



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE POR *Aspergillus
flavus* UTILIZANDO BORRA DE CAFÉ (*Coffea sp.*) ATRAVÉS DA
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

STELIANE LIMA SANTOS

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Co-Orientador: Prof. Dr. Cynthia de Oliveira Nascimento

Recife/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL - PRPPG

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE POR *Aspergillus flavus* UTILIZANDO BORRA DE CAFÉ (*Coffea sp.*) ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociência animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biociência.

Discente: Steliane Lima Santos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cynthia de Oliveira Nascimento

Recife/2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

S237p Santos, Steliane Lima

Produção e purificação de frutossiltransferase por *Aspergillus Flavus* utilizando borra de café (*Coffea sp.*) através da fermentação em estado sólido / Steliane Lima Santos. – 2018.

69 f. : il.

Orientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.

Coorientadora: Cynthia de Oliveira Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência animal, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Frutossiltransferase 2. Fermentação em estado sólido 3. Café. I. Soares, Maria Taciana Cavalcanti Vieira, orient. II. Nascimento, Cynthia de Oliveira, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da dissertação de mestrado

STELIANE LIMA SANTOS

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE POR *Aspergillus*
***Flavus* UTILIZANDO BORRA DE CAFÉ (*Coffea sp.*) ATRAVÉS DA**
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Área de concentração: Biotecnologia

Recife, 26 de fevereiro de 2018

Comissão examinadora composta pelos seguintes professores

Prof.^a Dr.^a Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE
(Presidente)

Prof.^a Dr. Emmanuel Viana Pontual
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE
(1º Membro)

Prof.^a Dr. Polyana Nunes Herculano
Membro Externo
Faculdade São Miguel
(2º Membro)

Dr. Ana Karoline Caitano do Nascimento
Membro Externo
(3º Membro)

Dedico

A todos que fizeram esse sonho ser possível.

**“Em um lugar escuro estamos nós.
E mais conhecimento ilumina
nosso caminho”. (Star Wars:
Episódio V - O Império Contra-Ataca)**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meu caminho e por me ajudar a nunca desistir dos obstáculos e sempre os enfrentar com coragem e dedicação.

A minha orientadora a professora Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti e minha co-orientadora a professora Dr^a. Cynthia de Oliveira Nascimento, por ter me trazido para este maravilhoso laboratório, pelos ensinamentos e conselhos durante todos os momentos, me direcionando da melhor maneira possível para o alcance dos nossos objetivos, em especial na elaboração desta dissertação.

Agradeço a professora Ana Porto por me dar a oportunidade de fazer uma iniciação científica no LABTECBIO, ao professor Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa por estar sempre ao meu lado durante o decorrer desse trabalho, muito obrigado por todo o ensinamento e paciência.

A todos do LABTECBIO, um lugar em que conheci e fiz muitos amigos, Juanize, Meire, Eliz, Carol, Livia, Sabrina. Também obtive conhecimento para a vida toda, onde fazemos e vivemos ciência.

Aos amigos da vida e da graduação, Luiz Andre que esteve comigo em toda a graduação, me ajudando, aconselhando, divertindo e sempre me guiando. Rafaella Leandra, amizade antiga e linda que temos. Obrigada por ouvir meus problemas e por me ajudar emocionalmente.

Agradeço imensamente a João Victor por enfrentar todos os obstáculos ao meu lado, por não me deixar desistir, me incentivar a continuar e realizar mais uma conquista, e a sua família por me apoiar e me ajudar em todos os momentos de desespero e em momentos cruciais.

A minha família que é meu porto seguro, pessoas que me amam e que sempre poderei contar para toda e qualquer eventualidade. Agradeço imensamente a minha mãe Rosicleide por sempre acreditar em minha capacidade e determinação para conseguir tudo que almejo, agradeço ao meu pai Severino por seu apoio, a minha irmã Stefanne que sempre torceu por minhas conquistas e ficou feliz a cada uma.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter me acolhido tão bem, e a todos os professores, estudantes e funcionários da pós-graduação em Biociência animal que conviveram comigo. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado.

RESUMO

Frutossiltransferase (FTase) é uma enzima que catalisa a quebra de ligações glicosídicas da molécula de sacarose transferência do grupo frutossil para uma outra molécula, podendo ser sacarose ou frutooligossacarídeos (FOS), ocorrendo a liberação de 6 glicose. O FOS é um prebiótico convencional que apresenta um baixo valor calorimétrico e promove a estimulação seletiva do crescimento microbiano intestinal, especialmente de bifidobactérias e lactobacilos, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares, câncer de cólon e obesidade. No entanto para obtenção a utilização de processos enzimáticos é mais caro devido ao alto custo de produção e baixa estabilidade das enzimas. Contudo esses fatores podem ser contornados com a utilização de microrganismos e resíduos agroindustriais como um meio de cultivo para uma fermentação sólida, tornando o procedimento mais econômico e viável. O objetivo desse trabalho foi à produção da enzima frutossiltransferase em fermentação sólida utilizando borra de café a partir de *Aspergillus flavus*, onde foi possível ainda verificar que 72h de crescimento apresentou maior produção da enzima com atividade específica de 31,5 U/mg nas seguintes condições, 60% de umidade, concentração de esporos 10^6 esporos/mL a 30°C durante 120 horas. O extrato bruto contendo a enzima foi submetido a uma seleção de precipitação entre a cetona, sulfato de amônia e etanol, onde a maior atividade enzimática se deu utilizando a precipitação com acetona 161,85 U/mL e fator de purificação relativamente alto de 10,70. Posteriormente a amostra foi purificada através de sistema de cromatografia de troca iônica DEAE SEPHADEX A50 e SUPERDEX AKTA nas colunas DEAE-sephadex sistema haithap e superdex 75 sendo realizadas em sequência. A enzima purificada apresentou peso molecular de 57 kDa em Superdex G-75. Quanto a caracterização, apresentou temperatura ótima de 60°C respectivamente, obtendo termo estabilidade a 50°C. Os resultados da purificação mostraram uma fração com atividade enzimática para frutossiltransferase pura na qual obtive um fator de purificação de 86,16. Quando observado sua síntese enzimática foi constatado que a enzima consegue produzir frutooligossacarídeos, sendo eles kestose e nistose. Os resultados obtidos no presente estudo mostram o potencial promissor da frutossiltransferase produzida por *Aspergillus flavus* e na sua utilização para produção de frutooligossacarídeos.

Palavras – chaves: Frutossiltransferase, Fermentação em estado sólido, Café.

ABSTRACT

Fructosyltransferase (FTase) is an enzyme that catalyzes the breakdown of the glycosidic bonds of the sucrose molecule by transferring the fructosyl group to another molecule, which can be sucrose or fructooligosaccharides (FOS), resulting in the release of glucose. FOS is a conventional prebiotic that has a low calorimetric value and promotes the selective stimulation of the intestinal microbial growth, especially of bifidobacteria and lactobacilli, reducing the risks of cardiovascular disease, colon cancer and obesity. However to obtain the use of enzymatic processes is more expensive due to the high cost of production. However, these factors can be overcome with the use of microorganisms and agroindustrial residues as a culture medium for a solid fermentation, making the procedure more economical and feasible. The objective of this work was the production of the enzyme fructosyltransferase in solid fermentation using coffee grounds from *Aspergillus flavus*, where it was possible to verify that 72h of growth presented higher production of the enzyme with specific activity of 31.5 U / mg in the following conditions, 60% moisture, spore concentration 10⁶ spores / mL at 30 ° C for 120 hours. The crude extract containing the enzyme was subjected to a precipitation selection between ketone, ammonium sulfate and ethanol, where the highest enzymatic activity was given using the precipitation with acetone 161.85 U / mL and relatively high purification factor of 10.70. Subsequently the sample was purified by DEAE SEPHADEX A50 and SUPERDEX AKTA ion exchange chromatography systems on the DEAE-sephadex system and superdex 75 columns being carried out in sequence. The purified enzyme had 57 kDa molecular weight in Superdex G-75. Regarding the characterization, it presented optimum temperature of 60°C respectively, obtaining thermo stability at 50°C. The purification results showed a fraction with enzymatic activity for pure fructosyltransferase in which it obtained a purification factor of 86.16. When observed its enzymatic synthesis it was verified that the enzyme can produce fructooligosaccharides, being kestose and nystose. The results obtained in the present study show the promising potential of the fructosyltransferase produced by *Aspergillus flavus* and its use for the production of fructooligosaccharides.

Key - words: fructosyltransferase, Solid state fermentation, Coffee residue.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1 curva de produção da Frutossiltransferase por *Aspergillus flavus* cultivado de forma estática em fermentação em estado sólido utilizando a borra de café como substrato por 120h, a 30C. 41

Figura 2 Cromatografia da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus flavus* em resina DEAE sephadex A50 frações não adsorvido e adsorvido. 43

Figura 3. Perfil cromatográfico da enzima frutossiltransferase obtida a partir da fermentação em estado solido do *Aspergillus flavus* precipitado com acetona e carregado em cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex do sistema AKTA haithap. 43

Figura 4. Cromatograma do sistema automatizado de cromatografia liquida rápida de proteínas AKTA para purificação de frutossiltransferase por *Aspergillus flavus* em fermentação em estado sólido (FES) utilizando borra de café como substrato. 44

Figura 5. Efeito da temperatura ótimo (A), da temperatura ótima e termoestabilidade (B) na atividade da frutossiltransferase purificada de *Aspergillus flavus*. Todos os resultados foram realizados em triplicata. 45

Figura 6 Analise da presença do FOS de fração pre-purificada da enzima frutossiltransferase produzida por *Aspergillus flavus* em fermentação em estado sólido. (A) Kestose e (B) Nistose. 46

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 Diferentes tipos de resinas cromatográficas utilizadas para purificação de biomoléculas. 22

Tabela 2 Métodos empregados para purificação de frutossiltransferase produzida por *Aspergillus flavus*. 24

CAPITULO I

Tabela 1. Resumo da purificação de frutossiltransferase obtida a partir de *Aspergillus flavus* cultivado de forma estática em fermentação em estado sólido utilizando a borra de café como substrato por 120h, a 30C. 42

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA	17
2.1 BORRA DE CAFÉ	17
2.3. <i>ASPERGILLUS</i>	18
2.2 FERMENTAÇÃO SÓLIDA.....	19
2.4 FRUTOSILTRASFERASE.....	20
2.5 METODOS DE PURIFICAÇÃO	20
2.6 FOS	25
3 – OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL.....	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4. REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO I.....	32
RESUMO.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAIS E METODOS	34
2.1 MICRORGANISMO E MEIO DE ESTOQUE E ESPORULAÇÃO.....	34
2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	34
2.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	34
2.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	35
2.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	35
2.6. PRECIPITAÇÃO DA FTASE.....	35
2.7. PURIFICAÇÃO DA FTASE.....	36
2.7.1. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50.....	36
2.7.2. Cromatografias no sistema ÄKTA em Deae-Sephadex e Superdex-75 ..	36
2.8. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO E PURIFICADO	36
2.8.1. Determinação da temperatura ótima.....	36
2.8.2. Determinação da estabilidade à temperatura.....	37
2.9. CARACTERIZAÇÃO DO FRUTOOLIGOSSACARIDEOS (FOS) PURIFICADO.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÃO	47
AGRADECIMENTOS.....	47

5. REFERÊNCIAS	47
ANEXO	52

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas com capacidade de acelerar reações das mais diversas, estão presentes nos seres vivos sejam eles animais, vegetais ou microrganismos. A frutossiltransferase (FTase) é uma enzima com capacidade de catalisar e converter dissacarídeos em frutoligossacarídeos (FOS), por meio da reação de transfrutossililação sendo produzida de forma intracelular ou extracelular por microrganismos como às bactérias, as leveduras e os fungos filamentosos. Entre estes últimos, se destaca o gênero *Aspergillus*, onde as espécies *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* apresentam o status de GRAS (*Generally recognized as safe* – geralmente reconhecido como seguro) pela FDA – USA (*Food and drug administration*) (THAMER; PENNA, 2006, KUHN; FILHO, 2010).

. Os FOS são oligossacarídeos formados por unidades de frutossil, encontrados naturalmente em pequenas quantidades em vários vegetais, porém em concentração muito baixa para exercer qualquer efeito benéfico. Eles são utilizados como componentes de alimentos funcionais e receberam o status de GRAS Atualmente FOS é o nome comum dado apenas a oligômeros de frutose que são compostos de 1-Kestose (GF2), nistose (GF3) são ligadas na posição β 2-1 da sacarose, o que diferenciam de outros oligômeros (PASSOS et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2005; GHAZI et al., 2007).

Com a finalidade de que uma biomolécula chegue ao mercado consumidor é necessário realizar métodos de separação, identificação, quantificação e purificação da molécula em questão. Dentre os métodos analíticos empregados para purificação de FTases estão: precipitação com solventes orgânicos, precipitação pelo ponto isoelétrico, cromatografias (FEKETE et al., 2015).

Devido as suas propriedades físico-químicas, a produção e aplicação comercial de FOS têm gerado um grande interesse comercial. A FTase pode ser amplamente utilizada nas indústrias alimentícias, pois os FOS constitui um importante grupo prebiótico. A ingestão destes oligossacarídeos estimula o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, conseqüentemente, diminuem os microrganismos patógenos presentes no intestino e facilitam a adsorção de cálcio e magnésio. Também têm sido evidenciados na contribuição para a prevenção do

câncer de colón, osteoporose, e na redução dos níveis de colesterol, fosfolipídios e triglicérides (ALMÉCIGA-DÍAZ et al., 2011).

O mercado consumidor de alimentos funcionais cresce ano após ano, sendo este crescimento justificado pela preocupação da sociedade atual em ter uma vida saudável. Dentre estes alimentos funcionais enfatizamos os FOS que nos últimos anos teve grande importância comercial devido às suas propriedades funcionais favoráveis à saúde humana (PANESAR et al., 2016).

Sobretudo, o objetivo deste trabalho é produzir e purificar frutotransferase produzida por *Aspergillus flavus* utilizando como substrato borra de café que diminui o custo de produção desses compostos já que é considerado um meio agroindustrial propício para a produção de enzimas e sua utilização ajuda a combater a poluição ambiental proveniente do descarte inadequado desses resíduos no meio ambiente (PHIMSEN, S. et al. 2016).

2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

2.1 BORRA DE CAFÉ

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, tendo grande importância socioeconômica, de acordo com a Organização Internacional do Café OIC (2017), a cafeicultura está presente em quinze estados da federação, possibilitando uma diversificada disposição espacial da produção, onde neste contexto o Brasil é um dos maiores produtores, sendo um dos responsáveis por mais da metade do suprimento mundial. O processamento do grão de café gera inúmeros resíduos obtidos durante a produção, onde o grão de café torrado e moído é extraído com água quente para preparar café instantâneo, o resultando deste processo é o resíduo denominado “borra de café”, composto principalmente por sólidos insolúveis, contendo ainda quantidades significativas de água e minerais (ESQUIVEL E JIMÉNEZ, 2012).

Considerando a fabricação e o consumo mundial do café, pode-se afirmar que toneladas de resíduos são geradas a partir da produção industrial e doméstica, onde a principal consequência da produção e consumo deste produto é a enorme quantidade de resíduos gerados. Nos últimos anos, a utilização da borra de café recebeu atenção especial por ser um resíduo agroindustrial com aplicações práticas em vários processos. Algumas tentativas de reutilização desse resíduo foram feitas, usando-o como biodiesel (LIU et al., 2017), como um antioxidante (SHANG et al., 2017), fertilizante de solo (CRUZ et al. 2015), adsorventes catiônicos em tratamentos de águas residuais (FRANCA et al. 2009), produção de bebidas alcoólicas (SAMPAIO et al. 2013), produção de combustível líquido a partir de óleo de café moído (PHIMSEN et al. 2016). No entanto, uma pequena parte dessas estratégias é realmente implementada como nos exemplos acima, e os resíduos permanecem inutilizados, apresentando um alto risco para a saúde humana e ambiental (KARMEE 2017).

Visto que existe uma pressão política e social para reduzir a poluição das atividades industriais é necessária a elaboração de planos de gestão adequados para solucionar o problema de deposição do produto. Os resíduos são facilmente adquiridos por serem desprezados no meio ambiente e a reutilização deste material é um assunto de extrema relevância. Neste sentido, a conversão dos resíduos para

compostos de valor agregado é de interesse ambiental e econômico, já que a reciclagem do mesmo reabastece os solos com nutrientes, sendo importante no ponto de vista ambiental e sustentável (PHIMSEN et al., 2016).

O Brasil é um país que se destaca mundialmente por possuir um potencial biotecnológico para utilizar seus resíduos agroindustriais. O desenvolvimento de bioprocessos industriais gera uma expectativa de conseguir produzir algumas substâncias utilizadas no mercado biotecnológico, tais como proteínas, pigmentos, enzimas, polissacarídeos, entre outros. Consequentemente os resíduos passam a serem considerados como matéria prima para processos elaborados apresentando aplicações interessantes (BALLESTEROS et al. 2017).

De acordo com Mussatto e colaboradores (2010), os resíduos de café contêm quantidades consideráveis de açúcares fermentáveis e outros nutrientes, estes constituem substratos interessantes para o crescimento de microrganismos e também para a produção de produtos de valor acrescentado como as enzimas. Em seu trabalho Mussatto et al., (2012) utilizou resíduo de café como substrato para produção da enzima frutossiltransferase por *Aspergillus japonicus*.

Assim, uma alternativa para a produção de enzimas, passou a ser a borra de café, na fermentação em estado sólido (FES), que garante nutrientes para o crescimento de fungos por conter elevado teor de carbono, e níveis adequados de nitrogênio orgânico. Além da possibilidade da redução de custos de produção em torno de 40 a 60% (KOURMENTZA et al., 2018).

2.3. ASPERGILLUS

O gênero foi descoberto por Pietro Antonio Micheli, um sacerdote e botânico que nomeou e o descreveu em 1729. Existem mais de 250 espécies oficialmente reconhecidas e o ritmo de descoberta continua crescente. A classificação dos *Aspergillus* é baseada em caracteres morfológicos através da produção de hifas especializadas. São fungos mitospóricos, pois apresentam esporos de origem assexuada e, portanto, seu nome faz referência ao seu tipo de ciclo sexual (figura 2) (SAMSON et al., 2014).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de colonizar diversos substratos, plantas, matéria orgânica em decomposição, compostos agrícolas, como

café, arroz, milho entre outros cereais e frutas. Em virtude disso, as espécies que compõem o gênero são consideradas uma fábrica de substâncias biotecnológicas amplamente utilizadas ao longo dos anos, onde é possível explorar sua tolerância a diferentes condições ambientais e capacidade de degradar diversas fontes de carbono (PAULUSSEN et al., 2016).

Os representantes desse gênero são úteis em processos industriais por sintetizarem compostos bioativos provenientes do metabolismo primário e/ou secundário que são utilizados em benefício do homem, do meio ambiente e demais seres vivos. Algumas espécies estão relacionadas com a produção de antifúngicos, antibióticos, ácidos orgânicos, biosurfactantes, antioxidantes, antiprotozoários e produção em grande escala de enzimas que podem ser utilizadas no meio industrial para a produção de bebidas e molhos obtendo destaque comercial (GIBBONS et al. 2013).

Entre os metabólitos secundários de origem fúngica, as enzimas têm despertado grande interesse, levando pesquisadores à realização de algumas investigações objetivando a descoberta de novas moléculas ou compostos para o desenvolvimento de produtos mais eficientes (ARZANLOU et al. 2016). As enzimas produzidas por espécies desse gênero têm grande utilidade nas áreas farmacêutica, agrícola, de alimentos, papel, detergentes, têxteis, tratamento de resíduos e na indústria de petróleo são catalisadores de alto peso molecular (ALANIO A. et al. 2017).

2.2 FERMENTAÇÃO SÓLIDA

A Fermentação em estado sólido (FES) é um método que utiliza material sólido umidificado para o crescimento de microrganismos, na ausência ou quase ausência de água livre no substrato. Essas condições são mais adequadas para o microrganismo se desenvolver, pois simulam as condições de crescimento natural favorecendo tanto o metabolismo quanto a capacidade produtiva (SINDHU, 2015). Sendo assim, esse método oferece diversas vantagens, entre elas estão: maior produtividade, rendimento do produto, diminuição no tempo de fermentação e utilização de substrato de baixo custo (BARRIOS-GONZALEZ 2012).

Existem vários dados que mostram as vantagens da FES sobre a fermentação submersa, dentre eles estão à natureza extracelular da enzima, maior

rendimento na produção e exploração de resíduos agroindustriais de baixo custo para o cultivo de enzimas microbianas, esses aspectos são relativamente econômicos frente a ausência de formação de espuma, redução do risco de contaminação e a liberação de alguns compostos metabólicos essenciais em meios fermentados (SONI ET AL., 2015;

A FES tem um enorme potencial para a produção de enzimas e algumas estratégias como a seleção de um meio ideal de cultura, otimização das condições, teor de umidade inicial, pH e temperatura de cultivo, presença de nutrientes e a quantidade de inóculo adicionada são fatores determinantes na produção da biomolécula de interesse (SINGH, 2013).

2.4 FRUTOSILTRANSFERASE

A ação enzimática da frutossiltransferase (FTase) ocorre através da hidrólise da sacarose na ligação β -1,2 e a transferência do grupo frutossil para uma outra molécula, podendo ser outra molécula de sacarose ou frutooligossacarídeos (FOS), ocorrendo a liberação de glicose (figura 3) (GANAIE et al. 2017).

Diversos organismos podem produzir FTase, tais como: plantas, mas nesse caso, dependem muito da sazonalidade. Leveduras, bactérias e fungos, sob condições específicas, em altas concentrações de sacarose, são capazes de produzir FTase com baixa atividade hidrolítica e alta atividade de transfrutolisação (XU et al. 2015).

Os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são grandes produtores da enzima FTase, e como a função dessa enzima é obtenção de FOS, um composto utilizado em alimentos, precisamos purificar a enzima para garantir a inocuidade do produto gerado por ela (DOMINGUEZ et al., 2013).

2.5 METODOS DE PURIFICAÇÃO

O processo de purificação é uma etapa complexa que envolve a separação do produto de interesse de resíduos gerados durante sua produção. Existem inúmeros métodos de purificação de biomoléculas, com diversas etapas, a escolha vai depender das características da molécula alvo (tabela 1). Entre os métodos analíticos empregados para purificação de moléculas estão: precipitação com solventes orgânicos, precipitação pelo ponto isoelétrico, cromatografias (FEKETE et al., 2015).

O desenvolvimento de diferentes resinas cromatográficas com características adequadas e específicas, tornou-se uma solução promissora para conseguir a purificação de uma substância biotecnológica de qualidade (WEI *et al.*, 2014).

Tabela 1. Diferentes tipos de resinas cromatográficas utilizadas para purificação de biomoléculas.

Cromatografia de permeação em gel ou gel-filtração	Separação de moléculas pela massa molecular, os géis são porosos, funcionando como peneiras ou filtros
Cromatografia de troca iônica	Separação de moléculas pela carga elétrica, os géis apresentam grupos carregados positiva- ou negativamente
Cromatografia de partição (fase reversa ou hidrofóbica)	Separação de moléculas pela solubilidade relativa em meio aquoso géis possuem caráter hidrofóbico
Cromatografia de afinidade	Separação de moléculas pela capacidade de interagir com um ligante, os géis possuem ligante específico ligado covalentemente à resina

No geral as cromatografias são seletivas, têm uma alta capacidade de ligação, permitem uma transferência de massa adequada, apresentam algumas interações não específicas, são reutilizáveis, porosas, uniformes e hidrofílicas tal método tem como princípio a separação dos compostos de uma mistura de acordo com diferenças nas suas propriedades específica (FERREIRA *et al.*, 2012)

Dentre os métodos cromatográficos citados, a cromatografia de troca iônica tem extrema relevância, pois se baseia na ligação competitiva da carga superficial da enzima ou de sais de mesma carga, a um trocador de íons. Esta é uma técnica amplamente utilizada e aplicada na purificação de proteínas, peptídeos e enzimas, de forma a caracterizar e purificar as biomoléculas oferecendo alta resolução e eficiência nos graus de pureza e recuperação (ROCHA *et al.*, 2014).

Com o passar dos anos, tecnologias inovadoras possibilitaram a utilização de enzimas em diversas áreas, para atender às necessidades do mercado, sendo preciso buscar novas fontes com potencial para produção de FTase e síntese enzimática de FOS (NADEEM *et al.*, 2015), no entanto, a sua produção e purificação têm um custo elevado, limitando a aplicação industrial. A utilização de resíduos em uma FES pode aumentar o potencial de produção, sendo este método proposto como uma alternativa significativa por apresentar menor custo de produção (HARRIS, 2012).

A literatura descreve várias estratégias para purificar a FTase obtidas de várias fontes, sendo constante a presença de algum tipo de cromatografia, como mostrado na (tabela 2). Desta forma, com a enzima purificada é possível produzir o FOS de forma adequada para ser utilizado como prebiótico (tabela 2) (MACIEL *et al.*, 2014).

Tabela 2. Métodos empregados para purificação de frutossiltransferase produzida por *Aspergillus flavus*.

Espécie fúngica	Métodos de purificação	Fator de purificação	Referências
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Cromatografia de troca iônica e gel de filtração.	38.1	(VIRGEN-ORTÍZ <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aspergillus flavus</i>	Precipitação sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica.	5.8	(UMA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica.	17	(WEI <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium oxalicum</i> GXU20	Precipitação com etanol e cromatografias	210.68	(XU <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aspergillus Níger</i>	Cromatografia de troca iônica	34,56	(OYEDEJI <i>et al.</i> , 2017)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Cromatografias de troca iônica	19.9	(RUSTIGUEL <i>et al.</i> , 2015)

2.6 FOS

Frutooligossacarídeos (FOS) é um grupo de compostos funcionais, que devido às suas propriedades benéficas para a saúde, vem recebendo atenção especial como ingrediente importante na indústria de alimentos. Apresentam um baixo valor calorimétrico e promovem o estímulo seletivo do crescimento microbiano intestinal, especialmente bifidobactérias e lactobacilos, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares, câncer de cólon e obesidade (ALMÉCIGA-DÍAZ et al., 2011).

Os FOS são prebióticos convencionais produzidos por certas plantas e microrganismos sendo polímeros de cadeia curta, classificados de acordo com suas configurações de ligação únicas entre os resíduos de monossacarídeos formados através da ligação de uma a três unidades de frutose à sacarose que consistem principalmente em 1-kestose, nistose e 1F-fructofuranosilnystose (XU et al., 2015).

As enzimas mais utilizadas para a produção de FOS em escala industrial, são as frutossiltransferases (FTases, EC 2.4.1.9) que realizam a síntese de transfrutossilacção formando o FOS um prebiótico e as fructofuranosidase (FFases, EC 3.2.1.26) que realiza a hidrólise da molécula de sacarose liberando uma mistura aqui molar denominada açúcar invertido com alto poder adoçante e poucas calorias, porém as FTases possuem maior ação na transferência do grupo frutossil do que as FFases (PATEL; GOYAL, 2012).

Os frutooligossacarídeos são compostos de 1-Kestose (GF_2), nistose (GF_3), nistose 1- β -fructofuranosil (GF_4) e frutoranosilnistone (F) são ligadas na posição β 2-1 da sacarose, o que diferenciam de outros oligômeros (PASSOS et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2005; GHAZI et al., 2007; KUHN; FILHO, 2010).

Os frutooligossacarídeos são encontrados naturalmente em pequenas quantidades em vários vegetais, porém dependentes da sazonalidade e em concentração muito baixas para exercer qualquer efeito benéfico. A produção do FOS através de microrganismos pode ocorrer em duas etapas, com a purificação da enzima e aplicação em sacarose para produção de FOS ou em uma única etapa em que durante a fermentação ocorre a reação de transfrutossilacção, ou seja, ocorre a quebra da ligação β -1,2 da sacarose e a transferência do grupo frutossil para outra molécula, podendo ser sacarose ou FOS (NASCIMENTO et al., 2017)

Com a grande busca por alimentos saudáveis, associados ao avanço das indústrias de alimentos, os FOS destacam devido as suas propriedades funcionais, sendo reconhecidos com propriedades funcionais, que podem proporcionar alterações úteis no sabor e nas características físico-químicas dos alimentos, assim a sua ingestão tem o objetivo de trazer benefícios à saúde (PATEL; GOYAL, 2012).

3 – OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir e purificar frutossiltransferase obtida de *Aspergillus flavus* utilizando borra de café (*coffea sp.*) por fermentação sólida.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Comparar produção, extração e purificação da FES com resíduo de café com e sem sacarose.
- ✓ Purificar frutossiltransferase utilizando métodos cromatográficos.
- ✓ Analisar o grau de pureza da frutossiltransferase através da eletroforese.
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada, avaliando estabilidade térmica e massa molecular.

4. REFERÊNCIAS

- ALANIO, A., BRETAGNE, S. (2017). Challenges in microbiological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections. *F1000Research*, v. 6, n. 0, p. 157.
- ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. 2009. Production of thermostable Invertase by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, p. 612-622.
- ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; GUTIERREZ, A. M.; BAHAMON, I.; et al. Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. *Gene*, v. 484, n. 1-2, p. 26–34, 2011
- ARANDA, C.; ROBLEDO, A.; LOERA, O.; ESQUIVEL, J. C. C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. 2006. Fungal Invertase expression in solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44, n. 2, p. 229-233.
- ARZANLOU, M. et al. Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. *Mycol Progress*, 2016
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 2, p. 175–185.
- BENNET, J. W. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press.
- BENNETT, J. W., KLICH, M., MYCOTOXINS, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 3, p. 497–516.
- BUENROSTRO-FIGUEROA, J. (2013). ET AL. Potential use of different agroindustrial products as supports for fungal *lactanase* production under solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, v. 92, n. 4, p. 376-382.
- CRANSHAK JASKO, A., ANDRADE, J. DE, FABER DE CAMPOS, P. (2010). et al. Diferentes Fontes De Carbono. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. S1, p. 28–41.
- CASTRO, A. M., TEIXEIRA, M. M. P., CARVALHO, D. F., FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. D. R. (2011). Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of Babassu Cake. *Enzyme research*, v. 2011, p. 392- 457.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. <http://www.conab.gov.br>, (16 outubro de 2017).
- CRUZ, R., E. Mendes, Á. Torrinha, S. Morais, J. A. Pereira, P. Baptista, e S. Casal, “Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach,” *Food Res. Int.*, vol. 73, pp. 190–196, 2015.
- ESQUIVEL, P., JIMÉNEZ, V., Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.
- A. S. Franca, L. S. Oliveira, e M. E. Ferreira, “Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds,” *Desalination*, vol. 249, no. 1, pp. 267–272, 2009.

GEISER, D. M., KLICH, M. A., FRISVAD, J. C. (2007). et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 1–10.

GIBBONS, S. M., CAPORASO, J. G., PIRRUNG, M. (2013). et al. Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 12, p. 4651–4655.

GHAZI, I.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of biotechnology*, v. 128, n. 1, p. 204–11, 2007

HERNANDEZ, R.; FUCHS, B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista Nutrição*, v. 18, n. 5, p. 613–622, 2005.

KLICH, M. A., CARY, J. W., BELTZ, S. B., BENNETT, C. A. (2003). Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. *Mycologia*, v. 95, n. 6, p. 1252–1260.

KURAKAKE, M.; OGAWA, K.; SUGIE, M.; TAKEMURA, A.; SUGIURA, K.; KOMAKI, T. 2008. Two types of β -Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 591-596.

KUHN, R. C.; FILHO, F. M. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. *New biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 862–9, 2010.

LIU T. P. S.L., Tannase from *Aspergillus melleus* improves the antioxidant activity of green tea: purification and biochemical characterisation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY JCR*, v. 52, p. 652-661, 2017.

LORENZONI, A. S. G. et al. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate polymers*, v. 103, p. 193–7, 15 mar. 2014.

LUCCA, A. J. DE. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Revista iberoamericana de micologia: organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia*, v. 24, n. 1, p. 3–13.

MACHADO, I., TEXEIRA, J. A., RODRIGUEZ-COUTO, S. (2013) Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. *Journal of Biotechnology*, v. 165, n. 3-4, p. 195-200.

MAULINI-DURAN, C. (2015). et al. Gaseous emissions during the solid state fermentation of different wastes for enzyme production at pilot scale. *Bioresourcetchnology*, v. 179, p. 211-218.

NOVAKI, L., HASAN, S. D. M., KADOWAKI, M. K., ANDRADE, D. PRODUÇÃO DE INVERTASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA. (ta faltando mais informações sobre esse)

PANESAR P. S., Bali V. Prebiotics. Reference Module in Food Science Encyclopedia of Food and Health, Pages 464–471 2016.

PARK, H. S., JUN, S. C., HAN, K. H., HONG, S. B., & YU, J. H. (2017). *Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important Aspergillus*

Fungi. Advances in Applied Microbiology (Vol. 100). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, p. 385–390, 2003.

PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology* (IF: 3.99). 2016.

PIETRO, R.; 2004. SAID, S. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Summa. P. 416.

S. Phimsen, W. Kiatkittipong, H. Yamada, T. Tagawa, K. Kiatkittipong, N. Laosiripojana, e S. Assabumrungrat, “Oil extracted from spent coffee grounds for biohydrotreated diesel production,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 126, pp. 1028–1036, 2016.

OIC- Organização internacional do café. <http://www.ico.org/>, (16 outubro de 2017).

RAPER, K. B., & FENNELL, D. I. (1965). *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins. Rasiah, I. A., Sutton, K. H., Low, F. L., Lin, H. M., & Gerrard, J. A. (2005). Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89, 325e332.

RAVIKUMAR, G., GOMATHI, D., KALAISEVI, M., UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (2012) 411–417. (não se é de 2012)

REIS, R. L. S. et al. Avaliação do Potencial Biotecnológico de *Aspergillus Parasiticus* Ucp1281 no Biotratamento de Efluentes da Indústria de Laticínios e Produção de Lipídeos. *e-xacta*, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 31-42. 2015.

A. Sampaio, G. Dragone, M. Vilanova, J. M. Oliveira, J. A. Teixeira, e S. I. Mussatto, “Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 2, pp. 557–563, 2013.

Sampaio, A. Dragone, G. Vilanova, M. Oliveira, J. M. Teixeira, J. A. e Mussatto, S. I. “Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 2, pp. 557–563, 2013.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 78, p. 141–173, 2014.

SANCHEZ, J. F., SOMOZA, A. D., KELLER, N. P., & WANG, C. C. (2012). *Advances in Aspergillus secondary metabolite research in the post-genomic era. Natural Product Reports*, 29, 351e371.

SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N., PRAPULLA, S. G. (2004). Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, n. 5, p. 530–537.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. 2007. Production, purification and thermal characterization of Invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. Under solidstate fermentation. *J. Int. Food Sci. Techn.*, p. 1365-262.

SHANG, Y. F., XU, J. L., LEE, W. J., Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African Journal of Botany*. v. 109, p. 75-80. 2017

UM, B. H. SELVAKUMAR, P., PANDEY, A. (1999). Solidstatefermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*. v. 34, n. 8, p. 851-855.

SILVA, R. R. DA, FREITAS CABRAL, T. P. DE, RODRIGUES, A., CABRAL, H. (2013). Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solidstate fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 235–243.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, p. 589-595, 2006.

TIAN, F., KARBOUNE, S., HILL, A. (2014). Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 22, n. November 2015, p. 230–238.

UMA, C. et al. Production, Purification and Characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* Using Fruit Peel Waste as Substrate. *Advances in Biological Research* 4 (1): 31-36, 2010.

YEGIN, S., FERNANDEZ-LAHOURE, M., SALGADO, A.J.L., GUVENC, U., GOKSUNGUR, Y., TARI, C. (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 949– 60.

YOSHIKAWA, J.; AMACHI, S.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. 2007. Purification and some properties of β -Fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 103, p. 491-493.

W.VARGAS, W., CUMINO, A., SALERNO, G. L. (2003). Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta*, v. 216, p. 951–960.

Capítulo I

Produção e purificação de frutossiltransferase obtida de *Aspergillus flavus* por fermentação sólida utilizando borra de café (*Coffea* sp.)

Steliane L. Santos^a, Romero M. P. B. Costa^a, Ana L. F. Porto^a, Cynthia O. Nascimento, Maria T. H. Cavalcanti^a

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos –CEP: 52171-900 – Recife- PE – Brasil.

RESUMO

A produção e purificação de frutossiltransferase (FTase) por *Aspergillus flavus*, a produção foi avaliada em fermentação estado sólido (FES) a 30°C durante 72 horas, usando resíduo agrícola de baixo custo, afim de analisar o potencial da produção de frutooligossacarídeos (FOS). O borra de café é um substrato promissor para o desenvolvimento microbiano, que funciona como indutor na produção da enzima FTase, sendo dispensável a utilização da sacarose no meio, contribuindo para redução de custos na etapa de produção. A atividade máxima obtida nesta etapa foi de 31,5 U/mg. A enzima purificada apresentou peso molecular de 57,96KDa em uma fração única com fator de purificação 86,16, que apresentou a temperatura ótima de 60°C e foi estável a 50°C por 30 minutos. A FTase produziu os frutooligossacarídeos (FOS) nistose e kestose. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial promissor da FTase produzida por *Aspergillus flavus* utilizando borra de café como substrato, e na sua utilização na síntese de FOS. A não utilização da sacarose como indutora foi analisada pela primeira vez para produção de FTase. Entretanto, ainda se faz necessário novos estudos quanto a otimização dos parâmetros para produção e determinação da viabilidade comercial da enzima em escala industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Frutossiltransferase, *Coffea* sp., Fermentação em estado sólido, Caracterização, Purificação, Frutooligossacarídeos.

Autor correspondente: Maria Taciana Holanda Cavalcanti. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife- PE – Brasil. *fone:* (+5581) 33206345, *Fax:* (+5581) 33206388. *email:* MTCVsoares@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Frutossiltransferase (FTase) é uma enzima utilizada na indústria, sua ação enzimática ocorre através da hidrólise da sacarose na ligação β -1,2 e a transferência do grupo frutossil para uma outra molécula, podendo ser a própria sacarose ou frutooligossacarídeos (FOS), ocorrendo a liberação de glicose, essa reação específica chama-se transfrutossilacção (Ganaie et al. 2017). Essa enzima foi amplamente descrita em microrganismos, atraindo interesse para várias aplicações industriais, incluindo as indústrias de alimentos e bebidas. Sua produção através de fonte microbiana é uma opção atrativa por levar a redução de custos no processo (Shafiq, k. et al., 2003).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir enzimas extracelulares, entre elas a FTase, utilizada nas indústrias para a produção de FOS. A FTase caracteriza-se por possuir baixa atividade hidrolítica e alta atividade de transfrutolisacção (Xu et al. 2015).

O FOS, também chamado de oligofrutose ou oligofrutano é explorado como um adoçante artificial ou alternativo que é considerado seguro para pessoas com diabetes. Além disso, eles são benéficos para a saúde humana atuando na microbiota intestinal, de forma específica, pois estimulam o crescimento seletivo de lactobacilos e bifidobactérias (Rawat et al., 2015).

Porém, poucos trabalhos apresentam fermentação em estado sólido como metodologia para produção da enzima FTase por fungos filamentosos, mesmo sendo um método mais simples, econômico e sustentável, que pode utilizar resíduos agroindustriais de baixo custo para o crescimento microbiano e consequente produção de enzimas, solucionando o problema de deposição e poluição do meio ambiente (Soni et al., 2015; Aruldass et al., 2016).

A fermentação em estado sólido é uma alternativa viável, pois, uma porção significativa do processo de produção é atribuída ao substrato de crescimento microbiano que pode ser remediada através da utilização de recursos renováveis como resíduos agroindustriais, gerando uma economia, ao mesmo tempo em que agrega valor ao produto biotecnológico produzido (Oyedejia et al., 2017).

De acordo com Mussatto e colaboradores (2011), os resíduos de café contêm quantidades consideráveis de açúcares fermentáveis e outros nutrientes, que o torna

um substrato interessante para o crescimento de microrganismos e também para a produção de produtos de valor agregado, como as enzimas.

Assim, devido a importância do FOS como ingrediente de alimentos funcionais, o objetivo desse estudo foi avaliar a produção da enzima FTase por *Aspergillus flavus* em fermentação sólida utilizando borra de café como substrato alternativo sem a adição de sacarose e sua posterior purificação e caracterização.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1 Microrganismo e meio de estoque e esporulação

Foi utilizado *Aspergillus flavus* identificado pela MICOTEC-URM, UFPE. O meio de cultura utilizado para a manutenção do microrganismo e sua esporulação foi o Ágar Czapek. As condições para esporulação foram 30°C em estufa por 7 dias, e para estoque foi armazenado em óleo mineral.

2.2 Fermentação em estado sólido

Para a produção de FTase a espécie selecionada foi cultivada e após a esporulação no meio e condições descritos no item 2.1, uma solução de esporos foi preparada em NaCl (0,9% p/v) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. E após a contagem em câmara de Neubauer, uma quantidade suficiente para a concentração final de 10^6 esporos/mL foi inoculada nos Erlenmeyers contendo 4g de borra de café previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos. O resíduo de café utilizado para a fermentação em estado sólido (FES) foi obtido, inicialmente, do comércio local (Restaurantes Universitários, Cafeterias e Lanchonetes). Esse resíduo foi seco em estufa a 65°C até completa desidratação e em seguida armazenado. Após a esterilização o substrato foi umedecido com uma solução tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 6,5) até um teor de umidade 60% determinada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (Zenebon, Pascuet, & Tiglea, 2008). A fermentação foi realizada a 30 °C mantidos no escuro por 120 horas em BOD, sendo retirado um frasco a cada 24h para acompanhamento da produção da enzima.

2.3 Obtenção do extrato enzimático

Após cada tempo de fermentação, o extrato enzimático foi obtido a partir da mistura utilizando a proporção de 7,2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5

para cada 1g de substrato, sob agitação em agitador orbital a 100 rpm durante 10 min. Em seguida, foi realizada a maceração da mistura e posterior filtração em papel de filtro e uma bomba a vácuo, por fim, o sobrenadante foi submetido à centrifugação em 2000rpm por 10 minutos a 4°C para total clarificação, sendo avaliado quanto a atividade enzimática e concentração de proteína.

2.4. Atividade enzimática

A atividade de FTase foi determinada de acordo com Ganaie et al., (2014) por quantificação da glicose liberada a partir da sacarose. A mistura reacional foi composta por 0,25 mL do extrato enzimático, com 0,75 mL do substrato (solução de sacarose a 60 % em tampão fosfato de sódio 0,1M no pH 6,5), a seguir foi incubada a 55°C por 60 minutos, decorrido o tempo de reação, a quantidade de glicose liberada no sobrenadante foi determinada utilizando um Kit de glicose-oxidase (Biosystem S.A). Uma unidade (U) da atividade de FTase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto, a partir da sacarose nas condições acima mencionadas.

2.5. Determinação da concentração de proteína

As concentrações de proteína foram realizadas através do método de Smith *et al.*, (1985), com uma curva padrão de proteína na concentração de 100 para 1000 μ g/ mL de albumina bovina, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595nm (GE, Ultrospec 7000, Reino Unido).

2.6. Precipitação da FTase

A pré-purificação da enzima foi iniciada através da precipitação, sendo avaliados 3 agentes precipitantes: acetona (70%), etanol (70%) e sulfato de amônio (0-60%). O ensaio foi realizado utilizando um volume de 30 mL de extrato enzimático obtido de acordo com o item 2.3. As proteínas precipitadas foram recolhidas por centrifugação a 10 000 rpm, 4 °C durante 10 min e ressuspendido em 3 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 6,5). A remoção do agente precipitante foi realizada através da evaporação nas amostras de acetona e etanol e dialise na amostra com sulfato de amônio.

2.7. Purificação da FTase

2.7.1. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A50

Uma alíquota de 0,5 mL da amostra precipitada com o melhor agente precipitante foi submetida em triplicata à cromatografia de troca iônica de acordo com SHARMA *et al.*, (1999) modificado. A coluna de 5mL foi empacotada com resina DEAE- Sephadex A50, previamente ativada com soluções de HCL e NaOH a 0,1 M respectivamente, equilibrada e lavada com 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, (10mM, pH 6,5). A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL / min, foram recolhidas frações (1 mL) em tubos de ensaio. As amostras coletadas foram lidas em espectrofotômetro a 280nm e mensuradas a atividade de FTase e concentração de proteínas de acordo com os itens 2.4 e 2.5, respectivamente.

2.7.2. Cromatografias no sistema ÄKTA em Deae-Sephadex e Superdex-75

A fração não adsorvida da cromatografia de troca iônica realizada de acordo com o item 2.7.1, que apresentou maior atividade enzimática, foi liofilizada e solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5 e adicionada na coluna DEAE-Sephadex QFF do sistema AKTA, na sequência uma alíquota de 1mL da fração não adsorvida que apresentou maior atividade foi aplicada em coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL do sistema ÄKTA Avant (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) utilizando tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5, com 0,15 M de NaCl. A calibração da coluna foi realizada usando uma mistura de filtração em gel, marcadores de peso molecular (1 mg / mL): albumina de soro bovino, anidrase carbônica e albumina de ovo de galinha e um inibidor de tripsina. A curva padrão plotada usando o software UNICORN-6.0 seguiu a equação $y = -7,674 + 134,7$ ($R^2 = 0,991$). A absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 215 nm e 280nm. As frações enzimáticas foram separadas por tamanho molecular e coletadas a partir de um coletor de amostras (1,0 mL). As frações coletadas foram armazenadas para posterior caracterização.

2.8. Caracterização parcial do extrato enzimático bruto e purificado

2.8.1. Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima da enzima no extrato bruto e purificado foi avaliada utilizando uma faixa de 35°C a 70°C. Onde a atividade enzimática, de acordo com o item 2.4, foi realizada nas diferentes temperaturas.

2.8.2. Determinação da estabilidade à temperatura

A estabilidade térmica da enzima presente no extrato bruto e purificado foi determinada utilizando o valor da atividade residual realizada de acordo com Nascimento *et al.* 2016 que consiste na incubação do extrato e purificado. Incubando-se a enzima nas temperaturas que apresentaram melhor atividade de acordo com o item 2.8.1 durante 15 a 90 min. Em seguida a atividade foi determinada de acordo com o item 2.4.

2.9. Caracterização do frutooligossacarídeos (FOS) purificado

Para análise da identificação do FOS por espectrometria de massa foi utilizada a metodologia descrita por Ganaie *et al.* (2017). Os dados foram coletados utilizando XEVO TQ-S (Waters, technologies, Brasil) em uma coluna Hipercarb (50x3,0mm) com fase móvel composta de 75% metanol, 25% água e 0,1% ácido acético com taxa de fluxo de 0,35 mL/min. Foram comparados com os padrões de kestose e nistose os tempos de retenção e peso molecular dos FOS obtidos

3. Resultados e discussão

A utilização de indutores é um dos parâmetros que influencia o metabolismo dos microrganismos, pois o tempo de fermentação promove o crescimento microbiano induzindo o rendimento da enzima (BHUNIA *et al.*, 2012). Os resultados obtidos no nosso trabalho estão apresentados na figura 1. Podemos observar que as atividades enzimáticas foram muito próximas nos vários tempos estudados, indicando que a borra de café contém todos os nutrientes necessários para estimular o microrganismo a produzir FTase, sendo dispensável a utilização da sacarose no meio, isso contribui para redução de custos na etapa de produção, deixando o processo mais econômico e sustentável. É possível ainda verificar que 72h de crescimento apresentou maior produção da enzima com atividade específica de 31,5 U/mg em ambos os cultivos.

De acordo com a literatura consultada o gênero *Aspergillus* é bastante estudado quanto à produção de FTase, variando os valores de produção de acordo com o substrato de crescimento e a espécie em questão. No trabalho de Guimaraes *et al.* (2007) extraíndo b-frutofuranosidase de *Aspergillus niveus* utilizando resíduos agroindustriais obtiveram em seu extrato bruto o valor de 3,9 U/mg com 72 horas de fermentação e Uma *et al.* (2010) que obteve maiores rendimentos entre os tempos de 72 e 96 horas com atividade máxima de 29,3 U/mg no extrato bruto da fermentação de *Aspergillus flavus*, sendo estes trabalhos com valores em atividade

inferiores aos relatados nesta pesquisa.

Os resultados obtidos para a seleção do agente precipitante da enzima FTase estão apresentados na tabela 1. Podemos observar que acetona foi o melhor agente precipitante, pois obteve o maior rendimento em atividade específica e maior fator de purificação, 10,70 e isto demonstra que a precipitação foi efetiva como uma etapa de pré-purificação.

Os nossos resultados foram bastante promissores quando comparamos com a literatura consultada, ao utilizarmos uma substância como a acetona para precipitação de proteínas. Xu et al. (2015) quando purificaram a FTase obtida a partir de *Penicillium oxalicum* GXU20 utilizaram a precipitação com etanol e obtiveram uma atividade específica de 77,77 U/mg, inferior aos nossos resultados com a acetona, e NOVAKI et al. (2005) quando produziram invertase a partir de *Aspergillus casingii* e precipitaram com etanol e acetona, demonstraram um fator de purificação de 1,38 e 1,87, respectivamente apresentaram resultados inferiores aos apresentados nesta pesquisa.

Os resultados gerados a partir da produção da Ftase obtida a partir do *Aspergillus flavus* está estão descritos na (tabela 2).

A fração obtida da precipitação com acetona foi aplicada em cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A50 de acordo com o item 2.7.1. Os resultados obtidos a partir da cromatografia de troca iônica estão apresentados na figura 2, onde podemos observar a presença de 2 picos nas frações adsorvidas e não adsorvidas. Entretanto, apenas na fração que corresponde a não adsorvida apresentou atividade enzimática de FTase, com 38,32 U/mL e fator de purificação de 5,86. Essa fração foi selecionada para as demais etapas de purificação.

Quando comparamos os nossos resultados totais com a literatura consultada, podemos observar que obtivemos valores mais altos de fator de purificação, pois Guimarães *et al.*, (2007) que utilizaram cromatografia de troca iônica DEAE-cellulose para purificar a enzima FFase obtida a partir do *Aspergillus niveus*, obtiveram fator de purificação de 2,9. Nesse caso, os autores usando o mesmo princípio de funcionamento da cromatografia obtiveram valores semelhantes quando se trata desse tipo de estratégia de purificação de enzimas. Virgen-ortiz et al., (2016) quando purificaram a FTase a partir de *Aspergillus aculeatus* em cromatografia de troca iônica em uma coluna Q-Sepharose HP, conseguiram 38,1 de fator de purificação e

21,0 em rendimento de atividade enzimática. Wei et al. (2014) relata em seu estudo a FTase produzida por *Aspergillus oryzae* ZZ-01 purificada em 4 etapas: precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografias de Q-Sepharose FF, Sepharose FF e SephacrylS-200 HR sendo esta com atividade específica de 1 U/mg e fator de purificação 17.

Com o objetivo de melhorar a resolução da purificação da enzima FTase, e obter o peso molecular, a amostra não adsorvida obtida da cromatografia DEAE-sephadex QFF foi concentrada e reaplicada no sistema AKTA haithap utilizando a coluna Superdex-75 em que apresentou uma única fração de 1mL com atividade para FTase, apresentando peso molecular de 57.96 kDa (Figura 3).

Comparando com os estudos de Nguyen *et al.*, (2005) que utilizou a cromatografia através do sistema FPLC com colunas DEAE-Sepharose e Ultrogel Ac A44 para obter 40,0 e 49,8 em fator de purificação utilizando *Aspergillus niger* e Nadeem, H *et al.*, (2009) que utilizaram o mesmo microrganismo com cromatografia em coluna Mono Q e obteve o fator de purificação de 101.

Na figura 6 é possível observar que a temperatura ótima foi de 60°C e é possível observar que tanto o extrato bruto quanto o purificado mantiveram estabilidade na temperatura de 50°C em até 30 min mantendo aproximadamente 100% da atividade enzimática, não havendo atividade acima da temperatura de 60°C em que possivelmente ocorreu a desnaturação da enzima.

No trabalho apresentado por Yiang et al. (2016) utilizando uma cromatografia de troca iônica em uma coluna coluna Ni^{2+} (GE Healthcare, Houston, TX, EUA) do sistema AKTA, obteve um aumento na atividade da FTase nas temperaturas entre 30°C e 55°C e diminuição nas temperaturas entre 55°C a 70°C sendo a temperatura ótima de 55°C, resultados semelhantes aos apresentados nesse trabalho.

A produção de FOS através da reação de transfrutoseilação da enzima FTase produzida por *Aspergillus flavus* em FES foi analisada de acordo com o item 2.9. em que a análise dos produtos da reação por espectrofotometria de massa mostrou que a enzima extracelular tinha atividade de transfrutoseilação. Mais kestose do que nistose foi detectada (figura 8). Na sua mobilidade cromatográfica, os compostos

correspondentes a kestose e nistose apresentaram o tempo de retenção de 0,63 mnts e 0,90 mnts.

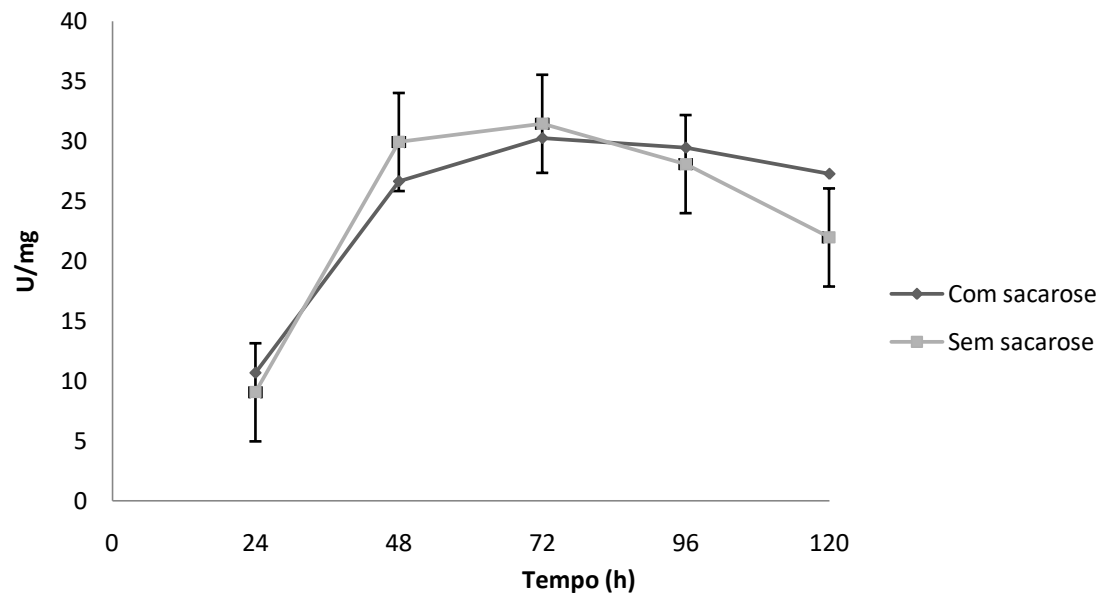


Figura 1 curva de produção da Frutosiltransferase por *Aspergillus flavus* cultivado de forma estática em fermentação em estado sólido utilizando a borra de café como substrato por 120h, a 30C.

1

Tabela 1. Resumo da purificação de frutossiltransferase obtida a partir de *Aspergillus flavus* cultivado de forma estática em fermentação em estado sólido utilizando a borra de café como substrato por 120h, a 30C

Passo de purificação	Atividade total (U/mL)	Proteínas total mg/mL	Atividade específica (U/mg ⁻¹)	Rendimento em atividade (%)	Fator de purificação
Extrato	3632,40	240,00	15,13	100,00	1
Etanol	1774,60	15,63	113,53	48,85	7,50
Sulfato de amônio (0-60%)	92,52	28,92	3,20	2,55	0,21
Precipitação acetone	2427,63	15,00	161,84	66,83	10,70
Fração não adsorvida Deae-Sephadex A50	868,80	9,80	88,65	23,92	5,86
Não adsorvido DEAE-Sephadex sistema AKTA	38,32	0,09	395,05	1,05	26,11
Superdex-75 sistema AKTA	28,03	0,022	1303,60	0,77	86,16

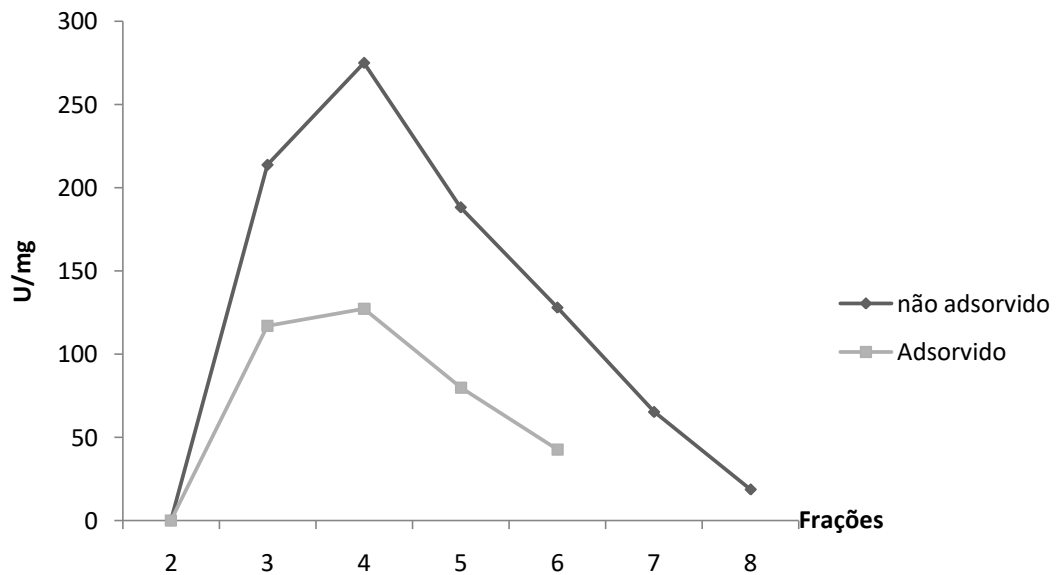


Figura 2 Cromatografia da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus flavus* em resina DEAE sephadex A50 frações não adsorvido e adsorvido.

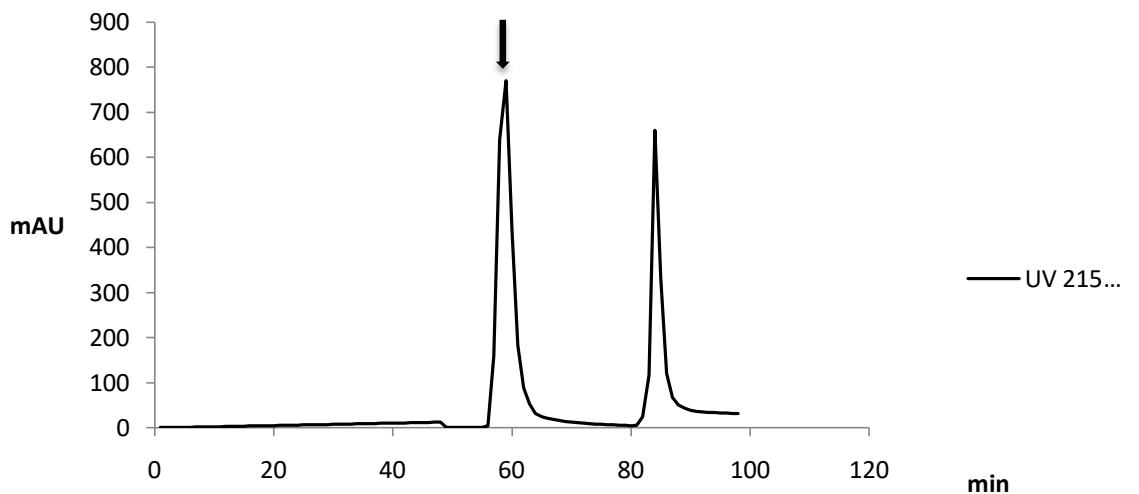


Figura 3. Perfil cromatográfico da enzima frutossiltransferase obtida a partir da fermentação em estado solido do *Aspergillus flavus* precipitado com acetona e carregado em cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex do sistema AKTA haithap.

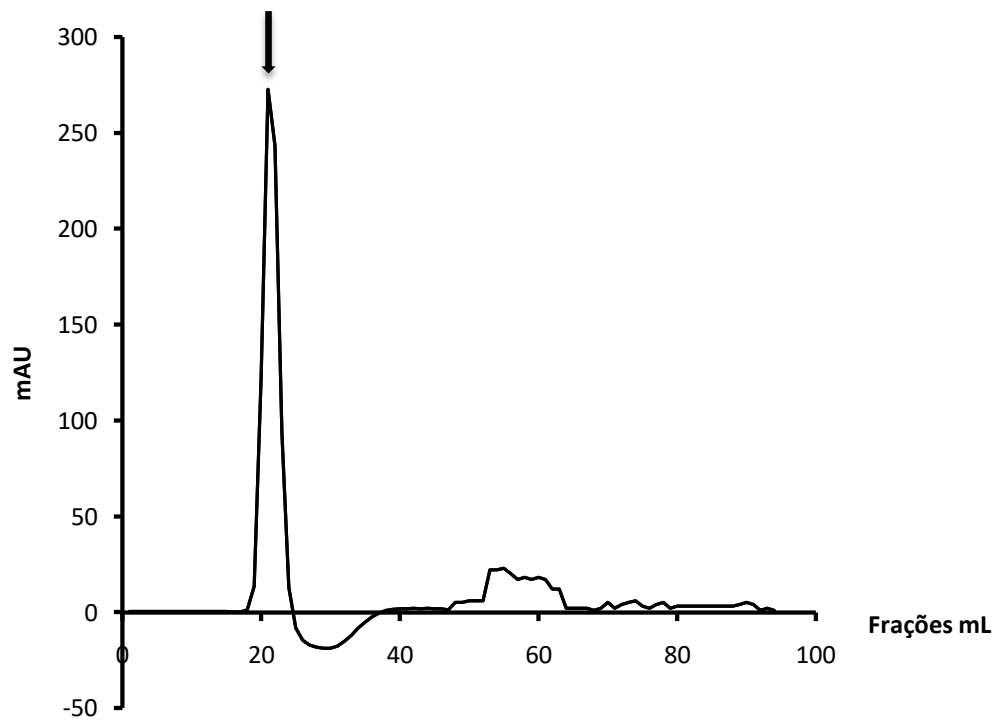


Figura 4. Cromatograma do sistema automatizado de cromatografia líquida rápida de proteínas AKTA para purificação de frutossiltransferase por *Aspergillus flavus* em fermentação em estado sólido (FES) utilizando borra de café como substrato.

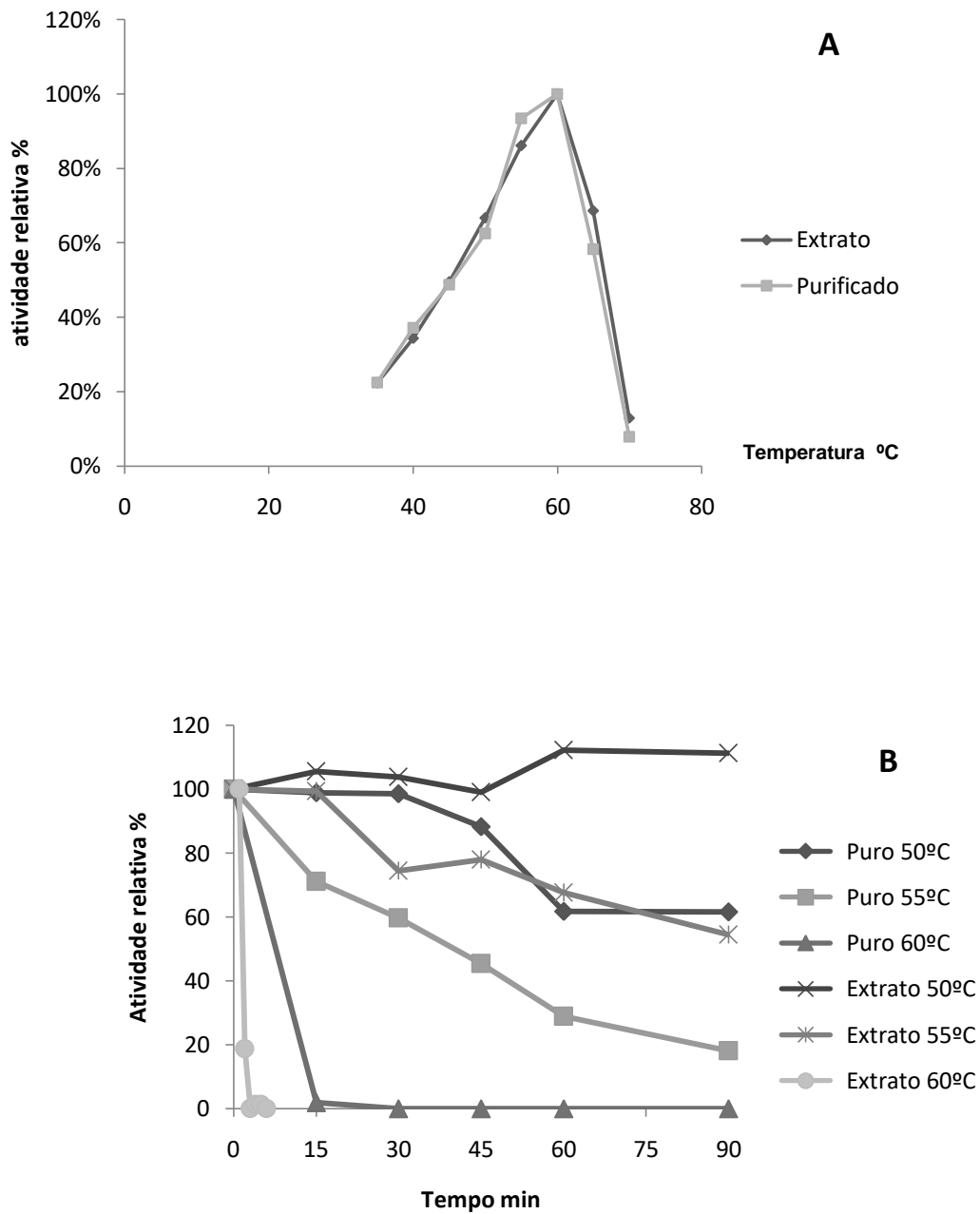
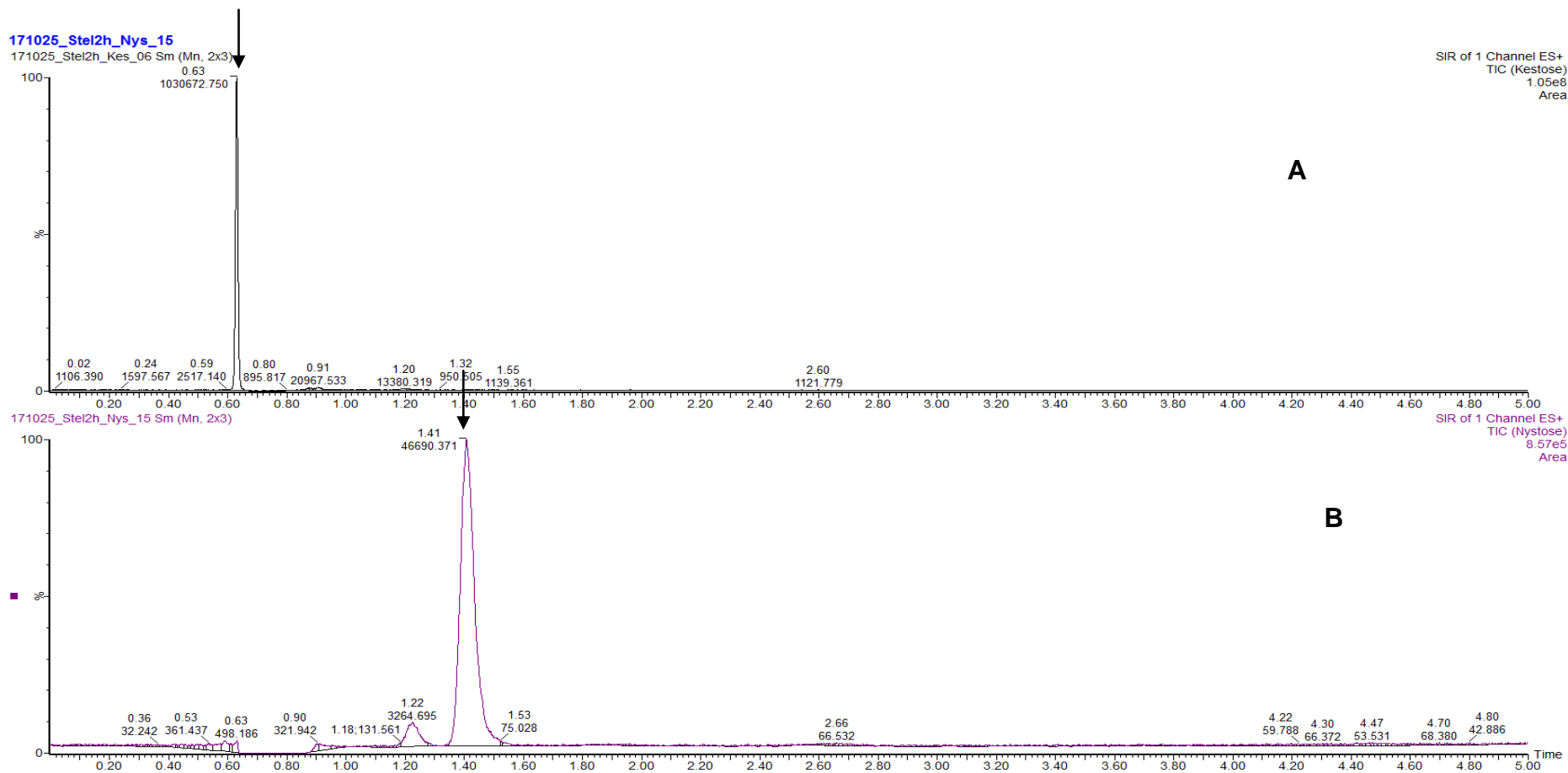


Figura 5. Efeito da temperatura ótimo (A), da temperatura ótima e termoestabilidade (B) na atividade da frutossiltransferase purificada de *Aspergillus flavus*. Todos os resultados foram realizados em triplicata.



1

2 **Figura 6** Análise da presença do FOS de fração pre-purificada da enzima frutossiltransferase produzida por *Aspergillus flavus* em fermentação em estado
 3 sólido. (A) Kestose e (B) Nistose.

4 .

4. Conclusão

O *Aspergillus flavus* produziu a enzima frutossiltransferase utilizando o resíduo agroindustrial, borra de café, com crescimento de 72h com atividade de 15,13U/mg, a partir dessa amostra foi possível extrair e purificar frutossiltransferase através de quatro passos de purificação, precipitação, cromatografia DEAE-Sephadex A50, cromatografia DEAE-Sephadex QFF e superdex-75 do sistema AKTA haithap, sendo obtido uma única fração purificada com o peso molecular de 57,95 kDa. Sendo a enzima capaz de produzir frutooligossacaridos nistose e kestose. Esse trabalho colabora para produção de uma enzima que pode ser utilizada pela indústria alimentícia reduzindo custos o resíduo agroindustrial, café, é um substrato econômico e de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), a Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Programa de Pós Graduação em Biociência Animal (PGBA) e ao laboratório de tecnologia e bioativos (LABTECBIO).

5. REFERÊNCIAS

- ALANIO, A., BRETAGNE, S. (2017). Challenges in microbiological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections. *F1000Research*, v. 6, n. 0, p. 157.
- ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. 2009. Production of thermostable Invertase by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, p. 612-622.
- ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; GUTIERREZ, A. M.; BAHAMON, I.; et al. Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. *Gene*, v. 484, n. 1-2, p. 26–34, 2011
- ARANDA, C.; ROBLEDO, A.; LOERA, O.; ESQUIVEL, J. C. C.; RODRIGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. 2006. Fungal Invertase expression in solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44, n. 2, p. 229-233.
- ARZANLOU, M. et al. Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. *Mycol Progress*, 2016

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 2, p. 175–185.

BENNET, J. W. (2010). Na Overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press.

BENNETT, J. W., KLICH, M., MYCOTOXINS, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 3, p. 497–516.

BUENROSTRO-FIGUEROA, J. (2013). ET AL. Potential use of different agroindustrial products as supports for fungal *l*-glutaminase production under solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, v. 92, n. 4, p. 376–382.

CRANSHAK JASKO, A., ANDRADE, J. DE, FABER DE CAMPOS, P. (2010). et al. Diferentes Fontes De Carbono. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. S1, p. 28–41.

CASTRO, A. M., TEIXEIRA, M. M. P., CARVALHO, D. F., FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. D. R. (2011). Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of Babassu Cake. *Enzyme research*, v. 2011, p. 392–457.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. <http://www.conab.gov.br>, (16 outubro de 2017).

CRUZ, R., E. Mendes, Á. Torrinha, S. Morais, J. A. Pereira, P. Baptista, e S. Casal, “Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach,” *Food Res. Int.*, vol. 73, pp. 190–196, 2015.

ESQUIVEL, P., JIMÉNEZ, V., Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.

A. S. Franca, L. S. Oliveira, e M. E. Ferreira, “Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds,” *Desalination*, vol. 249, no. 1, pp. 267–272, 2009.

GEISER, D. M., KLICH, M. A., FRISVAD, J. C. (2007). et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 1–10.

GIBBONS, S. M., CAPORASO, J. G., PIRRUNG, M. (2013). et al. Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 12, p. 4651–4655.

GHAZI, I.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of biotechnology*, v. 128, n. 1, p. 204–11, 2007

HERNANDEZ, R.; FUCHS, B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista Nutrição*, v. 18, n. 5, p. 613–622, 2005.

KLICH, M. A., CARY, J. W., BELTZ, S. B., BENNETT, C. A. (2003). Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. *Mycologia*, v. 95, n. 6, p. 1252–1260.

KURAKAKE, M.; OGAWA, K.; SUGIE, M.; TAKEMURA, A.; SUGIURA, K.; KOMAKI, T. 2008. Two types of β -Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 591-596.

KUHN, R. C.; FILHO, F. M. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. *New biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 862–9, 2010.

LIU T. P. S.L., Tannase from *Aspergillus melleus* improves the antioxidant activity of green tea: purification and biochemical characterisation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY JCR*, v. 52, p. 652-661, 2017.

LORENZONI, A. S. G. *et al.* Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate polymers*, v. 103, p. 193–7, 15 mar. 2014.

LUCCA, A. J. DE. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Revista iberoamericana de micologia: organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia*, v. 24, n. 1, p. 3–13.

MACHADO, I., TEXEIRA, J. A., RODRIGUEZ-COUTO, S. (2013) Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. *Journal of Biotechnology*, v. 165, n. 3-4, p. 195-200.

MAULINI-DURAN, C. (2015). *et al.* Gaseous emissions during the solid state fermentation of different wastes for enzyme production at pilot scale. *Bioresource technology*, v. 179, p. 211-218.

NOVAKI, L., HASAN, S. D. M., KADOWAKI, M. K., ANDRADE, D. PRODUÇÃO DE INVERTASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA. (ta faltando mais informações sobre esse)

PANESAR P. S., Bali V. Prebiotics. *Reference Module in Food Science Encyclopedia of Food and Health*, Pages 464–471 2016.

PARK, H. S., JUN, S. C., HAN, K. H., HONG, S. B., & YU, J. H. (2017). *Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important Aspergillus Fungi. Advances in Applied Microbiology* (Vol. 100). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, p. 385–390, 2003.

PAULUSSEN, C. *et al.* Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology* (IF: 3.99). 2016.

PIETRO, R.; 2004. SAID, S. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Summa. P. 416.

S. Phimsen, W. Kiatkittipong, H. Yamada, T. Tagawa, K. Kiatkittipong, N. Laosiripojana, e S. Assabumrungrat, "Oil extracted from spent coffee grounds for bio-hydrotreated diesel production," *Energy Convers. Manag.*, vol. 126, pp. 1028–1036, 2016.

OIC- Organização internacional do café. <http://www.ico.org/>. , (16 outubro de 2017).

RAPER, K. B., & FENNELL, D. I. (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins. RASIAH, I. A., SUTTON, K. H., LOW, F. L., LIN, H. M., & GERRARD, J. A. (2005). Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89, 325e332.

RAVIKUMAR, G., GOMATHI, D., KALAISEVI, M., UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (2012) 411–417. (não se é de 2012)

REIS, R. L. S. et al. Avaliação do Potencial Biotecnológico de *Aspergillus Parasiticus* Ucp1281 no Biotratamento de Efluentes da Indústria de Laticínios e Produção de Lipídeos. *e-xacta*, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 31-42. 2015.

A. Sampaio, G. Dragone, M. Vilanova, J. M. Oliveira, J. A. Teixeira, e S. I. Mussatto, "Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 2, pp. 557–563, 2013.

Sampaio, A. Dragone, G. Vilanova, M. Oliveira, J. M. Teixeira, J. A. e Mussatto, S. I. "Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 2, pp. 557–563, 2013.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 78, p. 141–173, 2014.

SANCHEZ, J. F., SOMOZA, A. D., KELLER, N. P., & WANG, C. C. (2012). Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports*, 29, 351e371.

SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N., PRAPULLA, S. G. (2004). Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, n. 5, p. 530–537.

SHAHEEN, I.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, T. 2007. Production, purification and thermal characterization of Invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. Under solid state fermentation. *J. Int. Food Sci. Technol.*, p. 1365-262.

SHANG, Y. F., XU, J. L., LEE, W. J., Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African Journal of Botany*. v. 109, p. 75-80. 2017

UM, B. H. SELVAKUMAR, P., PANDEY, A. (1999). Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*. v. 34, n. 8, p. 851-855.

SILVA, R. R. DA, FREITAS CABRAL, T. P. DE, RODRIGUES, A., CABRAL, H. (2013). Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 235–243.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, p. 589-595, 2006.

TIAN, F., KARBOUNE, S., HILL, A. (2014). Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 22, n. November 2015, p. 230–238.

UMA, C. et al. Production, Purification and Characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* Using Fruit Peel Waste as Substrate. *Advances in Biological Research* 4 (1): 31-36, 2010.

YEGIN, S., FERNANDEZ-LAHOURE, M., SALGADO, A.J.L., GUVENC, U., GOKSUNGUR, Y., TARI, C. (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 949–60.

YOSHIKAWA, J.; AMACHI, S.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. 2007. Purification and some properties of β -Fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 103, p. 491-493.

W.VARGAS, W., CUMINO, A., SALERNO, G. L. (2003). Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta*, v. 216, p. 951–960.

ANEXO

Author Guidelines (International Journal of Food Science & Technology)

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Relevant Documents: Page Charge Form, Colour Work Agreement Form
Useful Websites: Submission Site, Author Services, Wiley's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

1.

GENERAL

Scope

The Editor welcomes the submission of original articles relevant to the science and technology of food and beverages. Contributions are accepted on the strict understanding that the material in whole or in part has not been, nor is being, considered for publication elsewhere. Topics of only narrow local interest will not be accepted unless they have wider potential or consequences. If accepted, papers will become the copyright of the journal. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the *International Journal of Food Science & Technology*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell's Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2.

ETHICAL

GUIDELINES

The *International Journal of Food Science & Technology* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1.

Authorship

and

Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not

justify authorship.

The *International Journal of Food Science & Technology* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements. Acknowledgements: Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

2.2 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at <http://www.consort-statement.org/>. A CONSORT checklist should also be included in the submission material (http://www.consort-statement.org/mod_product/uploads/CONSORT_2001_checklist.doc).

The International Journal of Food Science & Technology encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, clinicaltrials-dev.ifpma.org/, isrctn.org/. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.3 Conflict of Interest and Source of Funding

Conflict of Interest: Authors are required to disclose any possible conflict of interest. These include financial (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee).

Source of Funding: Authors are required to specify the source of funding for their research when submitting a paper. Suppliers of materials should be named and their

location (town, state/county, country) included. The information will be disclosed in the published article.

2.4 Appeal of Decision

The Editor's decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.5 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.6 Copyright Assignment and OnlineOpen

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services (see 6.3 below); where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in

complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.7 Manuscript Referrals to the Open Access Journal *Food Science & Nutrition*
 This journal works together with Wiley's open access journal, *Food Science & Nutrition*, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of *Food Science & Nutrition*. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor of *Food Science & Nutrition* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. *Food Science & Nutrition* is a Wiley Open Access Journal and article publication fees apply. For more information, please go to www.foodscience-nutrition.com.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site. **Go to the journal home page and click on 'Online Submission'**. The use of an online submission and peer review site enables rapid distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper are available online and below. Manuscript submission is a step-by-step process, and little preparation is required beyond having all parts of your manuscript in an electronic format and a computer with an Internet connection and a Web browser. Full help and instructions are provided on-screen. As an author, you will be prompted for author and manuscript details and then to upload your manuscript file(s). To avoid postal delays, all correspondence is by e-mail. A completed manuscript submission is confirmed by e-mail immediately and your paper enters the editorial process with no postal delay. Your manuscript will have a unique manuscript number and you can check the progress of your manuscript at any time by returning to the online submission site via the journal home page. When a decision is made, revisions can be submitted online, with an opportunity to view and respond to all comments.

Peer review is also handled online. Referees are given full instructions and access to the paper on the online submission site. The review form and comments are completed online and immediately made available to the Editor-in-Chief. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. If you require assistance then click the **Get Help Now** link which appears at the top right of every ScholarOne Manuscripts page. If you cannot submit online, please contact the Editorial office.

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site via the **journal home page** and click on '**Online Submission**' .
- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/ijfst> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text and the figures should be uploaded as separate files. The text file must contain the entire manuscript including title page, summary, keywords, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review
[Version 1 (Single-blinded Review):]

All manuscripts submitted to the *International Journal of Food Science & Technology* will be reviewed by at least two experts in the field. The *International Journal of Food Science & Technology* uses single-blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.6. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by spam filtering software on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.7. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Centre' for

the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.8. Submission of Revised Manuscripts
 Revised manuscripts must be uploaded within 1 month of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page.

Correspondence regarding manuscripts should be sent by e-mail to the Editor-in-Chief.

General and IFST correspondence should be sent to:

Institute of Food Science and Technology
 5 Cambridge Court
 210 Shepherds Bush Road
 London, W6 7NJ, UK

When preparing a manuscript, authors should refer to a recent issue of the Journal and follow the detailed instructions given below. Please keep a copy of the original manuscript for reference. An e-mail acknowledging the online submission of a manuscript will be sent by the Journal. Any material sent to the Editorial Office will not be returned.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Papers: These are reports of substantial research less than 5000 words equivalent, including tables, figures, references. Typically a table or figure is equivalent to 150 words while photograph is equivalent to 300 words. These are guidelines only. Original Articles should comprise:

- (a) a concise Summary (fewer than 150 words) containing the main results and conclusions;
- (b) up to ten keywords that accurately identify the paper's subject, purpose and focus;
- (c) an Introduction giving essential background but no subheadings; objectives must be clearly stated;
- (d) Materials and methods with sufficient full experimental detail (where possible by

reference) to permit repetition; sources of material must be given and statistical methods must be specified by reference, unless non-standard;

(e) Results should be presented concisely, using well-designed tables and/or figures; the same data may not be used in both; appropriate statistical data should be given. All data must be obtained with attention to statistical detail in the planning stage. If a sufficiently large number of replicates are not organized before the experiment is undertaken, biological variation is not eliminated satisfactorily. As replicate design has been recognised to be important to biological experiments for a considerable time, the Editor has decided that any paper that appears not to have adequate mathematical treatment of the data will be returned un-refereed;

(f) Discussion should cover the implications and consequences, not merely recapitulating the results; conclusions should be concise;

(g) brief Acknowledgements;

(h) References as shown below.

Review Articles: (fewer than 6000 words) These are concise, critical but constructive and conclusive topical accounts written for non-specialists. References must be in the form shown below. A small honorarium may be given.

Letters to the Editor: These are brief comments on material published in previous issues; they are published at the discretion of the Editor. They are the only items not subject to multiple peer review.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Authors should very carefully consider the preparation of papers to ensure that they communicate efficiently. Papers are much more likely to be accepted if they are carefully designed and laid out, have few or no errors, are concise, and conform to the style and instructions. They will also be published with much less delay than those that require much scientific and editorial correction.

The Editor reserves the right to make literary corrections and to make suggestions to improve brevity.

It is important that authors take care in submitting a manuscript that is written in plain language and adheres to published guidelines (see the new *Fowler's Modern English Usage* 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1996; Hall G.M. *How to write a paper*. London: BMJ Publishing, 1994).

Language: The language of publication is UK English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. An English Language Editing Service is available. Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. Visit our site to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

5.1.	Page	Charge
From the 1st March 2007 all manuscripts submitted are subject to a charge of 100GBP for each page in excess of seven printed journal pages (approximately 21 pages of double-spaced typescript). The editor may decide to waive this charge in exceptional circumstances. Please fill in the <u>Page Charge Form</u> and send it to the Production Editor at ijfs@wiley.com . The invoice will be sent after the article is included in an issue.		

5.2.	Format
Standard Usage, Abbreviations and Units: Spelling and hyphenation should conform to <i>The Concise Oxford English Dictionary</i> . Statistics and measurements should always be given in figures, e.g. 10 min, except when the number begins a sentence. When the number does not refer to a unit of measurement it should be spelt in full unless it is 100 or greater.	

Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is repeated throughout the manuscript, and never in the title. The abbreviated name or expression should be cited in full at first usage, followed by the accepted abbreviation in parentheses.

Metric SI units should generally be used except where they conflict with current practice or are confusing. For example 1.5 l rather than $1.5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, or 3 mm rather than $3 \times 10^{-3} \text{ m}$. Chemical formulae and solutions must specify the form used, e.g. anhydrous or hydrated, and the concentration must be in clearly defined units. Common species names should be followed by the Latin binomial (underlined) at the first mention. For subsequent use the generic name should be contracted to a single letter if it is unambiguous.

Main Text: Text files should be formatted double-spaced with no hyphenation and automatic wordwrap (no hard returns within paragraphs). Please type the text

consistently e.g. take care to distinguish between '1' (one) and 'l' (lower case L) and '0' (zero) and 'O' (capital O), etc.

5.3. Structure

All manuscripts submitted to *The International Journal of Food Science & Technology* should include:

Title Page: The title page should carry an informative title that reflects the content, a running title (less than 46 characters including spaces), the names of the authors, and the place(s) where the work was carried out. The full postal address plus e-mail address of the indicated corresponding author must be given. Up to ten keywords or very brief phrases must be given to aid data retrieval and indexing.

Graphical abstract - Please upload the Graphical Abstract as the first file in the Manuscript. Please ensure that it is clearly sub-titled 'Graphical Abstract.' The Graphical Abstract should be designed to be read on-line in conjunction with the text abstract, it should be approximately square, ideally in colour and should contain a high impact Figure, Graph or Photograph that summarises the key findings of your research.

Summary (or Abstract), used in Original Papers and Reviews: Optimizing Your Abstract for Search Engines
 Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

Well written summaries attract both the general reader and the specialist and greatly improve the impact of your paper. Summaries should give information specific to your article and comprise short punchy sentences with an introduction of one or two sentences followed by comparative data between treatments where interesting effects were observed. This should be followed by concise conclusions.

Summary (or Abstract), used in Original Papers and Reviews: Optimizing Your Abstract for Search Engines
 Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to

be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

Well written summaries attract both the general reader and the specialist and greatly improve the impact of your paper. Summaries should give information specific to your article and comprise short punchy sentences with an introduction of one or two sentences followed by comparative data between treatments where interesting effects were observed. This should be followed by concise conclusions.

Statistical Methods: Statistical methods used should be defined and, where appropriate, supported by references. Useful statistical references are as follows:

Statistical						Textbooks
Cochran,	W.G.,	Cox,	G.M.			(1992).
<i>Experimental</i>	<i>Designs</i> ,	2nd	edn.	New	York:	Wiley.
Cox,	D.R.	(1992).	<i>Planning of Experiments</i> .	New	York:	Wiley.
Draper, N.R.,	Smith, H.	(1998).	<i>Applied Regression Analysis</i> ,	3rd	edn.	New York:
Wiley.						

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1994) *Biometry*, 3rd edn. San Francisco: W.H. Freeman.
 Steel, R.G.D., Torrie J.H., Dickey, D. (1996). *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill.

General		Papers
Chatfield, C. (1985). The initial examination of data. <i>Journal of the Royal Statistical Society</i>	A, 148,	214-253
Preece, D.A. (1987). Good statistical practice. <i>The Statistician</i> ,	36,	397-408.

Repeated	Measures
Kenward, M.G. (1987). A method for comparing profiles of repeated measurements. <i>Applied Statistics</i> ,	36, 296-308.

Acknowledgements: please make these as brief as possible.

5.4.

References

References follow the Harvard system of referencing. References in the text should cite the authors' names followed by the date of their publication, unless there are three or more authors when only the first author's name is quoted followed by *et al.* e.g. Smith *et al.* (1999) or Jones and Smith (2000). Add a, b, c etc. to distinguish

between two or more references with the same author name and year date (e.g. Jones 1999a,b). References at the end of the paper should be listed in alphabetical order with the title of the article or book and the title of the journal given in full, as shown:

Bucky, A. R., Robinson, D.S. & Hayes, P. R. (1987). Enhanced deactivation of bacterial lipases by a modified UHT treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 35-40.

Stone, H. & Sidel, J. L. (1985). *Sensory Evaluation Practices*. Pp. 56-59. Orlando, USA: Academic Press.

Dubois, P. (1983). Volatile phenols in wines. In: *Flavour of Distilled Beverages* (edited by J. R. Piggott). Pp. 110-119. Chichester, UK: Ellis Horwood.

Unpublished work must only be cited where necessary, and only in the text. Copies of references in press in other journals must be supplied with submitted typescripts. It is essential that all citations and references are carefully checked before submission, as mistakes or omissions will cause delays.

References to material on the World Wide Web can be given, but only if the information is available without charge to readers on an official site. Authors will be asked to provide electronic copies of the cited material for inclusion on the *International Journal of Food Science and Technology* homepage at the discretion of the Editors. The format of citations is:

Beckleheimer, J. (1994). Online reference included in article [Internet document] URL http://www.sample_url.bibliography/html. Accessed 01/04/2004.

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be few in number, carefully designed, uncrowded, and include

only essential data. Each must have an Arabic number, e.g. Table 3, a self-explanatory caption and be on a separate sheet. Vertical lines must not be used.

Figures: Figures should be submitted as separate files. Always include a citation in the text for each figure using Arabic numbers, e.g. Fig. 3. Artwork should be submitted online in electronic form. Detailed information on our digital illustration standards is available on the Wiley-Blackwell website [here](#). Approval for reproduction/modification of any material (including figures and tables) published elsewhere should be obtained by the authors/copyright holders before submission of the manuscript. Contributors are responsible for any copyright fee involved.

Preparation of Electronic Figures for Publication
Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it: www.authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Colour Charges: It is the policy of the *International Journal of Food Science & Technology* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be

downloaded as a PDF* from [here](#).

* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Once completed, please return the form to:

The		Production		Editor
International	Journal	of	Food Science	and Technology
John		Wiley		Ltd
9600		Garsington		Rd
Oxford,	OX4		2DQ,	UK
Tel:	+44	(0)	1865	476473
Fax:	+44	(0)	1865	476772

e-mail: ijfs@wiley.com

Any article received with colour work will not be published until the form has been returned.

Figure Legends: Self-explanatory legends of all figures should be included separately under the heading 'Legends to Figures'. In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1. Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

6.2. Early View (Publication prior to Print)

The *International Journal of Food Science & Technology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more. For more substantial information on the services provided for authors, please see [Wiley-Blackwell Author Services](#)

6.4. Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require

the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5. Offprints and Extra Copies
Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG

If you have queries about offprints please e-mail offprint@cosprinters.com

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1. Proof Corrections
The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

6.2. Early View (Publication prior to Print)
 The *International Journal of Food Science & Technology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Author Services
 Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more. For more substantial information on the services provided for authors, please see [Wiley-Blackwell Author Services](#)

6.4. Author Material Archive Policy
 Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5. Offprints and Extra Copies

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_P

G

If you have queries about offprints please e-mail offprint@cosprinters.com

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.