

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IMOBILIZADA EM ALGINATO DE SÓDIO NO TRATAMENTO DE REJEITO LÍQUIDO INORGÂNICO RADIOATIVO

Tânia Regina de Borba, Solange K. Sakata, Aline S. Takara, Marcos M. Goes, Rafael V. P. Ferreira e Júlio T. Marumo*.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP)
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
jtmarumo@ipen.br

RESUMO

Gerenciar rejeitos radioativos implica em minimizar os impactos ambientais que estes materiais podem representar, reduzindo volume e custos. Diante deste desafio, pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver técnicas cada vez mais simples e de menor custo. A utilização de biomassa no processo de remoção de metais pesados e radionuclídeos representa grande potencial no tratamento de rejeitos líquidos. *Saccharomyces cerevisiae* é bastante conhecida pela capacidade de bioabsorção de metais pesados, além de oferecer vantagens adicionais tais como fácil viabilidade e possibilidade de manipulação genética. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de remoção de amerício (^{241}Am) por células immobilizadas de *S. cerevisiae* em alginato de sódio. Para isto, foram preparadas microesferas de alginato de sódio (controle) e microesferas de biomassa inativada immobilizada. Foram estudados os seguintes fatores: atividade, pH e tempo de contato. A avaliação da remoção do material radioativo foi feita por espectrometria gama. Os resultados demonstraram que ocorre maior bioabsorção em solução de pH 4, a partir de 2 horas de contato, chegando a valores muito próximos de 100%, tanto para alginato de sódio sem células immobilizadas quanto para *Saccharomyces cerevisiae* immobilizada em alginato de sódio.

Palavras-chave: rejeito radioativo; *Saccharomyces cerevisiae*; alginato de sódio; amerício.

1. INTRODUÇÃO

O avanço da ciência e da tecnologia desde a revolução industrial tem aumentado a capacidade do ser humano em explorar os recursos naturais. A introdução repentina e freqüente de compostos químicos em diferentes ecossistemas pode alterar a capacidade de auto-limpeza dos mesmos, resultando no acúmulo de contaminantes a níveis problemáticos e até prejudiciais.

A contaminação do ambiente com metais tóxicos e radioisótopos surge como resultado da atividade humana (CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2000).

Os radioisótopos têm sido amplamente utilizados na indústria, agricultura, medicina e, principalmente na área da pesquisa. O custo da utilização desta tecnologia para a sociedade é a geração de rejeitos radioativos. As técnicas convencionais de remoção de íons metálicos de soluções, tais como a precipitação, troca iônica e processos eletroquímicos são ineficazes devido aos grandes volumes de rejeitos, baixas concentrações de íons metálicos em soluções aquosas e por razões econômicas. Entretanto, os rejeitos contendo radioisótopos necessitam ser tratados apropriadamente para garantir a segurança do homem e do meio ambiente.

A Comissão Nacional de Energia Nuclear define o rejeito radioativo como: "qualquer material resultante de atividades humanas, que contenha radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de isenção especificados na Norma CNEN-NE-6.02 - Licenciamento de Instalações Radiativas, e para o qual a reutilização é imprópria ou não prevista" (CNEN, 1985). A Agência Internacional de Energia Atômica define rejeito radioativo como "material que contém ou que está contaminado com radionuclídeos em concentrações ou níveis de atividade maiores que os limites de isenção estabelecidos pela autoridade competente" (IAEA, 1988).

Compreende-se por gerência de rejeitos radioativos, o controle dos rejeitos radioativos que envolve uma série de atividades operacionais e administrativas, tais como: coleta, segregação, pré-tratamento, tratamento, acondicionamento, armazenagem temporária, transporte e deposição final (MARUMO, 1997).

Em muitos países esses rejeitos são tratados por incineração, que destrói os compostos orgânicos perigosos e os radionuclídeos presentes são capturados pelas cinzas volantes ou liberados com os gases. (STRINGFELLOW et al, 2000)

No Brasil, não há incineradores disponíveis para a queima de rejeitos radioativos. Apesar do volume de geração anual desses rejeitos ser baixo, da ordem de 0,2 m³ numa instituição como o IPEN, é necessário desenvolver métodos de tratamento que possam ser aplicados eficientemente a um baixo custo. Dos fluxos de rejeitos, os líquidos merecem atenção especial, pois os processos de tratamento disponíveis são, muitas vezes, caros e operacionalmente difíceis. Buscar novas alternativas de tratamento desses rejeitos que aliem baixo custo e eficiência é uma tarefa importante e difícil, já que, nesse caso, cuidados adicionais devem ser considerados por se tratar de rejeitos radioativos, que estão em estado físico de fácil dispersão.

A pesquisa de novas tecnologias envolvendo a remoção de radionuclídeos de rejeitos tem dirigido atenções para a biossorção (KALSOON et al., 2007) e (TSEZOS, 2001).

O mecanismo de biossorção pode ser definido como a remoção do metal tóxico pela interação com o biossorbente, dentre eles estão as algas (FENG et al, 2004) , bactérias (MURALEEDHAAN et al, 1991), fungos (KAPOOR et al, 1999), leveduras (BAYAN et al, 2001) e biopolímeros (TEIXEIRA et al, 1996). A habilidade com que, em soluções diluídas, os microrganismos concentram os íons metálicos em sua estrutura celular fez com que estes fossem os mais estudados na remoção de vários metais, como por exemplo: Cu, Cd, Pb, U, Am, Ce, Cs, Ni , entre outros (VOLESKY, 1994) .

A biossorção, é considerada biotecnologia de custo baixo para tratamento de grandes volumes e baixas concentrações de metais da ordem de 1 a 100 mg/L presentes em rejeitos líquidos complexos.

Entre os biossorbentes mais promissores para remoção de metais pesados, que foram estudados nas últimas décadas, *Saccharomyces cerevisiae* tem recebido atenção cada vez maior devido à sua natureza singular (J.WANG, C. CHEN 2006). A *Saccharomyces cerevisiae*, destaca-se como biossorbente por ser um subproduto das indústrias de alimento e destilarias, possuírem baixo custo, facilidade de manuseio, além de seqüenciamento genético conhecido.

Possui capacidade de retirar metais da água, podendo ser usada como bioacumulador desses metais, sendo uma ótima alternativa para a descontaminação ambiental (BASÍLIO et al., 2005). São fungos unicelulares eucarióticos com capacidade de biossorção conferida pelos componentes celulares (BRIEVORÁ et al. 2002) e, segundo Brady et al. (1984), pela parede celular, o que conferiria um sítio adicional em relação a outros organismos desprovidos de parede celular.

Os mecanismos da bioabsorção de metais tóxicos são complexos e podem ser resumidos em quelação, adsorção na superfície da célula por forças físicas e acumulação extracelular e intracelular (VOLESKY and HOLAN, 1995). Além disso, Kapoor & Viraraghavan (1995), afirmaram que o seqüestro de íons metálicos pelas paredes celulares ocorre por meio de dois mecanismos, um constitui ligação direta nos grupos funcionais e o outro, composto por interação físico-química, que é chamada de fenômeno de adsorção. Enquanto os dois primeiros tipos de bioabsorção dependem de processos físico-químicos entre os íons metálicos e os grupos funcionais da superfície da célula, a acumulação intracelular é associada a uma etapa não metabólica de bioabsorção dos íons metálicos pelos sítios ligantes da estrutura celular e, outra, na qual estes íons passam pela membrana celular através de ciclos metabólicos celulares e, portanto um processo mais lento que as anteriores e que necessita de células viáveis (MALIK, 2004).

A composição das paredes celulares das células microbianas pode ser influenciada pelas condições de cultura, o que resultam em variações consideráveis na capacidade de bioabsorção (GADD, 1992). Outro fator importante é a atividade celular, que neste caso, quando ausente é capaz de seqüestrar íons metálicos com maior eficiência (DOBLE et al., 2005), sugerindo que o transporte ativo dificulte a entrada de íons metálicos, mantendo o gradiente de concentração ideal para as células por processo de defesa à toxidez provocada pelo metal e produção de proteínas para a desintoxicação celular (ADAMIS et al., 2003).

Há diversos estudos desta levedura nas mais diferentes formas que auxiliaram na compreensão do mecanismo de retirada de diversos metais tóxicos como o Pb, Cu, Cd, Hg, Am, U, Ni, Zn, entre outros (Wang and Chen, 2006). É digno de nota que estudos demonstraram que a *Saccharomyces cerevisiae* pode diferenciar metais baseados na sua toxicidade e que apresenta mais afinidade com U, Pb, Hg do que Cu, Ni e outros metais. Foi demonstrado que a capacidade de acumular U e Zn em células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* é 40% maior quando comparada à biomassa viva (VOLESKY and PHILLIPS, 1995).

Cossich et al (2000) concluíram que para a implementação de uma nova tecnologia de remoção de metais pesados, alguns requisitos devem ser preenchidos pelos bioabsorbentes:

- a biomassa deve ter a capacidade de acumulação elevada, da ordem de 70 a 100 mg de metal por grama de biomassa seca;
- a bioabsorção e a adsorção devem ser rápidas e eficientes;

- o material biológico deve apresentar baixo custo, ser reutilizável e ser adaptável a diferentes configurações de reatores;
- a separação do material retido deve ser fácil e de baixo custo.

Muitos bioabsorventes apresentam todas essas características, com exceção da última, por isso, são utilizados na forma imobilizada quando se trata de grande volume de efluentes contaminados por metais pesados.

A imobilização é um processo em que um material inerte age como suporte na biomassa formando uma estrutura sólida que é quimicamente estável e facilita o processo de separação entre o bioabsorvente e o resíduo líquido. As técnicas mais comuns de imobilização baseiam-se na adsorção, na formação de ligações covalentes e no enclausuramento em matrizes poliméricas (VEGLIO and BEOLCHINI, 1997).

Segundo Gomes et al. (2007) que estudaram imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes suportes para remoção de cádmio, o melhor suporte para a imobilização desta levedura, é o alginato de cálcio por sua estabilidade e capacidade de retenção de 90% do metal.

A utilização da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada é descrita na literatura como um método de remoção de radionuclídeos em rejeito líquido (KEDARI et al., 2001) e (LIU et al., 2003), realizaram um estudo sistemático com a levedura imobilizada, no qual foram verificados, entre outros, os efeitos do pH, da temperatura e do tempo de contato da levedura com o ^{241}Am . Em duas horas de experimento, cerca de 92% do metal foi removidos do meio em pH 2-3, independentemente da temperatura do meio. No estudo da eficiência da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada para remoção de vários radionuclídeos, observou-se que a bioabsorção do ^{239}Pu , ^{241}Am , ^{144}Ce , ^{137}Cs , $^{103,106}\text{Ru}$ e ^{90}Sr , em pH de 1-2 chegou em 95% independente do ânion, após 60 minutos e, no caso do U^{233} , em 100 minutos (DAS et al, 2002).

Desta forma, a bioabsorção pode ser um método viável de baixo custo, de fácil aplicação e eficiente para tratamento de rejeitos radioativos líquidos armazenados no Laboratório de Rejeitos Radioativos do IPEN-CNEN/SP. Esses rejeitos contém ^{137}Cs , ^{241}Am , $^{235,238}\text{U}$ e produtos de fissão e são provenientes, principalmente, de centros de pesquisa, e incluem óleos lubrificantes e solventes utilizados em experimentos em geral e operações de descontaminação.

A implantação da biossorção para tratamento de rejeitos radioativos requer um estudo detalhado dos parâmetros que envolvem este processo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de remoção de amerício de uma solução por células de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas, imobilizadas em alginato de cálcio.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados materiais básicos para o trabalho com microrganismos como placas de Petri, peneira Tyler 200, frascos do tipo Erlenmeyer, frascos de polietileno 220 mL, balões volumétricos, béqueres, kitassatos, funil de buchner, filtro de papel, bureta, agitador magnético, pipetas descartáveis, agitador magnético, espectrômetro, pHmetro, balança semi-analítica, cronômetro, microscópio, pipetadores automáticos, bomba peristáltica. A *Saccharomyces cerevisiae* utilizada é da marca comercial Lassaffre, SAF Argentina – Indústria Argentina, importado e distribuído por SAF do Brasil Produtos Alimentícios Ltda. A solução de amerício utilizada é da marca Amersham, o alginato de sódio $(C_6H_7(NaO)_6)_n$ marca Cromoline e ácido nítrico P.A. da marca Merck.

Os ensaios foram realizados com esferas de alginato de cálcio, com e sem biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. A inativação celular foi feita com radiação gama e, a verificação da morte celular, feita pelos testes de coloração com azul de metileno (MORAES & ALVES, 1986) e inoculação em meio sólido de YEPD (1% de Extrato de Levedura, 1% de Peptona, 2% de Dextrose e 2% de Ágar).

Os parâmetros estudados foram: pH, tempo de contato e concentração.

As esferas de alginato de sódio foram preparadas, seguindo a metodologia proposta por GUKSUNGUR et al. 2003. Uma solução 2% de alginato de sódio foi gotejada lentamente em um erlenmeyer contendo solução 4% de $CaCl_2$, sob agitação constante. Ao final do gotejamento as microesferas foram separadas da solução de cloreto de cálcio e lavadas 4 vezes em água deionizada para a remoção total dos íons de cálcio livres. Para a preparação das microesferas contendo biomassa, foram acrescentados 2% de *Saccharomyces cerevisiae* à solução de alginato de sódio.

A concentração de biomassa aplicada na biossorção foi baseada na literatura (ITOH et al, 1975; VOLESKY et al, 1993 KEDARI et al, 2001), ou seja, 2% de massa/volume de solução. As esferas de alginato de cálcio com e sem biomassa foram colocadas em frascos de polietileno contendo 60 mL de solução de amerício. Os frascos

foram mantidos sob agitação constante a temperatura ambiente por 15, 30, 60, 120 e 240 minutos. As concentrações das soluções foram de 15Bq/mL, 75 Bq/mL e 150Bq/mL. Após os tempos de contato, 50 mL das soluções foram separadas e colocadas em frascos de polietileno de 220mL para contagem da radiação residual em espectrômetro de radiação gama, marca Canberra, modelo GX2518.

3. RESULTADOS

As figuras 1, 2 e 3 mostram os resultados obtidos dos experimentos de biossorção realizados com microesferas de alginato de cálcio com e sem células de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas immobilizadas. Pode-se observar que a capacidade de biossorção aumenta em função do tempos, sendo maior nos primeiros 60 minutos. Os resultados demonstram alta capacidade de biossorção em pH 4 em ambas as condições.



Figura 1: Biossorção de ^{241}Am com concentração inicial de 15 Bq/mL com pH 2 e 4 por A+S (alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae*) e A (alginato de cálcio).

Na figura 1, observa-se que em todos os tempos de contato, a solução de pH 4 apresenta maior biossorção. Em 60 minutos, a biossorção por alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae*

mostra uma remoção próxima a 100% e, em 240 minutos, a remoção por alginato de cálcio sem células de *Saccharomyces cerevisiae* se iguala ao resultado apresentado por biomassa imobilizada em alginato de cálcio.

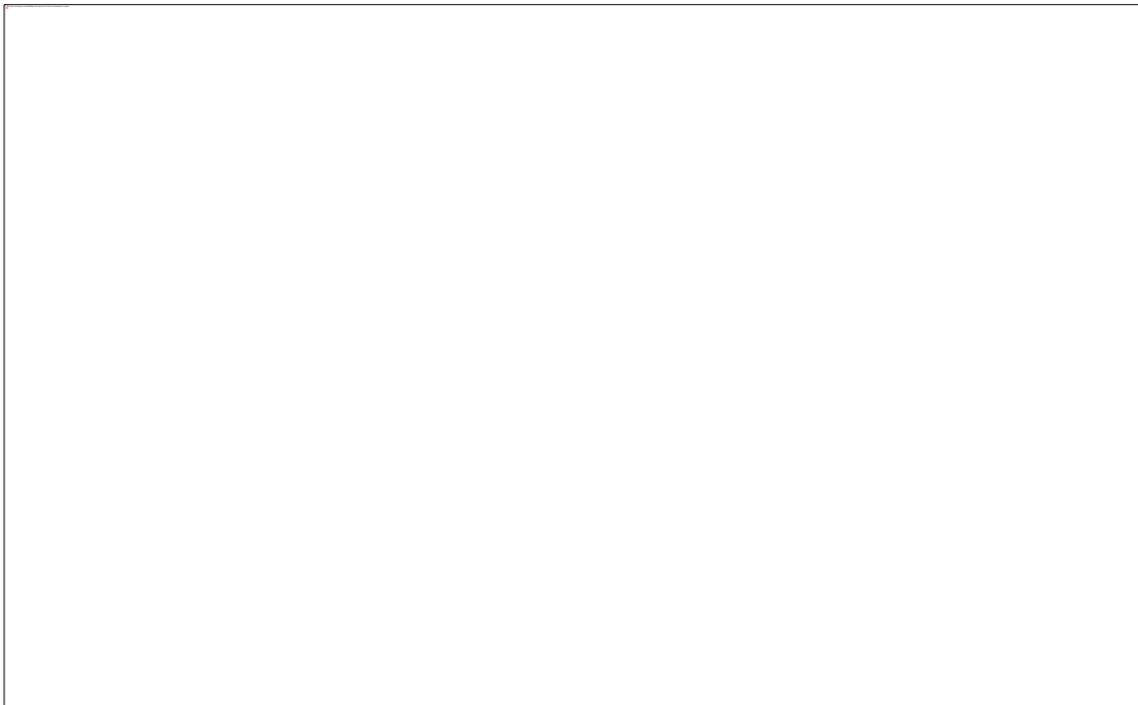


Figura 2 – Biossorção de ^{241}Am com concentração inicial de 75 Bq/mL com pH 2 e 4 por A + S (*Saccharomyces cerevisiae*) e A (alginato de cálcio).

Na figura 2, pode-se observar que em todos os tempos estudados, a biossorção foi mais eficiente em pH 4 e, a partir de 60 minutos a remoção do amerício por alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* foi maior que 80%. A partir de 120 minutos, os resultados demonstraram remoção próxima de 100% tanto em alginato de cálcio com quanto sem *Saccharomyces cerevisiae*.



Figura 3 – Biossorção de ^{241}Am com concentração inicial de 150 Bq/mL com pH 2 e 4 por A + S (*Saccharomyces cerevisiae*) e A (alginato de cálcio).

Na figura 3, observa-se que em concentração de 150 Bq/mL, pH 4, a biossorção apresenta resultados muito semelhantes quando realizada por alginato de cálcio com e sem *Saccharomyces cerevisiae*. Em 120 minutos de contato, ocorre biossorção de quase 100% para pH4.

Os resultados sugerem que o processo de biossorção é mais eficiente em pH 4 e, quanto menor a concentração de amerício, menor o tempo de contato necessário para promover a remoção do metal da solução. Em 120 minutos, a biossorção ocorreu em valores próximos a 100% para todas as concentrações avaliadas, o que também foi observado por Gomes et al (2006) nos estudos feitos com *Saccharomyces cerevisiae* inativada para biossorção de cádmio. Alginato de cálcio com *Saccharomyces cerevisiae* promoveu melhor biossorção no tempo de 60 minutos para as concentrações 15 e 75 Bq/mL e, alginato de cálcio sem a levedura revelou-se ótimo biossorbente em todas as concentrações no tempo de 240 minutos, quando iguala sua capacidade de remoção do amerício à do alginato de cálcio com a levedura imobilizada, ou seja, biossorção muito próxima de 100%. Este resultado também foi observado por Teixeira et al (1996) para remoção de cromo por esferas de alginato de sódio de efluentes industriais.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou o potencial de remoção do amerício de uma solução por células de *Saccharomyces cerevisiae* inativadas, imobilizadas em alginato de cálcio. Os resultados obtidos demonstram a eficiência desse biosorbente e pode ser viável no tratamento de rejeitos radioativos.

6. REFERÊNCIAS

ADAMIS, P. D.B. et al. **Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Braz. J. Microbiol.*, Apr 2003, vol.34, no.1, p.55-60. ISSN 1517-8382

BASÍLIO, M. S.; FRIESI, K.; DE LENA, J. C.; NALINI Jr., H. A.; ROESER, H. M. P.; ***Quim. Nova*** 2005, 28, 822.

BAYAN, Y.K.; KESKINLER, B.; ÇAKICE, A. LEVENT M.; AKAY, G. ***Water Resour.***, 2001, 35, 2191.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O., **Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomassa microbiana**, Revista Latinoamericana de Microbiología (2000) 42: 131-143.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, "**Licenciamento de Instalações Radiativas**" - *CNEN-NE-6.02*, 1985, Rio de Janeiro,

COSSICH, E.S.; TAVARES, C.R.G.; SILVA, E.A.; RAVAGNANI, T.M.K. Biossorção de cromo.
<http://www.icp.csic.es/cyted/Monografias/MonografiasTeneria/capitulo02ii.htm> (nov/2003).

DAS, S.K., KEDARI, C.Z., SHINDE, S.S., GOSH, S., **Jambunathan S. Performance of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in the removal of long lived radionuclides from aqueous nitrate solutions.** *J. Radional Nucl Chem* 2002; 253: 235-40.

DELLAMANO, J.C. Laboratório de Rejeito Radioativo, Departamento de armazenamento e tratamento de rejeitos líquidos e sólidos úmidos. IPEN/CNEN-SP, **Comunicação pessoal**, 2005.

DOBLE, M; KUMAR, **A Biotreatment of Industrial Efluentes**, 2005, 126, 165

FENG, D.; ALDRICH, C.; ***Hydrometallurgy***, 2004, 73, 1.

GAAD, G. M. in **Microbial Control of Pollution** (Fry, J.C., Gaad, G. M., Herbert, R. A., Jones, C. W. and Watson-Craik, I. A., eds), pp. 59-68, Cambridge University Press. 1992.

GOMES, Luiz Humberto ; TAVARES, Flavio Cesar Almeida ; ANDRINO, Felipe Gabriel ; RIO, Daniele Toledo Del ; DUARTE, Keila Maria Roncato . **Biossorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae***. In: ICTR2006, 2006, ÁGUAS DE SÃO PEDRO. III CONGRESSO BRASILEIRO ICTR 2006, 2006. v. 1.

GOMES, Luiz Humberto ; ALEXANDRINO, Natalia ; DUARTE, Keila Maria Roncato; ANDRINO, Felipe Gabriel ; TAVARES, Flavio Cesar A . **Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes suportes visando o tratamento de efluentes contaminados com cádmio**. In: 15 SIICUSP, 2007, Pirassununga. Anais do 15o. SIICUSP, 2006. v. 1. p. 12-12.

GUKSUNGUR, Y.; UREN, S.; GUVENÇ, U. **Biossorption of cooper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass**. Turkish Journal of Biology, v.27, p. 23-29, 2003.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY . **Radioactive waste management glossary**. 2nd ed. Vienna, 1988 (IAEA – TECDOC – 447).

KALSOOM AKHTAR, M. WAHEED AKHTARB, AHAMD M. KHALIDC, **Water Reseach** 4I (2007) 1366 – 1378.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVA, T.; CULLIMORE, D.R.; **Bioresour. Technol.**, 1999, 70, 95.

KEDARI, C.S.; DAS S.K.; GOSH, S. **J.Microbiol.Biotechnol.**,2001, 17, 789.

KUYUKA, N; VOLESKY, B. **Biosorpton by algal biomass**. In: **Volesky, B. Biosorption of heavy metals**. Estados Unidos: CRC Press, 1990, Charpter 2.4, p. 175-177.

LEE, S.S., ROBINSON, F.M., WANG, H.Y. **Biotechn. and Bioeng. Symp.**, 1974, 11, 1495

LIU N.; LIAO, J.; LUO, S.; YANG Y.; JIN, J.; ZHANG, T.; ZHAO, P. **J. Radional. Nucl. Chem.**, 2003, 258, 59.

LIU, N.; LUO S, YANG Y.; ZHANG, T. JIN J; LIAO, J.,J. **Radioanual. Nucl. Chem.**, 2002, 252, 187.

MARUMO, J.T. **Difusão de cloretos e ataque por sulfatos em pastas e argamassas de cimento Portland.** Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências na Área de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível - IPEN/CNEN, 1997

MURALEEDHARAN, T.R; LVENGAR, L. VENKOBACHAR, *Curr. Scien.*, 1991, 61, 379.

PELCZAR, MJ; REID, R; CHAM, ECS. *Fungos: As Leveduras.* In: Microbiologia (vol.1), pp. 345-366. McGraw-Hill, Brasil, 1981.

STRINGFELLOW, W.T.; KOMADA, T.; CHANG, L.-Y. **"Biological treatment of concentrated hazardous, toxic, and radionuclide mixed wastes without dilution"**, Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory Formal Report No. LBNL-55928., 2000 Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA

TEIXEIRA, J. A. ARAÚJO, M. M. **Remoção de crómio de efluentes industriais utilizando geis de alginato** CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 5, Aveiro, 1996 - "V Conferência Nacional Sobre a Qualidade do Ambiente". Aveiro: Universidade de Aveiro, 1996. vol. 2. ISBN 972-569-088-5.

TSEZOS, M.; *Hydrometallurgy*, 2001, 59, 241.

VEGLIO, F.E; BEOLCHINI, F. *Hydrometallurgy*, 1997, 44, 301

VOLESKY, B. *FEMS Microbiol, Rev.*, 1994, 14, 291.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H.A, *App. Microbiol. Biotech.*, 1995, 42, 797.

VOLESKY, B.; HOLAN Z.R. *Biotechnol. Prog.*, 1995, 11, 235.

WANG J.; CHEN, C. *Biotechnol. Adv.*, 2006, 24, 427.