



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA – CCSST
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTO

LOYANNE GUEDES SETUVAL

PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU

Imperatriz

2016

LOYANNE GUEDES SETUVAL

PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão/CCSST, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Crispim de Freitas

Imperatriz

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Setuval, Loyanne Guedes.

Produção de lipase utilizando subprodutos do coco
babaçu / Loyanne Guedes Setuval. - 2016.
22 f.

Orientador(a): Adriana Crispim de Freitas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Curso de
Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, 2016.

1. Atividade lipolítica. 2. Biomassa. 3. Fermentação
submersa. 4. Planejamento experimental. I. Freitas,
Adriana Crispim de. II. Título.

LOYANNE GUEDES SETUVAL

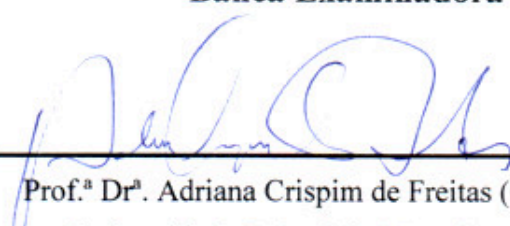
**PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO
SUBPRODUTOS DO COCO BABAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso Bacharelado em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal do
Maranhão/CCSST, para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de
Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas

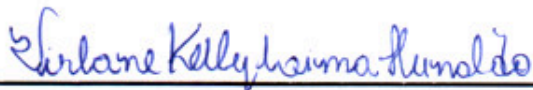
Aprovado em: 23/08/2016

Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA



Prof.^a Dr.^a Virlane Kelly Lima Hunaldo

Universidade Federal do Maranhão - UFMA



Prof.^a Dr.^a Maria Alves Fontenele

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Produção de lipase utilizando subprodutos do coco do babaçu

Loyanne Guedes Setuval^{1*}, Adriana Crispim de Freitas¹

¹Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, Estrada Centro de Treinamento Pará, Bom Jesus, Imperatriz, Brasil, loyanne.guedes@hotmail.com

Resumo

As lipases são grupo de enzimas com uma larga aplicação em diversos ramos industriais e possui um mercado crescente, por isso a demanda por processos econômicos e eficientes de produção de lipases é cada vez maior. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipase a partir dos subprodutos do coco babaçu por fermentação submersa. Utilizou-se o *Aspergillus oryzae* e os substratos endocarpo, mesocarpo e a borra, que são subprodutos da extração da amêndoa do coco babaçu, que é um fruto característico da região norte do Brasil. Para tal fim, foi realizado um planejamento experimental para definir a composição dos 10 ensaios realizados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação. Determinou-se a unidade de atividade lipolítica, pH e biomassa. Os melhores resultados de produção de lipases foram de 1.5 U/mL no ensaio 1 no meio contendo 100% de endocarpo após 96h de fermentação e 1.197 e 1.083 U/mL ensaio 9 e 4 após 48h de incubação, com os meios contendo em maior parte mesocarpo. Os pHs desses ensaios ficaram dentro da faixa ótima para crescimento de lipases fúngicas e as biomassas encontradas variaram de 0.009 a 0.013 g/mL.

Palavras-chaves: Fermentação submersa, atividade lipolítica, planejamento experimental, biomassa

Introdução

A tecnologia enzimática é um dos ramos que mais cresce dentro das novas tecnologias aplicadas para desenvolvimento de produtos com elevado valor agregado. O aumento do interesse industrial por essa tecnologia encontra-se notadamente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, estes por sua vez expandiram substancialmente as possibilidades de aplicação das enzimas nas operações industriais [5, 12, 28].

O avanço da tecnologia enzimática fica evidente quando relacionado com o comércio de enzimas, que tem aumentado de forma significativa, passando de \$400 milhões por ano na década de 80 para \$1 bilhão por ano na década de 90. Os números continuaram a crescer, em 2006 o mercado totalizou \$2.2 bilhões, aumentado para \$2.3 bilhões em 2007. Dados de 2011 revelam que a indústria de enzimas vendeu \$3.3 bilhões em 2010 e para 2015 o valor previsto foi de \$4.4 bilhões [1, 17, 40].

Dentre as enzimas comercializadas mundialmente estão as lipases, enzimas que pertencem ao grupo das serina hidrolases, denominadas de triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), estas tem habilidade de hidrolisar parcialmente ou totalmente triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres. Este grupo de enzimas tem aplicação em aproximadamente 35% dos processos bioquímicos e são consideradas o terceiro grupo enzimático mais vendido, movimentando bilhões de dólares no mercado de enzimas. Apesar destes números e a variedades de lipases microbianas, as indústrias enfrentam dificuldades com os elevados custos relacionados ao rendimento da produção, condições do processo e com a estabilidade da enzima [10, 14, 15, 30, 31].

As lipases microbianas apresentam vantagens em relação às demais fontes, quanto à estabilidade. Esta classe de enzimas apresenta aplicações numa gama de processos, como nas

formulações de detergentes, no tratamento de efluentes, na produção de biodiesel (indústria oleoquímica), fábricas agroquímicas, produção de papel, indústria de alimentos, fabricação de aromas, formulações de cosméticos, indústria de plásticos e fibras sintéticas, produção de fármacos e entre outras indústrias [3, 20, 22].

Entre os microrganismos produtores de lipases, os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas lipolíticas. Sendo os fungos valorizados industrialmente por produzirem enzimas extracelulares, facilitando a recuperação destas do meio de fermentação em especial o fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* [8, 9, 18, 19, 27, 36, 39].

A utilização de subprodutos como substratos na tecnologia enzimática é uma tendência, tendo com finalidade o reaproveitamento e a diminuição de custos da produção de enzimas. O Brasil possui uma diversidade de subprodutos, em particular aqueles relacionados a extrativismo vegetal, destacando-se o babaçu, *Orbignya sp*, que é uma palmeira robusta de até 20 metros de altura e com diâmetro variando de 25 a 44 centímetros, produzindo mais de 1000 frutos cada árvore. Estes frutos são lenhosos, ovais alongados, com polpa fibrosa-farinácea, denominados de coco do babaçu, apresenta uma composição de 12-18% de epicarpo (material fibroso), 17-22% de mesocarpo (matéria amilácea), 52-60% de endocarpo constituído por vários minerais e 6-8% de amêndoa oleaginosa, a parte em que é extraído o óleo, resultando na borra que é um subproduto [2, 11, 21, 24, 38, 41].

Em 2013 foram colhidas no Brasil cerca de 89 000 toneladas do fruto do babaçu, sendo que o aproveitamento deste está relacionado à extração do óleo da amêndoa, enquanto que o restante do fruto tem pouca ou nenhuma significativa aplicação na indústria em geral, portanto observa-se a necessidade de estudos em que os subprodutos deste fruto sejam utilizados como fonte de energia e matéria-prima nos processos industriais [2, 11, 21, 24, 38,

41]. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipase a partir dos subprodutos do coco babaçu por fermentação submersa.

Materiais e Métodos

Substratos

Os substratos utilizados para formulação dos meios foram subprodutos das etapas de obtenção do óleo babaçu: mesocarpo, borra e endocarpo do babaçu. O endocarpo foi gentilmente cedido pela Tobasa Bioindústria de Babaçu S.A localizada em Tocantinópolis-TO, Brasil, a farinha do mesocarpo e a borra foram compradas na Associação de Quebradeiras de Coco de Cidelândia, Cidelândia-MA, Brasil. O mesocarpo e o endocarpo foram armazenados a temperatura ambiente de 25°C e a borra do babaçu sob refrigeração a 7°C.

Cultura de Microrganismo

A linhagem utilizada neste estudo foi o fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* CCBP 001 pertencente a Coleção de Cultura do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE. O microrganismo foi periodicamente subcultivado e mantidos em tubos com Ágar Batata dextrose inclinado. Para produção de esporos do fungo, o microrganismo foi inoculado em meio composto por 10 g de farelo de trigo e de 5 ml de solução contendo 1,7% (m/v) NaHPO_4 e 2,0% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e incubadas durante 5 dias a 30°C. Os esporos dos fungos foram dispersos em solução estéril de Tween 80 (0,1%) para preparar o inoculo para a fermentação. O número de esporos por mililitro de suspensão de esporos foi determinada com uma câmara de Neubauer. O padrão estabelecido para os meios de fermentação para o tamanho do inoculo foi de 10^7 esporos por 100 mL de meio [23].

Produção de Lipase

A produção de lipase foi realizada por fermentação submersa onde os substratos foram utilizados de forma individual, binário e ternário com diferentes proporções de misturas em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de meio, incubados em Shaker orbital da Novatécnica com agitação de 0,2795 xg, a 30°C. O tempo de retirada amostral foi de 24 h, 48h, 72h e 96h de processo fermentativo, portanto foram realizados 40 experimentos. O extrato enzimático bruto foi obtido através de filtração utilizando papel de filtro qualitativo, para separação do material celular do caldo fermentado e armazenado sob congelamento.

Delineamento experimental de mistura

O delineamento experimental de misturas foi utilizado para obter uma composição ótima entre os subprodutos do babaçu para obtenção de uma máxima produção de lipase e avaliar os efeitos de interação entre os componentes da mistura. Um planejamento experimental do tipo Simplex Lattice utilizando três componentes para a mistura foi utilizado. Cada componente da mistura foram avaliados nas seguintes proporções: 1(100%), 0 (0%), 1/3 (33,33%) e 2/3 (66,67%) (Tabela 1), sendo considerado 2 g o valor de 100% de subprodutos na formulação de 100 mL de meio, utilizando como diluente água destilada.

Tabela 1. Matriz do delineamento da mistura Simplex Lattice para produção de lipase com *A. oryzae* CCBP 001 em fermentação submersa utilizando diferentes subprodutos de babaçu

Ensaio	Variáveis independentes		
	Endocarpo X ₁	Mesocarpo X ₂	Borra X ₃
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/3	2/3	0
5	1/3	0	2/3
6	0	1/3	2/3
7	2/3	1/3	0
8	2/3	0	1/3
9	0	2/3	1/3
10	1/3	1/3	1/3

Para obtenção do delineamento experimental, análise dos dados e construção do modelo foi utilizado o software *Statistica*TM 10 da Statsoft Inc. (Tulsa, Oklahoma, USA).

Determinação da atividade lipolítica

O método de determinação da atividade lipolítica por titulação de ácidos graxos, baseia-se na utilização de uma emulsão formada por óleo e goma arábica que será hidrolisada. Para isso foi realizada a reação com uma mistura de 2mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,0), 5mL de uma emulsão de 75% de uma solução de goma arábica (7% m/v) e 25 % de azeite de oliva com 1mL do extrato enzimático obtido da filtração do fermentado. A reação ocorreu sobre aquecimento a 37° C durante 30 minutos, após este tempo a reação foi paralisada com a adição de 15 mL de solução de acetona e etanol (1:1), que tem função de liberar os ácidos graxos livres presente na mistura. Em seguida, foi adicionado o indicador fenolftaleína e titulada a mistura com a solução de hidróxido de sódio (0,05 N). Os ensaios foram realizados em duplicata e no branco foi adicionado 1mL de água destilada ao invés do extrato. A atividade enzimática é medida pela unidade da atividade lipolítica (U/mL), esta é

definida como a quantidade da enzima bruta que liberou 1µ/mL de ácido graxo por minuto [32, 33]. A atividade de enzima em U/ml foi mensurada pela Equação 1:

$$\text{Atividade} = \frac{(V_a - V_b) * 1000 * N_{\text{NaOH}}}{t * V} \quad \text{Equação 1}$$

Em que V_a foi volume gasto na amostra de NaOH, V_b o volume gasto no branco, N_{NaOH} a normalidade da solução de NaOH, t o tempo de reação e V o volume de extrato enzimático.

Determinação da Biomassa Microbiana

Foi determinada a massa micelial, após filtração em papel de filtro previamente seco e pesado, o material retido foi secado pela estufa a 95°C por 24 horas, por fim pesado. O sobrenadante foi utilizado para determinação do pH e da atividade lipolítica.

Determinação do pH

As medições do pH foram realizadas no meios antes da fermentação e depois no sobrenadante, resultado da filtração do meio fermentado, em pHmetro da marca Nova Técnica.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para a atividade lipolítica estão dispostos na Tabela 2, observa-se que no geral para os ensaios de 24h, os valores encontrados variaram de 0.1 a de 0.5 U/mL, ressaltando os pontos 2, 5 e 9, que tiveram produções até três vezes maiores do que os ensaios 1, 3, 4 e 6. Analisando a ensaio 2 com 100% de mesocarpo, nota-se que houve a maior produção de lipases e também apresentou valores maiores quando comparado com os meios com 100% de endocarpo ou borra, observa-se que a utilização de apenas mesocarpo foi o suficiente para obter a maior produção de lipases neste tempo de fermentação. No experimento 5, contendo 33.33% de endocarpo e 66.67 % de borra, obteve-se a segunda

maior produção, diferentemente do experimento 8 que produziu a metade do que no 5, apesar de conter os mesmos substratos porém em concentrações inversas. O ensaio 9, possuía 66.67% de mesocarpo e 33.33% de borra, esta composição resultou na terceira melhor atividade lipolítica, quando o contrário acontece, a borra se torna um inibidora para produção. Os meios contendo mesocarpo e endocarpo (4 e 7), não possuíram uma sinergia positiva, pois estes apresentaram uma baixa produção de lipases.

Tabela 2. Produção de lipase por *A. oryzae* CCBP 001 por fermentação submersa em 24, 48, 72 e 96h nos ensaios do planejamento experimental de misturas Simplex Lattice

Ensaio	Substratos (%)			Unidade de atividade lipolítica (U/mL)			
	Endocarpo	Mesocarpo	Borra	24h	48h	72h	96h
1	100	0	0	0.167	0.750	0.500	1.500
2	0	100	0	0.667	0.167	0.750	0.083
3	0	0	100	0.167	0.833	1.000	1.000
4	33.33	66.67	0	0.167	1.083	0.500	0.333
5	33.33	0	66.67	0.500	0.333	0.333	0.500
6	0	33.33	66.67	0.167	0.500	0.333	0.083
7	66.67	33.33	0	0.250	0.167	0.250	0.500
8	66.67	0	33.33	0.250	0.083	0.917	0.417
9	0	66.67	33.33	0.417	1.167	0.667	0.167
10	33.33	33.33	33.34	0.333	0.583	0.750	0.417

Para os ensaios de 48h de fermentação, destaca-se o ponto 9 e 4 com os valores 1.197 e 1.083 U/mL respectivamente, sendo estes o segundo e o terceiro melhores resultado dentro todos os tempos utilizados neste experimento para produção de lipases, a composição destes ensaios tinham em comum 66.67 % de mesocarpo, sendo que ensaio 9 apresentava 33.33% de

borra e ensaio 4 com 33.33% de endocarpo. Neste tempo de incubação, seis ensaios apresentaram unidade de atividade lipolítica igual entre intervalo de 0.5 a 1.1 por mL, dentre estes ensaios quatro deles tinham mesocarpo em suas composições, destaca-se que o uso deste substrato foi sinérgico positivamente com a borra e o endocarpo em poucas concentrações. Portanto, o uso de mesocarpo associado com os outros substratos nos ensaios de 48h de incubação, foi extremamente importante para o boa produção de lipase. Fica evidente também na Tabela 2, que o endocarpo ou a borra, quando utilizados 100% tiveram uma alta atividade lipolítica.

A maioria dos ensaios com 72h de fermentação obtiveram valores entre 0.5 e 1.0 U/mL, sendo assim a cinética de 72h foi a melhor para produção de lipases quando considerados todos os meios utilizados. A borra quando utilizada 100%, obteve o melhor desempenho neste tempo de fermentação. E o mesocarpo quando utilizado 66.67% na composição do substrato associada com a borra ou endocarpo em menores proporções, obteve valores melhores do que quando usado em menor quantidade. O ensaio 8 com 66,67% de endocarpo e 33.33% de borra, alcançou resultado de 0.917 U/mL, observando-se um efeito sinérgico positivo entre essa proporção com tempo de incubação de 72h.

Em 96h de fermentação obteve-se a maior produção de lipase, sendo esta no ensaio 1 com 1.5 U/mL, o meio de produção era composto por 100% de endocarpo, apesar deste valor expressivo nota-se (Tabela 2), porém, que oitos ensaios deste tempo tiveram produção entre 0.08 e 0.5 U/mL. Dentre estes, os meios contendo endocarpo quer seja com 66.67 % ou 33.33% obtiverem maiores valores de atividade lipolítica do que os demais que não continham. Assim, torna-se evidente a importância do uso do endocarpo na produção de lipases com 96h de fermentação.

Comparando os maiores resultados com a composição do meios utilizados neles (Tabela 2), evidencia-se que os pontos 9 e 4 com 48h de fermentação tinham em comum

66.67% de mesocarpo, enquanto que o ponto 1 com 96h de incubação era constituído somente de endocarpo. Na maioria dos ensaios que obtiveram melhores desempenhos observa-se um padrão em que estes meios continham mesocarpo ou o mesocarpo em maior quantidade, isso ocorreu principalmente pela composição do mesocarpo do babaçu, que possui elevado teor de carboidratos cerca de 87% e valores de 2.4 e 0.7% de proteínas e lipídios respectivamente [13, 25].

Com relação aos meios com bons desempenhos contendo borra e endocarpo, notou-se que com 24h de fermentação, a produção era alta de enzimas nos meios contendo maior proporção de borra e menor de endocarpo, no entanto para fermentação de 72h, os melhores resultados era para os ensaios com maior proporção de endocarpo do que borra e no de 96h todos os meios que continham endocarpo apresentaram melhores resultados que os outros ensaios.

Entende-se que para esses ensaios a borra nas primeiras horas de fermentação possui uma composição mais atrativa e fácil de ser usada pelos microorganismos, com 40% de carboidratos e altos teores de lipídios e proteínas, por volta de 30% e 18% respectivamente, possibilitando assim este crescimento, após 72h e 96h de fermentação, o endocarpo, que é constituído de 70% de holocelulose (celulose e hemicelulose), 24% lignina e 2% de minerais, se torna o meio mais propício para produção de lipase após algum tempo de fermentação devido ao difícil consumo desse tipo de carboidrato [13, 25].

Apesar de não haver estudos similares usando subprodutos do babaçu como substrato, alguns trabalhos aproveitaram a borra obtida após extração do óleo da amêndoa como substratos porém com a suplementação dos meios e a produção por fermentação sólida, por isso valores maiores são encontrados como Cavalcanti *et al.* [6] produziu lipases inoculando o *Penicillium simplicissimum*, usando como substrato a borra do babaçu suplementada com cana de açúcar, obteve máximo de 26.4 U/g e Gombert *et al.* [16] alcançou resultado de 30.3

U/g, aplicando *Penicillium restrictum*, borra do babaçu também suplementada, porém, com óleo de oliva.

Comparando os resultados com trabalhos que produziram lipases por fermentação submersa e usando algum tipo de subproduto agroindustrial, mas com inoculação de outros microorganismo, como Oliveira *et al.* [29] que utilizaram glicerol e levedo de cerveja e o óleo de soja como indutor, obtiveram 7.27 U/mL. Roveda *et al.* [35] obtiveram máximo de 2.25 U/mL, utilizando efluente de laticínios suplementados e azeite de oliva como indutor no meio de cultura. Os valores de unidade de atividade lipolítica são altos comparados com os resultados obtidos, no entanto vale ressaltar que todos experimentos referenciados usaram substratos suplementados e algum tipo de indutor, estes fatores que cooperam significativamente para produção de lipases.

A Tabela 3 mostra os valores de pH dos meios obtidos antes e após os tempos de incubação. Geralmente, os fungos são capazes de crescer em uma faixa de pH que varia de 4 até 12 e estes tendem a produzir maior quantidade de lipases no meio alcalino do que no meio ácido [25]. Os valores de pH encontrados para os ensaios antes de iniciar a fermentação encontram-se perto de 6.0, ou seja dentro da faixa da neutralidade.

Tabela 3. Resultados de pH no tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação

Ensaio	pH – 0h	pH – 24h	pH – 48h	pH – 72h	pH – 96h
1	5.7	4.79	5.89	6.23	6.55
2	5.9	4.46	4.47	4.82	6.84
3	5.9	5.85	6.02	5.91	6.53
4	5.8	4.53	4.87	6.1	7.01
5	5.9	5.83	6.03	6.05	6.51
6	6	5.84	5.63	6.01	6.64
7	5.8	3.62	5.86	6.1	7.14
8	5.8	5.32	6.01	5.98	6.82
9	5.9	3.1	4.44	7.23	7.23
10	5.9	4.72	5.76	7.24	7.13

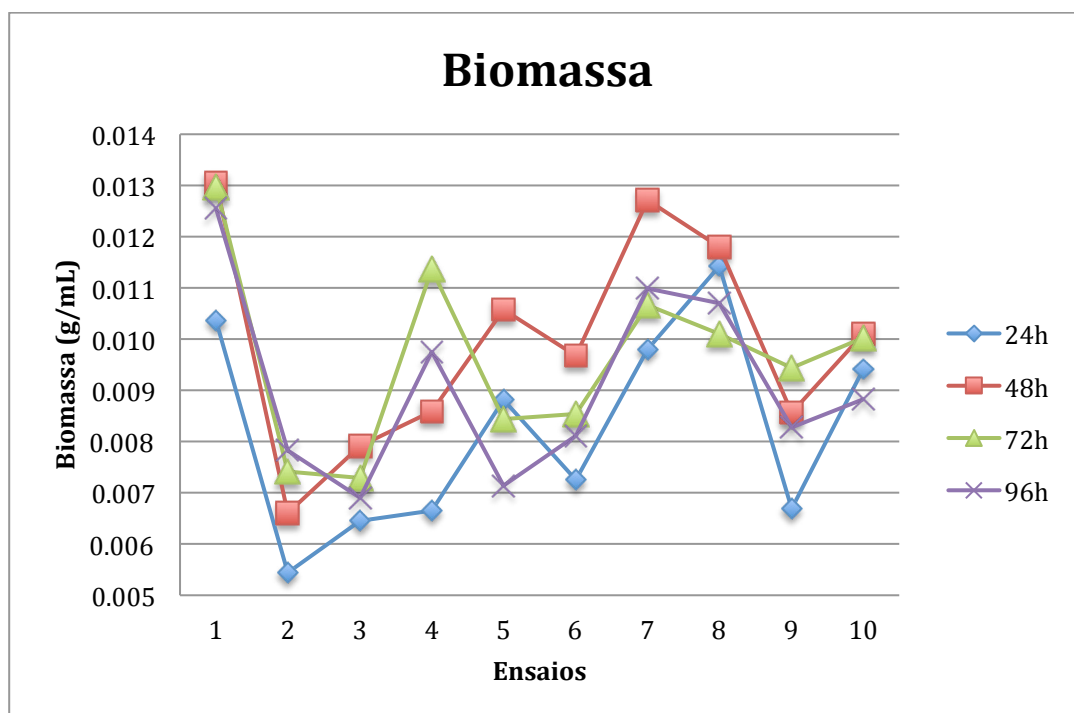
Após 24h de fermentação observa-se um redução dos valores de pH, se tornando mais ácidos. Nos tempos de 48h estes valores aumentam e com 72h, nota-se que os valores pH dos ensaios encontram-se próximos de 6 novamente, enquanto que com 96h de incubação todos os ensaios possuem pH neutros entre 6.0 e 7.5. Portanto, observa-se um comportamento de acordo com o tempo, na qual o pH é reduzido nas primeiras 24 horas, depois aumenta-se para valores iniciais (48 e 72h) e em seguida para valores pertos da neutralidade. Chancharoonpong *et al.* [7] inoculou mesmo microorganismo deste experimento, porém com diferentes condições e observou um comportamento similar, onde pH inicial de 6.32 diminui, depois de 36h aumentou, alcançando valores próximo a neutralidade.

Castilho *et al.*[4] argumenta que a produção máxima de lipases fúngicas, em geral, acontece quando alcança valores de pH entre 7 e 8, nota-se que para este experimento o melhor resultado obtido de unidade de atividade lipolítica, ensaio 1 de 96h teve o pH 6.55,

valor este bem próximo do relatado na literatura como pH ideal para produção máxima de lipases fúngicas.

As biomassas determinadas pelo peso seco para os ensaios estão na Figura 1, observa-se que os ensaios 1, 7 e 8 possuem os valores mais altos, os meios destes pontos foram formulados com maior percentual de endocarpo, que tem a característica de não se dissolver totalmente devido a composição deste, contribuindo dessa forma por um maior peso seco. Apesar do comportamento desses ensaios específicos, o tempo de 48h de fermentação obteve seis meios com valores de biomassa maiores do que os outros tempos, variando de 0.009 a 0.013 g/mL. O melhor ensaio considerado neste trabalho, obteve 0.013 g/mL. O resultados de biomassa obtidos ficam dentro da faixa de alguns trabalhos que utilizaram fungos do gênero *Aspergillus* com uso de um indutor no meio, como Sethi *et al.* [37] que alcançaram crescimento máximo de biomassa de 0.018 g/mL e Rodrigues *et al.* [34] que obtiveram 0.009 g/mL, utilizando como substrato torta de óleo de mostarda e efluentes com alto conteúdo de gordura, respectivamente.

Figura 1. Resultados da biomassa no tempo de 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação



Embora não tenha-se uma relação direta da quantidade de biomassa produzida com atividade lipolítica encontrada, argumenta-se que a produção de biomassa indica o crescimento de microrganismos produtores de enzimas, estas podem ser lipases, proteases, amilases entre outras.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos efeitos, erro padrão e valores t e p-valor para atividade lipolítica no tempo de 24 h de fermentação, tempo de fermentação que apresentou maior produtividade, a relação de produção com tempo de fermentação. A variável de composição dos meio de cultura com mesocarpo foi a única que mostrou um efeito significativo na produção de lipases com confiança de significância de 90%.

Tabela 4. Efeitos dos valores estudados no planejamento Simplex Lattice sobre atividade de lipase

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(3)	p-valor
Endocarpo – X₁	0.166667	0.139633	1.19360	0.318417
Mesocarpo – X₂	0.642857	0.139633	4.60390	0.019268
Borra – X₃	0.190476	0.139633	1.36412	0.265855
X₁ X₂	-0.883929	0.652682	-1.35430	0.268618
X₁ X₃	0.883929	0.652682	1.35430	0.268618
X₂X₃	-0.562500	0.652682	-0.86183	0.452163
X₁ X₂ X₃	1.687500	4.786455	0.35256	0.747735

Nível de confiança = 90%; p-valor \leq 0.1

As variáveis endocarpo, mesocarpo e borra exibiram efeito positivo sobre a atividade lipolítica, assim como a interação do endocarpo e borra e a interação da 3 variáveis. Porém, a interação endocarpo e mesocarpo e a interação mesocarpo e borra apresentaram um efeito negativo na produção de lipases.

Os resultados do planejamento experimental para cinética de 48, 72 e 96h não apresentaram significância estatística, mas foi possível obter uma produção de lipase em todas as combinações dos substratos propostas pelo planejamento e com os substrato sendo utilizados de forma individualizada.

Portanto, com 24h de fermentação obteve-se a melhor produtividade e resultados mais altos quando usou-se o substrato mesocarpo, com 48h de fermentação os meios contendo mesocarpo também se sobressaíam comparado com os demais, ressalvando que meios individualizados de borra e endocarpo obtiveram bons resultados. Para 72h de fermentação a maioria dos meios contendo borra apresentaram as melhores atividade lipolítica. Na cinética de 96h, todos os meios contendo endocarpo na sua composição resultaram em atividades de lipases mais altas.

Percebe-se o potencial dos subprodutos do coco babaçu como substratos para produção de lipases, sendo necessários estudos que otimizem as condições de fermentação e aplicação de indutores para melhorar a produção dessa enzima. Apesar dos resultados não apresentarem significância estatística, eles revelam o comportamento dos substratos nos tempos de fermentação propostos .

Referencias

1. BBC Research. 2011. *Report BIO030 F Enzymes in Industrial Applications: Global Markets*; BBC Research: Wellesley, MA, USA.
2. Brandão M, Laca-Buendia JP, Macedo JF. 2002. *Arvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais*, pp. 528. Ed. EPAMIG, Belo Horizonte.
3. Cammarota MC, Freire DMG. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wasterwater with high oil and grease content. *Bioresour. Technol.* **97**: 2195-2210.

4. Castilho LR, Polato CMS, Baruque EA, Sant'anna JGL, Freire DMG. 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. *Biochim. Eng. J.* **4**: 239-247.
5. Castro HF, Mendes AA, Santos JC, Aguiar CL. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova.* **27**: 146-156.
6. Cavalcanti EDC, Gutarra MLE, Freire DMG, Castilho LR, Junior GLSA. 2005. Lipase Production by Solid-State Fermentation in Fixed-Bed Bioreactors. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **48**: 79-84.
7. Chancharonpong C, Hsieh PC, Sheu SC. 2012. Effects of different combinations of soy bean and wheat bran on enzyme production from *Aspergillus oryzae* s. *APCBEE Procedia.* **2**: 68-72.
8. Chavan SB, Deshpande MV. 2013. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnol. Prog.* **29**: 833- 846.
9. Dhillon GS, Brar SK, Verma M. 2012. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **47**:542–548.
10. Domínguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán AA. 2003. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotech. Letters.* **25**: 1225-1229.
11. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2007. *Oleaginosas Potenciais do Nordeste para a produção de Biodiesel*, pp. 57. EMBRAPA, Campina Grande.
12. Fernandes MLM, Krieger N, Baron AM, Zamora PP, Ramos LP, Mitchell, DA. 2004. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **30**: 43-49.

13. Ferrari RA, Soler MP. 2015. Obtention and characterization of coconut babassu derivatives. *Sci. Agric.* **72**: 291-296.
14. Fickers P, Marty A, Nicaud JM. 2011. The Lipase from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **29**: 632-644.
15. Gandhi NN. 1997. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**: 621-634.
16. Gombert AK, Pinto AL, Castilho LR, Freire DMG. 1999. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem.* **35**: 85-90.
17. Gomes E, Umsza Guez MA, Martin N, Da Silva R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova.* **30**: 136-145.
18. Gopinath SC, Anbu P, Lakshmipriya T, Hilda A. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *Biomed. Res. Int.* **154549**:1-10.
19. Goswami S, Rani A, Priyadarshini R, Bhunia B, Mandal T. 2012. A review on production of echinocandins by *Aspergillus* sp. *J Biochem. Tech.* **4**: 568-575.
20. Hassan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**: 235-251.
21. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. Produção da extração vegetal e da silvicultura. *Prod. Extr. veg. e Silv.* **28**:1-69.
22. Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:390-397.
23. Lima, BF, Amarin HS, Nascimento AE, Takaki GMC, Silva CAA. 2014. Selection of media of production lipase samples by *Aspergillus* sp isolated from caatinga in Pernambuco. *E-xacta*, **7**:147-157.

24. Lorenzi H. 2000. *Arvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 3th Ed. Nova Odessa: Plantarum.
25. Mahmoud GA, Koutb MMM, Morsy FM, Bagy MMK. 2015. Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *Eur. J. Biol. Reser.* **5**: 70-77.
26. Maia CMBF, Guitoku M, Reuen CCM, Signor D. 2014. *Biochar from babassu residues: chemical characterization and thermo gravimetric analysis*. International humic substances society, Greece.
27. Maldonato RR, Macedo GA, Rodrigues MI. 2014. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. *Int. J. Appl. Sci. Techno.* **4**:108-115.
28. Nigam PS. 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules.* **3**: 597-611.
29. Oliveira ACD, Vargas JVC, Rodruigues MLF, Mariano AB. 2013. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. *R. Bras. Prod. Agro.* **15**: 19-26.
30. Padilha GDS, Santana, JCC, Alegre, RM, Tambourgi, EB. 2012. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **55**: 7-14.
31. Paques FW, Macedo GA. 2006. Plant lípases from látex: properties and industrial applications. *Quim. Nova.* **29**: 93-99.
32. Reed G. 1975. *Enzymes in food processing*. 2nd Ed. Wisconsin: Academic Press.
33. Reinehr CO, Cidade LC, Tres MV, Treichel H, Colla, LM. 2015. Comparação de métodos para determinação da atividade de hidrólise de lipases microbianas. *Simpósio Nacional de Bioprocessos*.

34. Rodrigues C, Cassini STA, Antunes PWP, Pinotti LM, Keller RP, Gonçalves RF. 2016. Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *Afr. J. Biotechnol.* **15**: 759-767.
35. Roveda M, Hemkemeier M, Colla LM. 2010. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **30**:126-131.
36. Samson RA, Varga J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Med. Mycol.* **47**: S13-S20.
37. Sethi BK, Nanda PK, Sahoo S. 2016. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. *Braz. J. Microbiol.* **47**: 143-149.
38. Silva BP, Parente P. 2001. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbigyia phalerata*. *Fitoterapia.* **72**: 887-893.
39. Singh AK, Mukhopadhyay M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**: 486-520.
40. Takaç S, Marul B. 2008. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*.
41. Teixeira MA. 2008. Babassu – A new approach for an ancient Brazilian biomass. *Biomass Bioenergy.* **32**: 857-864.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

OBJECTIVOS E ÂMBITO

The Journal of Microbiology and Biotechnology (JMB) é uma revista mensal internacional revista dedicada à promoção e divulgação do conhecimento científico relativa microbiologia, biotecnologia, biomedicina e acadêmicos relacionados disciplinas. Abrange aspectos científicos e tecnológicos de microbiologia, incluindo Bioactive Compounds /Microbiologia de Alimentos; Biocatálise e Bioprocessos Engenharia; Microbiologia Ambiental / Microbial Diversidade; molecular e Microbiologia Celular / Ciências Biomédicas (as subcategorias estão disponíveis em detalhe on-line em <http://www.jmb.or.kr/about/about.html>). JMB é publicado e distribuído como um número regular no dia 28 de cada mês, e, ocasionalmente, como uma edição especial, pela Sociedade Coreana de Microbiologia e Biotecnologia (KMB).

POLÍTICA EDITORIAL

Originalidade, autoria e copyright

Os manuscritos submetidos para publicação devem ser inéditos trabalhos de pesquisa escritos em Inglês, que não estão sendo considerados para publicação em outro lugar. Todos os autores devem ter concordado com a proposta e ao ordem de seus nomes na página título. Eles também deve ter concordado que a autor correspondente pode agir em seu nome em toda a revisão editorial e processo de publicação. O autor correspondente é responsável pela obtenção tal acordo. Os pedidos de mudanças na autoria (ordem de apresentação ou adição ou supressão de nome) após a apresentação deve ser acompanhada por assinaram declarações de concordância de todas as partes envolvidas. No entanto, por favor Observe que as mudanças na autoria não são permitidos depois de um papel foi

aceite. Para manter e proteger a propriedade e os direitos da sociedade, e para proteger o autores originais de desvios de seu trabalho publicado, autor (es) são obrigados a assinar um Acordo de Transferência de Direitos Autorais, que será enviado para o autor correspondente confirmando o recebimento do manuscrito, quando um manuscrito for aceito para publicação. A menos que este acordo é executado, KMB não vai publicar o manuscrito.

FORMATOS DE ARQUIVO

Prepare o texto no Microsoft (MS) Word (6.0 ou versão mais recente) ou WordPerfect. Defina o tamanho da página para ter margens de 2,5 cm em todos os lados. O tamanho da fonte deve ser menor do que 12 pontos. Digite cada porção da dupla manuscrito espaçados, incluindo referências e legendas de figuras e número de todas as páginas sequência, incluindo os abstratos, legendas de figuras e tabelas. Os dois últimos itens devem ser colocados após a seção de Referência. Páginas manuscrito deve têm números de linha. O texto do seu manuscrito (incluindo página de título, resumo, principais de texto, referências e legenda de figuras), seguido de tabelas e figuras deve estar em um arquivo única palavra para a apresentação inicial. Cada figura deve ser marcado com um número da figura. Fontes padrão (Times New Roman, Times, ou Correio), de preferência Times New Roman deve ser utilizada para a geração de texto e Arial ou Helvetica para as figuras. Use a fonte Symbol eo Opção "Inserir símbolo" da barra de menu para a introdução de símbolos em MS Palavra. Os autores podem enviar seus artigos como MS Word (6.0 ou uma versão posterior) ou WordPerfect. Também é possível enviar um artigo em um pronto-a Adobe Acrobat formato PDF, mas se o artigo for aceito, os arquivos originais será necessário. Os autores devem, em seguida, verificar a conversão de PDF com cuidado para certifique-se de que tudo convertido corretamente. Este formato é aceitável para apenas para fins de revisão. Se o seu trabalho for aceito, você está então obrigada a enviar a versão final como arquivos de origem incluindo um arquivo do Word em separado para o texto e TIFF gráfico ou arquivos EPS. Os manuscritos que não seguem o "Arquivo Formatos "e" Organização e estilos de

manuscritos "(abaixo) não são adequados para revisão editorial ou publicação, e será devolvido ao autor.

ORGANIZAÇÃO E ESTILOS DE MANUSCRITOS

I. Os artigos

Os artigos são relatórios de pesquisa de corpo inteiro que contêm descrições detalhadas de trabalho experimental, com uma interpretação clara e discussão do teórico e os resultados experimentais e os dados. Os artigos devem ser estruturados sob a títulos das seções Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Reconhecimento, Nomenclatura / Apêndice (se aplicável), e Referências. Os autores devem apresentar o material com a maior clareza e concisão e de uma maneira lógica. A constante repetição de procedimentos experimentais, informação, e os fatos entre seções devem ser evitados. A duração média de um publicou artigo deve ser de aproximadamente seis páginas impressas de comprimento, incluindo tabelas e figuras. A organização mostrada abaixo deve ser seguido (na ordem dada):

Folha de rosto

- título do trabalho
- Nome do (s) autor
- autor filiação (s)
- Endereço (s) da instituição (s) em que o trabalho foi realizado
- Números de nomes, endereços postais e de e-mail e telefone e fax do autor a quem a revisão ou a galera provas do papel correspondente está a ser enviada
- um título de corrida breve (não mais de 54 caracteres e espaços)

No que diz respeito aos títulos, evitar o título principal: arranjo subtítulo, declarativa títulos, construções de frases completas, e uso desnecessário de artigos.

Porque cada manuscrito deve apresentar resultados de independente e coesa estudo, títulos série numerada não são permitidos. O título consecutivo será considerado durante a compilação do índice de assunto e vai estar no topo de cada página impressa.

Coloque um asterisco após o nome do autor a quem perguntas sobre o papel deve ser dirigida.

O endereço de filiação para cada autor deve ser indicado por sobrescrito Algarismos arábicos (1, 2, 3, etc).

Abstrato

Os artigos devem incluir um resumo de 250 palavras ou menos. o Abstract não deve repetir as informações já presentes no título. Deveria ser adequado para inclusão direta no Current Contents, Chemical Abstracts, e Biological Abstracts, etc.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, fornecer um máximo de 6 palavras-chave. Por favor evitar termos gerais, vários conceitos (evitar, por exemplo "e" "de"), e abreviaturas. Somente abreviaturas firmemente estabelecida no campo pode elegíveis.

Introdução

A introdução apresenta o objectivo dos estudos apresentados e suas relação com o trabalho anterior no campo. Não deve ser uma extensa revisão da literatura. Use apenas as referências necessárias para fornecer o mais fundo saliente para permitir que os leitores a compreender e avaliar a finalidade e os resultados do presente estudo sem se referir a anterior publicações sobre o tema.

Materiais e métodos

A secção de Materiais e Métodos deve ser breve, mas incluem suficiente informações técnicas para permitir que os experimentos a ser repetida por um leitor qualificado. Apenas novos métodos devem ser descritos em detalhe. Citar procedimentos em Referências publicado anteriormente.

Resultados

A seção de Resultados deve incluir a razão ou o projeto do experiências, assim como os resultados das experiências. Os resultados podem ser apresentados nas figuras, tabelas e texto. Reserve ampla discussão do resultados para a seção Discussão.

Discussão

A sessão de discussão deve centrar-se sobre a interpretação dos resultados, em vez do que uma repetição da seção de Resultados. Os Resultados e Discussão podem ser combinadas em uma seção quando a redundância substancial não pode ser evitado em duas seções separadas ou se uma longa discussão não se justifica.

Agradecimentos

Coloque Agradecimentos, incluindo informações sobre a origem de qualquer financeira apoio recebido para o trabalho que está sendo publicado, antes das referências.

Referências

A seção Referências deve incluir todos os trabalhos publicados pertinentes, e todos referências listadas devem ser citadas no texto. Organizar a seção Referências em

ordem alfabética, pelo sobrenome do primeiro autor, e, em seguida, o número da lista consecutivamente.

Cite as referências no texto listados pelo número da lista entre colchetes (por exemplo, [1, 4, 10]), não por nome do autor / ano. O autor (es) deve verificar a exatidão de todos os números de referência, como a JMB não será responsável por incorretos citações de referência de texto em. Abreviar nomes de diário de acordo com as PubMed Entrez Journals banco de dados (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). o referenciamento estilos mostrado nos exemplos abaixo devem ser utilizados para os livros (1), específicas capítulos de livros (2), artigos de revistas (3), e sites (4), respectivamente:

1. Brock TD, Madigan MT. 1988. *Biology of Microorganisms*, pp. 42- 59. 5 Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
2. Gershon AA, Russa P La, Steinberg SP. 1999. vírus varicela-zoster, pp. 900-911. Em Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds.), *Manual de Microbiologia Clínica*, 7ª Ed. Sociedade Americana de Microbiologia, Washington, DC
3. Lee YH, Parque JS. 2004. Avaliação das condições operacionais e consumo de energia de bioatritor para sacarificação enzimática do amido cru. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 351-357.
4. Kirkman TW. 1996. Estatísticas usar. Disponível a partir <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>. Acessado em 20 de novembro de 2011. As referências a artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicado deve mostrar o nome da revista e, se conhecido, o ano provável do publicação e estado "no prelo".

As legendas das figuras

As legendas das figuras devem conter uma breve descrição das experiências, de modo que a figura pode ser entendido sem referência ao corpo do texto. No entanto, a legenda não deve repetir Materiais e Métodos ou conter declarações interpretativas.

Tabelas

As tabelas devem ser dactilografadas separadamente do texto principal e em um tamanho da fonte adequada para caber preferência cada tabela em uma página separada. Cada mesa devem ser numeradas com algarismos arábicos (por exemplo, a Tabela 1, Tabela 2) e incluir um título. Coloque notas de rodapé a tabelas abaixo do corpo da tabela e indica-los com letras em expoente minúsculas (a, b, c, etc), não

símbolos. Não usar decisões verticais nas tabelas. Cada coluna numa tabela deve ter um dirigindo, e abreviaturas, quando necessário, deve ser definido no notas de rodapé.

Figuras

As figuras devem ser fornecidos em separado do texto principal. Use Árabe numerais para numerar todos os valores (por exemplo, a Figura 1, Figura 2) de acordo com sua sequência no texto. O número figura deve aparecer bem fora do limites da própria imagem. Figuras de várias vias devem ser numeradas de maiúsculas e em negrito letras de fonte (A, B, C, etc), sem parêntese, tanto em o si e nas legendas das figuras

Nomenclaturas, UNIDADE, abreviações e SÍMBOLOS

Nomenclaturas e abreviaturas de agentes químicos e bioquímicos, microrganismos, enzimas, proteínas, e genes deve seguir o Instrução aos autores para revistas publicadas pela American Society for Microbiology (disponível online em <http://journals.asm.org/>). Para a nomenclatura de enzimas de restrição, de ADN, methytransferases homing As endonucleases, e seus genes, referem-se ao artigo por Roberts et al. (Nucleic Acid Res. 31: 1805-1812, 2003) A JMB segue a mesma nomenclatura para vírus como o Journal of Virology, e informações mais detalhadas podem ser encontradas na instrução para autor desta publicação (disponível online em <http://jvi.asm.org/>). Todas as abreviaturas devem ser definidas em seu primeiro uso em apenas o texto; não repetir a definição das abreviaturas depois. Note que a JMB utiliza os seguintes estilos de design específicos:

- American ortografia (por exemplo, rotulagem, enxofre, inespecífica, antiviral)
- unidades SI (Sistema Internacional d'Unites)
- g / ml (ou seja, barra invertida para "per", ao invés de g ml⁻¹)
- Km, Vmax, (ie, subscripta, não itálico)
- A força centrífuga deve ser preferencialmente expressa como × g, em vez de rpm
- Nomes para bioprodutos regionais devem ser escritos em letras minúsculas não-*itálico* cartas. Os nomes devem ser explicados em um parêntese quando usado pela primeira vez tempo no abstract / texto. (por exemplo, kimchi (fermentado tradicional coreana couves))
- Temperatura (° C),% (ligado a anterior números sem um espaço, por exemplo, 37 ° C, 10%)

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

AIMS AND SCOPE

The Journal of Microbiology and Biotechnology (JMB) is a monthly international journal devoted to the advancement and dissemination of scientific knowledge concerning microbiology, biotechnology, biomedicine and related academic disciplines. It covers scientific and technological aspects of microbiology, including Bioactive Compounds / Food Microbiology; Biocatalysis and Bioprocess Engineering; Environmental Microbiology / Microbial Diversity; Molecular and Cellular Microbiology / Biomedical Sciences (the subcategories are available in detail online at <http://www.jmb.or.kr/about/about.html>). JMB is published and distributed as a regular issue on the 28th of each month, and occasionally as a special issue, by the Korean Society for Microbiology and Biotechnology (KMB).

EDITORIAL POLICY

Originality, authorship, and copyright

The manuscripts submitted for publication must be previously unpublished research works written in English, which are not being considered for publication elsewhere. All the authors must have agreed to the submission and to the order of their names on the title page. They must also have agreed that the corresponding author may act on their behalf throughout the editorial review and publication process. The corresponding author is responsible for obtaining such agreement. Requests for changes in authorship (order of listing or addition or deletion of name) after submission should be accompanied by signed statements of agreement from all the parties involved. However, please note that changes in authorship are not allowed after a paper has been accepted. To maintain and protect the Society's ownership and rights, and to protect the original authors from misappropriations of their published work, author(s) are required to sign a *Copyright Transfer Agreement*, which will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript when a manuscript is accepted for publication. Unless this agreement is executed, KMB will not publish the manuscript.

Permissions

The author is responsible for acquiring the permission(s) to reproduce any copyrighted figures, tables, data, or text that are being used in the submitted paper. Authors should note that text quotation of more than 250 words from a published or copyrighted work will require grant of permission from the original publisher to reprint. The written permission letter(s) must be submitted together with the manuscript.

Strain identification, culture deposition and fermentation optimization
Manuscripts addressing only the partial identification of microorganisms based on preliminary experiments, such as 16S rRNA gene sequencing and simple growth characterization, are unlikely to be considered by JMB for publication, unless the authors provide in depth molecular, genetic, and/or physiological analysis to accompany the identification. Similarly, the simple optimization of fermentation conditions through statistical methods are unlikely to be considered for publication. Authors are required to provide strains described in their paper upon request. JMB recommends authors deposit any newly identified, or otherwise noteworthy strains, in publicly accessible microbial stock centers or culture collections, and to provide strain numbers and/or deposit numbers in the text of the manuscript.

IRB approval

All manuscripts that describe research involving human subjects must be approved by their Institutional Review Board (IRB) with appropriate documentation being received prior to manuscript submission. The latter formal approval must be indicated in detail in the Materials and Methods section and such documents as may be required are to be provided to JMB upon request.

Sequence data

Manuscripts reporting new nucleotide and amino acid sequences should be accompanied by substantial additional experimentation to characterize the gene(s) and product(s) concerned, and/or substantial comparable analysis. A sequence alone is unlikely to be acceptable. Papers reporting new sequence data will not be published unless the sequence has an accession number from a public nucleotide database, for example GenBank, EMBL or DDBJ. Accession numbers should be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. The accession numbers should be included in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for

Articles, or at the end of the text for Notes (for example "The GenBank/EMBL/DDBJ accession number of the sequence reported in this paper is AA00000"). Authors should follow the "Sequence data format" detailed below for the preparation of nucleotide and amino acid sequence diagrams.

Omics data

For manuscripts reporting genomics or transcriptomics data (e.g. microarray, next-generation sequencing, or other high-throughput genomics data), the authors should deposit the omics data in the appropriate public database (e.g. Gene Expression Omnibus (GEO) and BioProject in NCBI, ArrayExpress, or CIBEX) and provide an approved accession number in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods for Articles, or at the end of the text for Notes.

Page charges

Submission for all authors is free of charge and only accepted papers are subject to page charges. The page charge is US\$60 (₩60,000) and US\$100 (₩100,000) for each printed page, for active KMB members and non members in Korea, respectively. As a special rate, the page charge for overseas authors is US\$50 for each printed page, effective for manuscripts submitted after January 1, 2014. An invoice for page charges will be sent with the galley proofs to the corresponding author. Invited reviews are not subject to page charges.

Editorial review and revision

All papers will be critically read by at least two anonymous reviewers, selected for their competence in the subject area of the paper. Acceptance of the paper will depend upon its scientific merit and suitability for the journal. A paper may be accepted in its original form or subject to revision.

The reviewers' (and editor's) suggestions will be conveyed to the author, who will then have an opportunity to revise the paper. If a manuscript returned to an author for revision is held for longer than two months, or if revision is sufficiently extensive, then the date of receipt of the revised manuscript will be substituted for the initial date of receipt.

Prior to a final decision being made, all manuscripts will be screened through CrossCheck to verify the integrity of the study, and to identify incidences of plagiarism or dual publication. If any issues are discovered in a manuscript during this screening process, it may subsequently be rejected by the editor regardless of the reviewers' comments, and will likely be forwarded to the editorial committee for a more in depth review of its integrity which may result in the application of further penalties.

If necessary, the accepted paper will be edited by native English speakers. The cost of language editing service is currently US\$70-100 (₩70,000-100,000) per manuscript (subject to change without notice) and will be notified when a bill for page charges is sent to the corresponding author. If you require additional information, please send an e-mail inquiry to the production Editor (jmb@jmb.or.kr).

Proofs

Galley proofs (PDF format) for an accepted article will be sent by e-mail to the corresponding author for copyediting corrections. The core content of an article cannot be changed during galley proof reading. It is the author's responsibility to check the entire manuscript, including tables, figure legends, and cited reference numbers, not just items queried. The proofs should be corrected and mailed to the Editorial Office within 48 h of receipt in order to expedite publication. Only one set of corrections will be accepted. This means it is important to ensure all of your corrections are sent to us in one communication.

Reprints

Authors, including overseas authors, who wish to purchase reprints, are required to complete the Reprint Order Form, which will be sent with the galley proofs to corresponding authors. This form must be returned together with the corrected galley proofs. Reprints are supplied only in multiples of 30 for a fee of US\$50 (₩50,000) per 30 copies, inclusive of shipping charge.

HOW TO SUBMIT MANUSCRIPTS

Membership in the KMB is not a prerequisite for submission and consideration of manuscripts. Authors are requested to submit their manuscripts electronically by using the **JMB online manuscript submission system** available at <http://jmb.or.kr>. This site will guide authors stepwise through the submission process. The editorial office will acknowledge receipt of your manuscript within 24

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

hours of submission. Please contact the editorial office (jmb@jmb.or.kr) if you do not receive confirmation within this period of time. The "date of receipt" that appears in the published paper will be the date when the handling managing editor received the manuscript.

Revisions

Papers may be returned to authors for revision. Authors will be given eight weeks after receipt of the reviewers' comments to revise their paper. Revisions must be submitted via the online submission system, under the heading "Submit Manuscript Online." Click on the link "Submit a revised manuscript" then upload your revised files. Please do not submit the revision via email.

Resubmissions

Papers may be rejected but the authors are encouraged to resubmit the paper after additional experimental data are obtained. Resubmissions must be submitted via the online submission system under "Begin a new submission." The paper must be marked as a resubmission and list the handling editor and manuscript number of the original submission, in the cover letter. Please also provide a letter giving point-by-point responses to the referees of the previous version.

FILE FORMATS

Prepare the text in Microsoft (MS) Word (6.0 or later version) or WordPerfect. Set the page size to have 2.5 cm margins on all sides. The font size should be no smaller than 12 points. Type every portion of the manuscript double spaced, including References and figure legends, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends and tables. The last two items should be placed after the Reference section. Manuscript pages should have line numbers. The text of your manuscript (including title page, abstract, main text, references, and figure legends) followed by tables and figures should be in a single word file for initial submission. Each figure should be labeled with a figure number. Standard fonts (Times New Roman, Times, or Courier), preferably Times New Roman should be used for the generation of text and Arial or Helvetica for the figures. Use the Symbol font and the "Insert Symbol" option from the menu bar for introducing symbols in MS Word. Authors can upload their articles as MS Word (6.0 or a later version) or WordPerfect. It is also possible to submit an article in a ready made Adobe Acrobat PDF format, but if the article is accepted, the original source files will be needed. Authors must then check the PDF conversion carefully to make sure that everything converted properly. This format is acceptable for reviewing purposes only. If your paper is accepted, you are then required to send the final version as source files including a separate Word file for text and graphic TIFF or EPS files. Manuscripts that do not follow the "File Formats" and "Organization and Styles of Manuscripts" (below) are not suitable for editorial review or publication, and will be returned to the author.

ORGANIZATION AND STYLES OF MANUSCRIPTS

I. Articles

Articles are full-length research reports that contain detailed descriptions of experimental work, with clear interpretation and discussion of the theoretical and experimental results and data. *Articles* should be structured under the section headings Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment, Nomenclature/Appendix (if applicable), and References. Authors should present their material with utmost clarity and conciseness and in a logical manner. Constant repetition of experimental procedures, information, and facts among sections should be avoided. The average length of a published *Article* should be approximately six printed page long including tables and figures.

The organization shown below should be followed (in the order given):

Title page

- title of the paper
- author name(s)
- author affiliation(s)
- address(es) of the institution(s) at which the work was performed
- name, postal and E-mail addresses, and phone and fax numbers of the corresponding author to whom the revision or galley proofs of the paper is to be sent
- a brief running title (not to exceed 54 characters and spaces)

With regard to titles, avoid the main title: subtitle arrangement, declarative titles, complete sentence constructions, and unnecessary use of articles. Because each manuscript should present results of independent and cohesive study, numbered series titles are not allowed. The running title will be considered during compilation of the subject index and will be at the top of each printed page.

Place an asterisk after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed.

The affiliation address for each author should be indicated by superscript Arabic numbers (1, 2, 3, etc).

Abstract

Articles must include an Abstract of 250 words or fewer. The Abstract should not repeat information already present in the title. It should be suitable for direct inclusion in Current Contents, Chemical Abstracts, and Biological Abstracts, etc.

Key words

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 key words. Please avoid general terms, multiple concepts (avoid, for example, "and" "of"), and abbreviations. Only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

Introduction

The Introduction presents the purpose of the studies reported and their relationship to earlier work in the field. It should not be an extensive review of the literature. Use only those references required to provide the most salient background to allow the readers to understand and evaluate the purpose and results of the present study without referring to previous publications on the topic.

Materials and Methods

The Materials and Methods section should be brief but include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated by a qualified reader. Only new methods should be described in detail. Cite previously published procedures in References.

Results

The Results section should include the rationale or design of the experiments as well as the results of the experiments. Results can be presented in figures, tables, and text. Reserve extensive discussion of the results for the Discussion section.

Discussion

The Discussion section should focus on the interpretation of the results rather than a repetition of the Results section. The Results and Discussion sections may be combined into one section when substantial redundancy cannot be avoided in two separate sections or if a long discussion is not warranted.

Acknowledgments

Place Acknowledgments, including information on the source of any financial support received for the work being published, before the References.

References

The References section must include all relevant published works, and all listed references must be cited in the text. Arrange the References section in alphabetical order, by the first-author surname, and then number the list consecutively.

Cite listed references in the text by their list number in square brackets (e.g., [1, 4, 10]), *not* by author name/year. The author(s) must check the accuracy of all reference numbers, as the JMB will not be responsible for incorrect in-text reference citations.

Abbreviate journal names according to the *PubMed Entrez Journals* database (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). The referencing styles shown in the examples below should be used for books (1), specific chapters in books (2), journal articles (3), and websites (4), respectively:

1. Brock TD, Madigan MT. 1988. *Biology of Microorganisms*, pp. 42-59. 5th Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
2. Gershon AA, Russa P La, Steinberg SP. 1999. Varicella-zoster virus, pp. 900-911. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
3. Lee YH, Park JS. 2004. Evaluation of operational conditions and power consumption of bioattractor for enzymatic saccharification of uncooked starch. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 351-357.
4. Kirkman TW. 1996. Statistics to Use. Available from <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>. Accessed Nov. 20, 2011.

References to papers accepted for publication but not yet published should show the journal name and, if known, the probable year of publication, and state "in press."

The following types of references are not valid for listing in the References section:

- unpublished data
- personal communication
- manuscripts in preparation or submitted
- pamphlets
- abstracts
- patents
- newsletters
- material that has not been subjected to peer review.

References to such sources should be made parenthetically in the text (e.g., Lee YH et al. 1989. Abstr. Annu. Meet. Kor. Soc. Appl. Microbiol. Seoul, Korea, p. 159).

Figure legends

Figure legends should contain a brief description of the experiments so that the figure can be understood without reference to the body of the text. However, the legend should not repeat Materials and Methods or contain interpretive statements.

Tables

Tables should be typewritten separately from the main text and in an appropriate font size to preferably fit each table on a separate page. Each table must be numbered with Arabic numerals (e.g., Table 1, Table 2) and include a title. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters (a, b, c, etc), *not* symbols. Do not use vertical rulings in the tables. Each column in a table must have a heading, and abbreviations, when necessary, should be defined in the footnotes.

Figures

Figures should be provided separately from the main text. Use Arabic numerals to number all figures (e.g., Figure 1, Figure 2) according to their sequence in the text. The figure number must appear well outside the boundaries of the image itself. Multipart figures should be numbered in uppercase and bold font letters (A, B, C, etc) without parenthesis, both on the figure itself and in the figure legends.

Note that figures may have to be reduced in size to fit the one-column (84 mm) or two-column (176 mm) space of the printed page, as determined by the journal designer. Original figures, especially line drawings, must therefore contain fonts and other detail that are large and clear enough to be legible even after a 50% reduction in size. Line drawings must be a minimum of 0.5 mm thickness for clear reproduction. The preferred symbols for graphs are ○, ●, □, ■, △, ▲, ▽, ▼. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures. Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with "three-dimensional" bars unless there is a specific justification for their use. Tints should not be used as shading for bars.

All figures should be created with applications that are capable of preparing high resolution TIFF or EPS files acceptable for publication. All figures should be embedded at the end of text in a single Word or PDF file when you initially submit manuscript. If your paper is accepted, we will require submission of figures as separate TIFF or EPS files at publication quality resolution. Blurred images will not be accepted. Diagrams and photographs submitted in electronic format must be of the following minimum resolutions:

- 300 dpi for photographs or halftones only, in both black and white and color
- 600 dpi for photographs or halftones with line artwork as insets
- 600 dpi for line artwork or lettering
- 1,200 dpi for fine-line artwork and artwork with gray shades

The author(s) will be required to pay for reproduction of color photographs. The cost is US\$160 (¥160,000) for each illustration containing color. Any figures submitted in color will be reviewed and processed with the understanding that the figure will be published in color. The mode of the TIFF or EPS file must be CMYK, *not* RGB.

II. Notes

Notes are short reports for the presentation of brief observation that have insufficient material to fulfill the structure of a full-length article. They are intended for reporting preliminary studies or brief studies of a descriptive nature. *Notes* should be arranged in the same way as *Articles*, except that the Introduction, Results, and Discussion sections are in a combined section with no section headings. The abstract should not exceed 100 words. The main text should follow the logical flow of a structured article and should not exceed 1,200 words; the total number of figures and tables should not exceed four. *Notes* should be approximately 3–4 printed page long. The References section is identical to that of *Articles*. *Notes* are subjected to review.

III. Reviews and Minireviews

Authoritative and critical Reviews and Minireviews of the current state of knowledge regarding any aspect of microbiology and biotechnology are preferred. They must be based on original articles, and may address subjects within the scope of the JMB. Reviews should be divided into sections with appropriate headings. The format of the References section is identical to that of *Articles*. While there is no limitation on the length of a Review, it is recommended that a standard Review comprises no more than the equivalent of 12 printed journal pages, including display items and references. References should number no more than 80. The JMB is also happy to publish more compact Minireviews that highlight topics of emerging interest and summarize

developments in rapidly advancing areas. A Minireview should occupy no more than 3 printed journal pages, including display items and references. Minireview references should number no more than 30. If, for a particular reason, an author wishes to exceed or diverge from these guidelines significantly, they should contact the Production Editor (jmb@jmb.or.kr) before submitting a manuscript. Unsolicited reviews will be considered but are subject to the approval of the Editor-in-Chief and will be accepted only under special circumstances. Reviews will be subjected to an independent peer review, and the Editor-in-Chief may request changes or decide not to proceed with publication.

NOMENCLATURES, UNITS, ABBREVIATIONS, AND SYMBOLS

Nomenclatures and abbreviations for chemical and biochemical agents, microorganisms, enzymes, proteins, and genes should follow the *Instruction to Authors* for journals published by the American Society for Microbiology (available online at <http://journals.asm.org/>).

For nomenclature of restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes, refer to the article by Roberts et al. (*Nucleic Acid Res.* **31**: 1805–1812, 2003)

The JMB follows the same nomenclature for viruses as the *Journal of Virology*, and more detailed information can be found in the instruction to author of that journal (available online at <http://jvi.asm.org/>).

All abbreviations should be defined at their first use in the text only; do not repeat the definition of abbreviations thereafter.

Note that the JMB uses the following specific design styles:

- American spelling (e.g., labeling, sulfur, nonspecific, antiviral)
- SI units (System International d'Unites)
- g/ml (i.e., backslash for "per," rather than g ml⁻¹)
- K_m , V_{max} , I_0 (i.e., subscripted, non-italicized)
- Centrifugal force should be preferably expressed as $\times g$, rather than rpm
- L-amino acid, D-amino acid (i.e., LD in small caps)
- Names for regional bioproducts should be written in non-italicized lowercase letters. The names should be explained in a parenthesis when used first time in the abstract/text. (e.g., kimchi (Korean traditional fermented cabbages))
- Temperature (°C), % (linked to preceding numbers without a space, e.g., 37°C, 10%)

SEQUENCE DATA FORMATS

Diagrams of nucleotide and amino acid sequences should be prepared in the most effective layout. The layout should be designed to fit the journal page economically, i.e. to fill either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). The height of the characters should be about 1.5–2 mm (or 6–8 point). For sequence data at full-page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). A single-column layout would ideally fit 50–60 nucleotides per line. If possible, lines of nucleic acid sequence should be subdivided into blocks of 10 or 20 nucleotides by spaces within the sequences or by marks above it. There should not be too much space between the lines of sequence. Use of the single-letter amino acid code is preferred.

MICROARRAY DATA

Data from microarray gene expression studies must comply with the MIAME guidelines (see <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>).

MANUSCRIPT CHECKLIST

It is hoped that this list will be useful during the final checking of your manuscript prior to submitting it to the journal for review. Ensure that the following items are present:

- One author designated as corresponding author
- Telephone and fax numbers, and E-mail address of the corresponding author
- Running title
- Key words
- Page and line numbers
- All tables (including title, description, footnotes) and figures (separated from figure legends) are provided in a single file with main text for initial submission.
- References are in the correct format for this journal.
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa.