



DETERGENTES BIOLÓGICOS BIODEGRADÁVEIS

AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DO MERCADO

Ilustrações cedidas pelos autores

Grupo de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica Centro de Biotecnologia - UFRGS

Sydnei Mitidieri

Doutorando em Biologia Celular e Molecular
UFRGS
mitidier@dna.cbiot.ufrgs.br

Anne Helene Souza Martinelli

Graduanda em Ciências Biológicas
UNISINOS
anisinba@bol.com.br

Siumar Camassola

Graduando em Agronomia
UFRGS
scamassola@yahoo.com.br

Paloma Koprovska Menguer

Graduanda em Ciências Biológicas
UFRGS
palomitamk@yahoo.com.br

Augusto Schrank

Ph.D, Professor Adjunto do Depto.
Biologia Molecular e Biotecnologia e
Pesquisador do Centro de Biotecnologia
augusto@dna.cbiot.ufrgs.br

Marilene Henning Vainstein

Ph.D, Professora Adjunta do Depto. de
Microbiologia e Pesquisadora do Centro
de Biotecnologia
CBiot-UFRGS
mbv@dna.cbiot.ufrgs.br

Introdução

As enzimas são proteínas dotadas de propriedades especiais, estando presentes em todos os sistemas biológicos, onde exercem diversas funções, acelerando reações entre componentes químicos. Assim se chama atividade catalítica das enzimas. Elas produzidas pelos organismos vivos e, quando degradadas, são reaproveitadas como aminoácidos. Agem em matérias-primas renováveis, como frutos, cereais, leite, gorduras, carne, algodão, couro e madeira. Sendo originalmente produzidas para atuar em células vivas, mantêm usualmente sua atividade em pressões atmosféricas e em condições moderadas de temperatura e pH. Como proteínas, as enzimas são passíveis de desnaturação (perda da atividade), por

agentes químicos e físicos. A maioria delas possui um rendimento máximo a temperaturas de 30° a 70°C e em pH aproximadamente neutro, havendo, entretanto, grandes variações entre as diversas enzimas (Crueger & Crueger, 1984; Falch, 1991; Godfrey, 1996).

Os detergentes modernos apresentam um espectro de ação e de utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações. A principal vantagem da formulação de detergentes que contenha enzimas é a substituição de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos. O uso diversificado das enzimas deve-se à sua característica de atuar como biocatalisadores especializados. As enzimas adicionadas às formulações de deter-

ATIVIDADE ENZIMÁTICA - PROTEASE

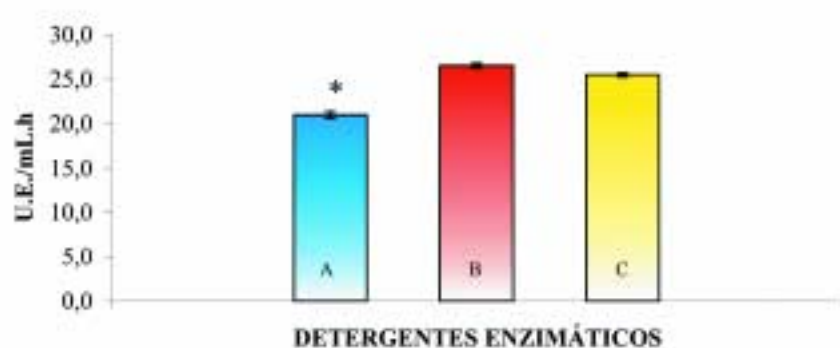


Figura 1 - Teste de atividade utilizando azocaseína 2% (m/v) como substrato, realizado nos produtos "A", "B" e "C". O ensaio foi realizado em quintuplicata, sendo mostrado o seu desvio padrão. A atividade proteolítica foi expressa como $\Delta OD/mL.h$. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro em λ de 440 nm.

* Estatisticamente significativo, teste de Tukey $\alpha=0,05$

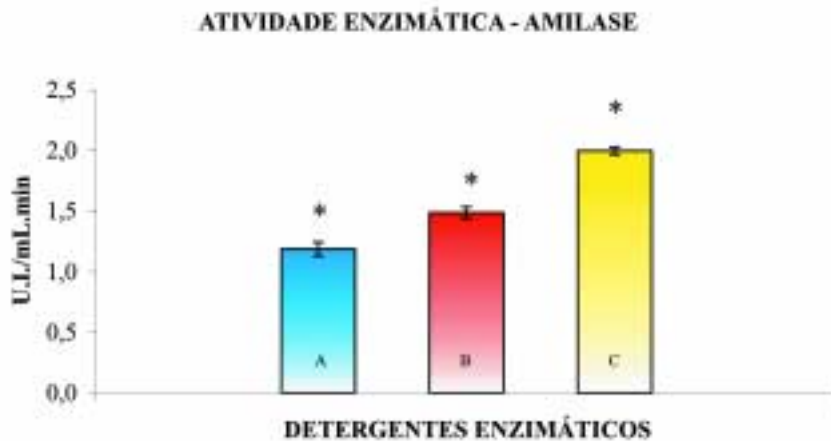


Figura 2 - Teste de atividade amilolítica realizada nos produtos “A”, “B” e “C”. O ensaio foi realizado em quintuplicata, sendo mostrado o seu desvio padrão. A atividade amilolítica foi expressa em Unidades Internacionais (U.I.) por mL.min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em λ de 550 nm. * Estatisticamente significativo, teste de Tukey $\alpha=0,05$

gentes de uso hospitalar, doméstico e industrial agem digerindo e dissolvendo resíduos orgânicos (sangue, fezes, urina, vômitos, manchas diversas), higienizando as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruindo canais com resíduos e coagulados, eliminando resíduos fecais dos canais e superfícies dos fibroscópios e removendo contaminantes da roupa hospitalar (Godfrey, 1996)

Os principais tipos de enzimas utilizadas nessa indústria incluem: a) amilases – degradam amido e outros glicídios de carboidratos; b) proteases – degradam ligações peptídicas; c) lipases – degradam lipídeos; d) celulases – degradam celulose (Bon, 1995).

A preocupação crescente com o ambiente é outro fator que tem levado os fabricantes a reavaliar as formulações já existentes. Nas formulações mais recentemente utilizadas, muitos ingredientes impróprios, até então empregados, foram substituídos por enzimas, mantendo o mesmo desempenho dos antigos produtos. As enzimas como princípios ativos dos detergentes apresentam a grande vantagem de ser 100% biodegradáveis. Uma nova geração de detergentes sem fosfato e sem cloro alvejante, contendo apenas uma mistura de enzimas, com formulação mais segura e menos cáustica, foi introduzida na Europa há vários

anos. O uso de enzimas, em particular as amilases, em processos industriais, satisfaz as exigências das normas de ISO 14000 de baixo impacto ambiental, além da redução de gastos energéticos associados ao aumento da qualidade do produto (Bon, 1995). As projeções indicam que combinações variadas de misturas de enzimas venham a substituir, cada vez mais, os ingredientes menos aceitáveis do ponto de vista ambiental, nas formulações de detergentes. Um exemplo está na fabricação de detergentes de máquinas de lavar louças automáticas, no mercado europeu. A substituição de muitos dos ingredientes que agrediam o meio ambiente por enzimas tornou possível a manutenção do mesmo desempenho (Novozyme, 2000).

Estes exemplos ilustram a capacidade tecnológica das enzimas para solucionar uma variedade de problemas ambientais. São muitos os principais benefícios da utilização de enzimas nesse processo, entre eles: atuam em temperaturas e condições físicas moderadas substituindo solventes orgânicos, e em muitas condições severas, reduzindo o gasto energético e eliminando a poluição ambiental; são altamente específicas, o que significa menos efeitos indesejáveis e não liberação de produtos intermediários impróprios durante o processo de sua

utilização; podem ser utilizadas para o tratamento de resíduos em dejetos biológicos, inclusive em grandes volumes e são totalmente biodegradáveis (Novozyme, 2000).

No início do século XX, Röhm (1913), desenvolveu o primeiro método de lavagem de tecidos com detergentes que continham enzimas, fabricando a primeira formulação desses detergentes. A empresa de Röhm patenteou o produto em 1913 e a preparação foi comercializada até os anos sessenta. A formulação do produto baseava-se na tripsina, uma enzima digestiva produzida no pâncreas de mamíferos. O produto não obteve grande sucesso, pois a tripsina não era suficientemente ativa em líquidos fortemente alcalinos (pH maior que 9,0), obtidos pela diluição do detergente (Bon, 1995).

Em 1959, ocorreu um desenvolvimento marcante na indústria de detergentes. O químico suíço Jaag, que trabalhou para a companhia de detergentes Gebrüder Schnyder, em Biel, na Suíça, desenvolveu um produto novo denominado Bio 40, que continha uma protease bacteriana em substituição à tripsina. Embora a protease bacteriana fosse mais adequada ao propósito industrial, esse ainda não era o produto ideal. Em 1962, a empresa Novo Nordisk lançou no mercado um produto denominado Alcalase®. A ação dessa protease alcalina obtida de microrganismos não era afetada por outros componentes do detergente e era eficaz nas temperaturas desejadas (Novozyme, 2000).

O primeiro grande sucesso de “marketing” de um detergente formulado com enzimas foi o Biotex, que continha Alcalase® e foi produzido pela KORTMAN & SCHULTE (atualmente Kortman Intradal) em colaboração com Gebrüder Schnyder. O sucesso desse produto marcou uma real inovação na utilização de enzimas em detergentes a partir de então (Novozyme, 2000).

O uso de enzimas para propósitos industriais progrediu rapidamente após 1965, devido, principalmente, ao uso crescente de diferentes enzimas em detergentes. Entretanto, hou-

ve um retrocesso temporário no início da década de setenta, quando se averiguou que as enzimas poderiam causar reações alérgicas (Novozyme, 2000).

Por iniciativa do “Food and Drug Administration” (FDA), a “National Academy of Science” (NAS), efetuou uma ampla investigação sobre esse assunto. A NAS, em seu relatório de 1971, concluiu que as enzimas presentes nas formulações de detergentes não só são inofensivas aos consumidores, como também proporcionam vantagens tecnológicas definidas à indústria. Os produtores de detergentes são hoje os maiores consumidores de enzimas industriais. Por isso, constantemente, estão sendo desenvolvidos novos produtos contendo novas enzimas e novas formulações com tal finalidade. A principal e mais recente inovação nesse campo foi a introdução, em 1988, de uma formulação com lipase (Novozyme, 2000).

Como mencionamos acima, as enzimas mais utilizadas em formulações de detergentes são as amilases, proteases, lipases e celulases.

As amilases, produzidas na glândula salivar e no pâncreas de vários mamíferos e também produzidos por fungos e bactérias são hidrolases capazes de degradar especificamente as ligações glicosídicas do amido (amilose, amilopectina) e de seus produtos de degradação (maltodextrinas) até o estágio de oligossacarídeos. São amplamente distribuídas na natureza, onde participam em vários processos biológicos tais como a digestão de alimentos por animais e microrganismos, e na germinação e maturação de grãos. São também empregadas em outros segmentos industriais, para despolimerização controlada do amido, originando substratos importantes em processos fermentativos, e na preparação de xaropes de glicose, maltose ou mistos; panificação; cervejaria; e produção de etanol. Na formulação de detergentes, são utilizadas para a remoção de resíduos insolúveis de alimentos ricos em amido pela degradação de oligossacarídeos, tornando-os solúveis e, portanto, facilmente removíveis (Hopkins, 1946; Fogarty & Kelly, 1980; Cornelis, 1987; Vihinen & Mantsala, 1989; Mora-

es, 1993; Chuzel & Cereda, 1995).

As proteases são as enzimas mais utilizadas na indústria de detergentes para a remoção de resíduos protéicos ou proteínas, como sangue, manchas de ovo, suor humano, entre outros. Esse grupo inclui uma larga variedade de enzimas que clivam ligações peptídicas em substratos menores (peptídeos) ou maiores (proteínas), atuando na porção central dos substratos protéicos (endopeptidases) ou nas porções externas (exopeptidases). O grupo mais comumente empregado na indústria de detergentes é o das endopeptidases de especificidade não restrita, as quais degradam substratos protéicos a peptídeos solúveis. Tais enzimas provêm de várias fontes (North, 1984; Perona & Craik, 1995).

Lipases são enzimas que hidrolisam as ligações éster das gorduras, produzindo álcoois e ácidos graxos (Bon, 1995).

A celulase utilizada em detergentes enzimáticos traz ao produto propriedades que possibilitam a modificação da estrutura de fibras de celulose encontradas no algodão. Quando esse complexo é adicionado a um detergente mantém a vivacidade das cores com um efeito amaciante, provavelmente devido à remoção das microfibras (Wainwright, 1990; Peberdy, 1994).

Apesar dos detergentes enzimáticos já serem utilizados há muitos anos, o seu uso no Brasil é mais recente. Como as enzimas possuem ação direta sobre determinada substância, devemos considerá-la como uma substância ativa em uma formulação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA define ingrediente ativo como: “Ingrediente ativo ou princípio ativo - substância presente na formulação para conferir eficácia ao produto, segundo sua destinação” (ANVISA, 2001). Os ativos químicos são definidos em percentual, massa ou volume. Em uma formulação contendo enzimas não se deve especificar concentração enzimática dessa forma, visto que esses produtos são freqüentemente constituídos de misturas heterogêneas de diversas proteínas, além de serem passíveis de sofrerem inúmeras interferências, alterando, assim, sua atividade enzimática. Além disso, uma parte da

quantidade de enzima pode estar presente na preparação, mas inativada ou desnaturada, ou seja, parcialmente desprovida da sua atividade original. Outros fatores presentes na formulação final do produto também podem provocar uma diminuição da atividade enzimática.

Devido a essas dificuldades, desde 1961 a “ENZYME COMMISSION” da “International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)”, juntamente com a “International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)”, vem editando as recomendações para a definição do conceito de atividade enzimática. Essas recomendações têm o caráter de Convenção Internacional e inclui o Brasil como signatário. Essa definição indica que a concentração enzimática em uma formulação deve ser definida não em termos de volume ou massa e sim da sua atividade enzimática expressa em U.I. (UNIDADES INTERNACIONAIS). Uma U.I. é a quantidade de enzima capaz de catalisar a transformação de um micromol do substrato ou produzir um micromol de produto, por um determinado período de tempo em condições padrões. Essa forma de determinação é precisa quando se trata de substratos bem definidos e baseados em uma padronização e possibilita perfeitas comparações entre diferentes formulações (IUBMB, 1992).

Alternativamente, quando se trata de reações mais complexas, onde os substratos ou os produtos são menos definidos, como as proteases, a “ENZYME COMMISSION” recomenda a adoção de critérios quantitativos para definir a unidade enzimática, levando sempre em consideração a necessidade de identificar a ação catalítica típica da enzima, igualmente em condições padronizadas de ensaio (IUBMB, 1992).

O objetivo deste trabalho é demonstrar experimentalmente que as definições utilizadas pelo “ENZYME COMMISSION” são as mais adequadas e precisas para a comparação dos vários detergentes enzimáticos comercializados no Brasil. Em um ensaio no qual foram utilizadas três formulações de detergentes enzimáticos encontrados no mercado, as atividades enzimáticas de protease e amilase foram de-

terminadas e comparadas. O detergente "A" continha em sua formulação amilase, protease e lipase, todas definidas em percentual; os detergentes "B" e "C" continham amilase, protease, lipase e carboidrase, também definidas em percentual. Convém salientar que a carboidrase é uma nomenclatura que engloba um grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações de carboidratos. Esse termo utilizado na rotulagem de um detergente não é apropriado, visto que as amilases e as celulases são, por definição, carboidrases.

Material e métodos

Determinação da atividade de protease - A determinação da atividade de proteásica dos diversos detergentes foi realizada utilizando-se azocaseína 2% (m/v) como substrato. Nesse ensaio de atividade proteolítica, a atividade foi expressa como $\Delta\text{OD} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Para o ensaio foi utilizada uma mistura de reação que continha: 0,1 mL de substrato, 0,1 mL de amostra enzimática e 0,2 mL de tampão fosfato 50 mM pH 8,0. Os tubos foram incubados a 50°C por quinze minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionados 0,8 mL de ácido tricloroacético 20% a cada amostra. Para o branco da reação foi utilizado 0,1 mL de substrato, 0,8 mL de ácido tricloroacético 20%, 0,1 mL de amostra enzimática e 0,2 mL de tampão fosfato 50 mM pH 8,0. Todos os tubos foram resfriados e centrifugados por cinco minutos a 13.000 X g em centrífuga Eppendorf. Os ensaios com as amostras foram realizados em quintuplicata, utilizando-se um branco para cada amostra. A atividade proteásica foi estimada a partir da leitura em espectrofotômetro (λ 400 nm) do sobrenadante da reação (Sangorrín *et al.*, 2001).

Determinação da atividade de amilase - A determinação da atividade amilolítica foi realizada utilizando-se amido solúvel a 1% (m/v) como substrato. Nesse ensaio, a atividade foi expressa em U.I. Para o ensaio foi utilizada a mistura de reação contendo 100 μL de amostra; 300 μL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0 e 200 μL de substrato. Para o branco da amostra,

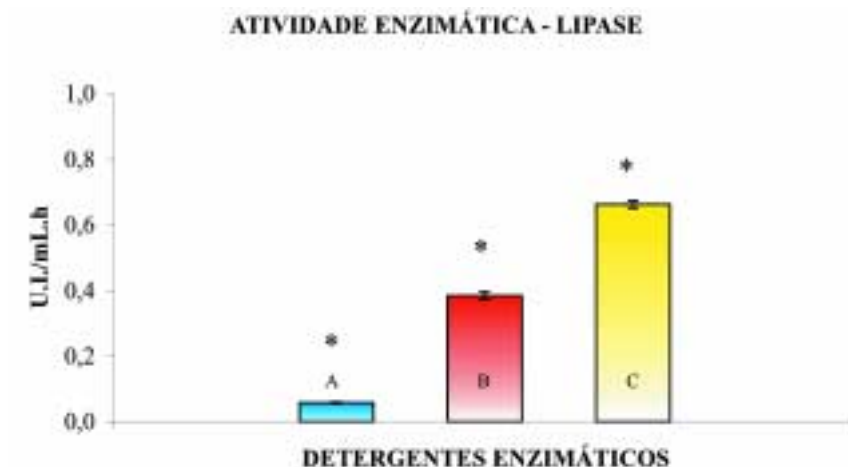


Figura 3 - Teste de atividade lipásica realizada nos produtos "A", "B" e "C". O ensaio foi realizado em quintuplicata, sendo mostrado o seu desvio padrão. A atividade lipásica foi expressa em Unidades Internacionais (U.I.) por mL.h. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em λ de 410 nm.

* Estatisticamente significativo, teste de Tukey $\alpha=0,05$

foram utilizados 100 μL de amostra, 300 μL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0 e 200 μL de H_2O destilada. Os tubos foram incubados a 42°C por quinze minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionados 1,5 mL do reagente contendo ácido dinítrrosalicílico.

As amostras foram incubadas a 96°C por cinco minutos. Os tubos foram resfriados e adicionados 17,9 mL de H_2O destilada. Todos os tubos foram homogeneizados. Os ensaios com as amostras foram realizados em quintuplicata, utilizando-se um branco para cada amostra. A leitura da atividade amilolítica foi realizada em espectrofotômetro (λ 550 nm). O reagente DNS contém 3,53 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 6,0 g de hidróxido de sódio em 472 mL de água destilada, acrescido de 102 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 2,53 mL de fenol e 2,76 g de metabissulfito de sódio (Sumner, 1929; in Fuwa, 1954).

Determinação da atividade de lipase - A determinação da atividade lipásica foi realizada utilizando-se p-nitrofenil palmitato 3mg.mL⁻¹ em isopropanol como substrato. Nesse ensaio, a atividade foi expressa em U.E. (1U = 1 μmol liberado de p-nitrofenol). Para o ensaio foi utilizada a mistura de reação contendo 900 μL de emulsão e 100 μL de amostra. A emulsão continha

1 mL de substrato e 9 mL de solução emulsionante, constituída de 2 g de Triton X-100, 0,5 g de goma arábica e 450 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Para o branco da amostra, foram utilizados 100 μL de amostra, 900 μL de emulsão, sendo a reação lida imediatamente em espectrofotômetro. Os tubos de amostra foram incubados a 40°C por trinta minutos. A leitura da atividade lipásica foi realizada em espectrofotômetro (λ 410 nm). Os ensaios com as amostras foram realizados em quintuplicata, utilizando-se um branco para cada amostra (Beisson *et al.*, 2000).

A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância com um alfa de 0,05. Para se verificar quais os detergentes que diferiam, foi utilizado o teste de Tukey (Berquó, 1981).

Resultados e discussão

Três detergentes enzimáticos comercializados no Brasil foram utilizados para os experimentos. Após a análise enzimática, em relação a sua atividade proteásica, para o produto "A" foi encontrado um valor médio de 20,99±0,36 U.E.mL⁻¹.h⁻¹; no produto "B" foi determinada uma atividade enzimática média de 26,52±0,28 U.E.mL⁻¹.h⁻¹; no produto "C", 25,5±0,21 U.E.mL⁻¹.h⁻¹; conforme pode ser verificado na Figura 1. Foi constatada uma

diferença estatisticamente significativa entre os detergentes, através da análise de variância, utilizando-se α de 0,05. Através do teste de Tukey, encontramos diferença estatisticamente significativa no produto "A" comparado com os outros dois. Entre o produto "B" e "C" não houve diferença estatisticamente significativa. O ensaio utilizado para a determinação da atividade amilolítica apresentou diferença estatisticamente significativa entre os três detergentes testados. No produto "A" foi encontrado um valor médio de $1,187+0,057$ U.I.mL⁻¹.h⁻¹ e de $1,487+0,047$ U.I.mL⁻¹.h⁻¹; e de $1,997+0,031$ U.I.mL⁻¹.h⁻¹ para os produtos "B" e "C", conforme pode ser observado na Figura 2. Através do teste de Tukey, pôde-se verificar que as três formulações apresentaram concentrações estatisticamente diferentes entre elas. O ensaio utilizado para a determinação da atividade lipásica apresentou diferença estatisticamente significativa entre os detergentes testados. No produto "A" foi encontrado um valor médio de $0,0573+0,0024$ U.I.mL⁻¹.h⁻¹; e de $0,384+0,012$ U.I.mL⁻¹.h⁻¹ e $0,663+0,0115$ U.I.mL⁻¹.h⁻¹ para os produtos "B" e "C", conforme pode ser observado na Figura 3. Através do teste de Tukey, pôde-se verificar que as três formulações apresentaram concentrações estatisticamente diferentes entre elas para um α de 0,05.

Os resultados obtidos nesse trabalho explicitam a necessidade de uma reformulação nos rótulos dos detergentes enzimáticos no que diz respeito à quantidade de enzimas presentes na sua formulação. O fato de os detergentes "A", "B" e "C" apresentarem em seus rótulos percentagens que variam de 15% a 0,25% na constituição das formulações, isto não resulta em uma atividade enzimática proporcional, o que, na prática, vale dizer que apresentam uma variação no rendimento. Após esses ensaios, podemos verificar que as enzimas utilizadas como princípios ativos dos detergentes enzimáticos, por serem moléculas biológicas de origem protéica, estão sujeitas a variações devido a vários fatores. Dessa forma, poderemos encontrar três detergentes enzimáticos que contenham em sua rotulagem o mesmo percentu-

al de uma determinada enzima e a mesma apresentar diferentes atividades enzimáticas, como foi observado com relação à protease na formulação "A" e "C". Já a formulação "A" apresenta em sua rotulagem uma concentração dez vezes superior às primeiras. Nessa formulação, consta uma concentração de 15%. Isso significa a presença de 150 g de protease por litro de detergente, fato este biologicamente improvável, pois não estaria totalmente solúvel. Para as outras duas enzimas também encontramos concentrações semelhantes com atividades diferentes. Concluímos, portanto, que a quantificação dos princípios ativos enzimáticos em formulações de detergentes deve ser expressa em atividade enzimática, conforme determinação da "ENZYME COMMISSION". Falta em nosso país uma regulamentação específica para a padronização da rotulagem dos detergentes enzimáticos. Assim que essa regulamentação estiver em prática, uma comparação real e precisa dos diferentes produtos será possibilitada aos consumidores.

Agradecimentos

CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

ANVISA. <http://www.anvisa.gov.br>. Pesquisa realizada em março de 2001.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1981. 350p.

BON, E.P.S. A tecnologia enzimática no Brasil. **ENZITEC 95**, Vol. 1: 9-14, 1995.

CHUZEL, G. & CEREDA, M.P. Transformação enzimática de amido. **ENZITEC 95**, 20º Seminário Internacional de Tecnologia Enzimática Vol. 1:72-82. (1995)

CORNELIS, P. Microbial amylases. **Microbial Sciences** 4(11):342-343, 1987.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. **Enzymes**. In: Biotechnology: a textbook of industrial microbiology. Brock, T.D. (ed.) Science Tech, Inc., 161-186, 1984.

FALCH, E.A. Industrial enzymes - developments in production and application. **Biotech Adv**, 9:643-658, 1991.

FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: **Econ Microbiol** Vol.5 - Microbial enzymes and Bioconversions. Rose, A.H. (eds) Academic Press, 1980, 115 p.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by use of amylose as the substrate. **J Biochem**, 41:583-603, 1954.

GODFREY, T. **Industrial Enzymology**. Stockton Press, New York. 1996, 609 p. il.

HOPKINS, D.W. The actions of the amylases. **Adv Enz**, 6:389-414, 1946.

IUBMB. **Enzyme Nomenclature**: Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology. Academic Press, San Diego, 1992.

MORAES, F.F. Produção e uso de ciclodextrinas. **ENZITEC**, 93:69-71, 1993.

NORTH, M. J. Comparative biochemistry of proteinases of eukaryotic microorganisms. **Microbiol Rev**, 46:308-340, 1984.

NOVOZYME. <http://novozyme.com>. Pesquisa realizada em abril de 2000.

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi – trying to understand a highly productive black box. **Trends Biotechnol**, 12:50-57, 1994.

PERONA, J. J. & CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Prot. Sci**, 4:337-60, 1995.

SANGORRÍN, M. P.; FOLCO, E. J.; MARTONE, C. M.; et al. Purification and characterization of proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). **Int J Biochem Cell Biol**, 33:691-99, 2001.

VIHINEN, M. & MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Rev Biochem Mol Biol**, 24:329-418, 1989.

WAINWRIGHT, M. Novel uses for fungi in biotechnology. **Chem Ind**, 15:31-34, 1990.