. Todos os extratos enzimáticos brutos selecionados neste trabalho apresentaram ação lipolítica superior, com melhor eficiência na hidrólise de gorduras.

Determinação do teor de proteína

O teor de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos brutos das linhagens selecionadas foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. A partir desses dados, também foi possível calcular a atividade específica da enzima. Os valores de proteína bruta e a atividade específica da enzima estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica dos extratos enzimáticos brutos

Fungos	Repetições	Proteína (%)	Média	Desvio-padrão	Atividade específica (U/mg)
MM 5	a	1,37	1,58	0,30	0,60
	b	1,79			
MM 7	a	1,88	1,84	0,06	0,56
	b	1,79			
MM 4	a	1,31	1,60	0,40	0,56
	b	1,88			
MM 13	a	1,76	1,62	0,21	0,46
	b	1,47			
MM 15	a	1,67	1,71	0,05	0,50
	b	1,74			
MM 17	a	1,83	1,87	0,05	0,43
	b	1,90			

A partir da Tabela 3, é possível observar que o teor de proteínas presentes nos extratos enzimáticos brutos não variou muito de um fungo para outro. A média de todos os extratos foi de 1,7 % de proteínas brutas, com pequeno desvio-padrão de 0,12. Essa média é semelhante à encontrada por Pastore et al.¹⁰ em seu estudo sobre a produção de lipase por *Rhizopus* spp. – o teor de proteínas no extrato enzimático bruto apontado neste trabalho foi de 2,3 %.

Quanto aos dados de atividade específica da lipase, pode-se observar na Tabela 3 que os valores

obtidos por todos os fungos foram próximos, sendo que o melhor resultado foi o da linhagem MM 5, com atividade específica de 0,6 U/mg. Esse valor é superior ao encontrado por Carvalho et al.¹⁸, que avaliaram lipases obtidas de cepas fúngicas após 72 horas de fermentação em meio de cultivo líquido, e as maiores atividades específicas foram de 0,56 U/mg, 0,42 U/mg e 0,33 U/mg.

CONCLUSÃO

O isolamento de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica pode ser feito utilizando-se a técnica empregada neste trabalho, fato comprovado pela eficiência do resultado de seleção e pela relevância da especificidade do substrato utilizado como fonte de nutrientes no isolamento dos micro-organismos, uma vez que os fungos selecionados em um tipo específico de substrato apresentaram maior especificidade para a hidrólise do tipo de gordura constituinte deste mesmo substrato.

A pesquisa permitirá o estudo das linhagens isoladas para possíveis aplicações biotecnológicas em reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de óleos e gorduras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pela concessão de bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

1. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*. 2001;19:627-62.
2. Maia MMD, Heasley A, Morais MMC, Melo EHM, Morais Junior MA, Ledingham WM, et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores Technol*. 2001;76:23-7.
3. Zhang J, Hau Z, Yao C, Yu Y. Purification and properties of a lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. *J Mol Catalysis B Enzymatic*. 2002;18:205-14.
4. Sun SY, Xu Y, Wang D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. *Biores Technol*. 2009;100:2607-12.
5. BBC Research. [acesso 2010 out 21]. Disponível em: [www.bccresearch.com/report/BIO030E.html. 2010].
6. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enz Microb Technol*. 2006;39(2):235-51.
7. Leal MCMR. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
8. Dominguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotech Letters*. 2003;25:1225-9.
9. Kalogeris E, Iniotaki F, Topakas E, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Performance of an intermittent agitation rotating drum-type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Biores Technol*. 2003;86:207-13.
10. Pastore GM, Costa VSR, Koblitz MGB. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus spp*. *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23:135-40.
11. Schäfer T, Borchert TW, Nielsen VS, Skagerlind P, Gibson K, Wenger K, et al. Industrial enzymes. *Adv Biochem Engin Biotechnol*. 2007;105:59-131.
12. Costa MC. Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus spp*. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1996.
13. Cruz VA. Produção biotecnológica de metilcetonas por *Aspergillus spp*. e caracterização do processo fermentativo. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2001.
14. AOAC. Official methods of analysis of the AOAC International. Washington; 1984.
15. Frei F. Introdução à análise de agrupamentos: teoria e prática. São Paulo: Editora da Unesp; 2006.
16. Sugihara A, Shimada Y, Nakamura M, Nagao T, Tominaga Y. Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipase. *Protein Eng*. 1994;7:585-8.
17. Macedo GA, Park YK, Pastore GM. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum spp*. *Rev Microbiol*. 1997;28(2):90-5.
18. Carvalho PO, Calafatti AS, Marassi M, Silva DM, Contesini FJ, Bizaco R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quim Nova*. 2005;28(4):614-21.