

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO
Aspergillus nidulans **PARA PRODUÇÃO DE MELANINA**
USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

TAÍS SIMONE PRETTI

Araraquara
2009

TAÍS SIMONE PRETTI

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO
Aspergillus nidulans PARA PRODUÇÃO DE MELANINA
USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista,
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

Araraquara
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

P942o	Pretti, Tais Simone Otimização das condições de cultivo do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> para a produção de melanina usando resíduos agro industriais / Tais Simone Pretti. – Araraquara : [s.n], 2009 72 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado 1. Biotecnologia. 2. Resíduos agro industriais. 3. <i>Aspergillus nidulans</i>. I. Título.
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Taís Simone Pretti

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 05/10/1982

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Jaboticabal - SP

Estado Civil: Solteira

Filiação: **Pai:** João Pretti Filho

Mãe: Vera Lúcia do Amaral Souza Pretti

Profissão: Bióloga

Documento de Identidade: 33.677.949-5

Cadastro de Pessoa Física: 223.628.058-08

e-mail: taispretti@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação

Curso: Ciências Biológicas – Centro Universitário de Araraquara

Conclusão: dezembro de 2005.

Pós-Graduação

Nível: Mestrado

Universidade: UNESP – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química

Área: Biotecnologia

Conclusão: julho de 2009

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- ✓ IV Simpósio de Microbiologia Aplicada – Rio Claro, 2009.
- ✓ III Encontro Nacional de Pós-Graduação em Microbiologia, Jaboticabal, 2008.
- ✓ 60ª Reunião Anual da SBPC, Campinas, 2008.
- ✓ V Fórum de Microbiologia, Jaboticabal, 2004.

PRETTI, T. S.; MARQUES, M. P.; CAPORALIN, J. B.; LEITE, C. A.; SPONCHIADO, S. R. P. Uso de resíduos industriais como substrato para a produção de melanina por *Aspergillus nidulans*. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada. **Resumos**, 2009.

CAPORALIN, J. B.; CAPORALIN, C. B.; LEITE, C. A.; PRETTI, T. S.; MARQUES, M. P.; BERLINK, R. G. S.; SPONCHIADO, S. R. P. Potencial aplicação de fungos marinhos para a concentração e recuperação de metais terras-raras. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada. **Resumos**, 2009.

LEITE, C. A.; GONÇALVES, R. C. R.; PRETTI, T. S.; MARQUES, M. P.; CAPORALIN, J. B.; BERLINK, R. G. S.; SPONCHIADO, S. R. P. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Aspergillus terreus* obtidos em diferentes condições de cultivo. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada. **Resumos**, 2009.

MARQUES, M. P.; PRETTI, T. S.; LEITE, C. A.; CAPORALIN, J. B.; SPONCHIADO, S. R. P. Avaliação da hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar por fungos filamentosos. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada. **Resumos**, 2009.

PRETTI, T. S.; SPONCHIADO, S. R. P. Água de maceração de milho como fonte de nitrogênio para a produção de melanina pelo fungo *Aspergillus nidulans*. In: III Encontro Nacional de Pós-Graduação em Microbiologia, **Resumos**, 2008.

PRETTI, T. S.; MARQUES, M. P.; SPONCHIADO, S. R. P. Influência do tempo de cultivo e do volume de meio de cultura na produção de pigmento melanina por *Aspergillus nidulans*. In: 60ª Reunião Anual da SBPC, **Resumos**, 2008.

PRETTI, T.S. Atividade Antagônica da Microbiota Fúngica sobre Fungos Entomopatogênicos encontrados no solo. In: V Fórum de Microbiologia, **Resumos**, 2004.

**"QUE O SENHOR VOLTE OS OLHOS PARA TI E TE DÊ TUA PAZ.
QUE O SENHOR TE ABENÇOE"**

SÃO FRANCISCO DE ASSIS

Acima de tudo, dedico este trabalho a *Deus*,
pela sua presença constante e suas bênçãos em
minha vida, e suas lições em minhas caminhadas.

"FAMÍLIA: ALICERCE DA VIDA..."

Aos meus pais *João e Vera*, e minhas
irmãs *Taciana e Liziane*, pelo grande
incentivo, apoio, amor e carinho
dedicados a mim.

Amo vocês!

***"CADA QUAL SABE AMAR A SEU MODO; O MODO, POUCO IMPORTA, O
ESSENCIAL É QUE SE SAIBA AMAR"***

MACHADO DE ASSIS

Ao meu grande amor e companheiro *Marcos*, por todo o seu amor, carinho, amizade e dedicação em todos estes anos juntos. E também, por todo o apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Amo você!

***"O SABER SE APRENDE COM OS MESTRES. A SABEDORIA, SÓ COM O
CORRIQUEIRO DA VIDA"***

CORA CORALINA

À minha orientadora *Sandra*, pela oportunidade, paciência e por tudo que me ensinou. Acima de tudo por ser uma pessoa compreensiva, ética e amiga.

Muito obrigada por tudo!

"O VALOR DAS COISAS NÃO ESTÁ NO TEMPO EM QUE ELAS DURAM, MAS NA INTENSIDADE COM QUE ACONTECEM. POR ISSO EXISTEM MOMENTOS INESQUECÍVEIS, COISAS INEXPLICÁVEIS E PESSOAS INCOMPARÁVEIS"

FERNANDO PESSOA

Aqui nesta página, quero deixar os meus mais sinceros agradecimentos àquelas pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Fátima**, uma pessoa como poucas que eu já conheci que se tornou muito importante na minha vida. Uma amiga, sempre disposta a ajudar no possível e no impossível sempre tratando a todos com muito carinho, dedicação e com uma enorme bondade. Dizer que ela é uma pessoa muito especial é pouco, posso dizer que ela foi um presente de Deus. Muito obrigada por tudo.

A uma pessoa que conquistou minha amizade com seu jeito sincero e divertido, minha amiga **Marina**. Ela que muito me ajudou na realização deste trabalho, dividimos metodologias, problemas, medos, ansiedades, e muitos momentos felizes.... sem dúvida posso dizer que nossa amizade é verdadeira e que ela nunca se apagará mesmo com a distância.

À **Juliana e Carol**, pela amizade, grandiosa ajuda intelectual e prática no desenrolar deste trabalho. Pelos conselhos, apoio, incentivo e por todos os momentos felizes e descontraídos que passamos juntas.

À **Carla e André**, pela amizade, apoio, carinho, e incentivo no desenvolvimento deste trabalho, e também por todos os momentos que vivemos.

Ao **Waldenir**, pela sua enorme ajuda sempre disposto a colaborar, mesmo criticando sempre dava uma "forcinha"..... não posso deixar de agradecer pelos infindáveis momentos de descontração que serão sempre lembrados, os "apelidos carinhosos", as conversas, enfim, todos os momentos que convivemos.

Ao **Gustavo, Wanessa, Ana Paula e Fabi**, pela amizade, carinho, apoio e disposição em ajudar.

Aos técnicos **Tarcisio, Zilda, Telma e Fernando**, pela valiosa ajuda, pela amizade conquistada e por todo o carinho que sempre me trataram.

À estagiária **Rogéria**, que muito me auxiliou no curto período em que estive no laboratório, tempo pequeno, mas que fez nascer uma grande amizade que será sempre lembrada.

Agradecimentos

Aos professores **Dr. Oswaldo** e **Dra. Maria Célia**, pela disponibilidade em utilizar os equipamentos.

À Seção de Pós-graduação, **Célia**, **Sandra**, **Wennia** e **Patrícia**, por sempre estarem dispostas a esclarecer todas as dúvidas, pelo apoio, e carinho com que sempre me trataram.

À minha grande amiga **Natália**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, sempre me ajudando e apoiando. Muito obrigada por tudo.

A **CAPES** pela bolsa concedida.

***"A MELHOR OBRA É AQUELA
QUE SE REALIZA SEM A PREOCUPAÇÃO DE ÊXITO IMEDIATO; E O MAIS
GLORIOSO ESFORÇO É AQUELE EM QUE SE PÕEM AS ESPERANÇAS
MAIS ALÉM O HORIZONTE VISÍVEL"***

JOSÉ HERQUE RODÓ

RESUMO

Devido ao crescente interesse na produção de substâncias ativas a partir de fontes naturais, os fungos vêm sendo considerados um grupo importante de microrganismos em função do seu enorme potencial de exploração, representando uma fonte inesgotável para a obtenção de vários produtos biotecnológicos industriais. Dentre estes produtos, o pigmento melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans* tem considerável potencial biotecnológico para ser usado em formulações cosméticas, principalmente pelas suas atividades antioxidante, antiinflamatória e fotoprotetora. No entanto, para uma possível aplicação prática desta substância é necessário estabelecer as condições ótimas de cultivo do fungo para a produção em larga escala com um custo menor comparado à melanina sintética. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do volume de meio de cultura, do tempo de incubação e da utilização de resíduos industriais (água de maceração de milho, bagaço de cana de açúcar e melaço) como fontes de nutrientes no crescimento e produção de pigmento pelas linhagens MEL1 e MEL2 de *Aspergillus nidulans*. Os resultados mostraram que na presença de 2% de água de maceração de milho o crescimento celular foi maior enquanto que na concentração de 0,2% houve um aumento na produção de pigmento pelas linhagens em estudo. Quando melaço (1% e 10%) foi usado como fonte de carbono, a produção de pigmento foi inibida em ambas as concentrações, enquanto um alto rendimento de biomassa foi obtido com 10% de melaço. A suplementação do meio com hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar não teve um efeito positivo na produção de pigmento, embora tenha proporcionado um aumento no crescimento das linhagens. Também foi observado que a morfologia do fungo (tamanho do “pellet”) influencia a produção de pigmento, sendo que na cultura com “pellets” menores obteve-se altos níveis de pigmento. Então, os resultados obtidos sugerem que a água de maceração de milho contém substâncias que estimulam a síntese do pigmento e, portanto o cultivo em 200 mL de meio mínimo contendo nitrato (0,6%), glicose (1%) e suplementado com água de maceração de milho (0,2%) por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação, representa um meio fermentativo de baixo custo para uma máxima produção de pigmento pelas linhagens MEL1 e MEL2 de *Aspergillus nidulans*.

ABSTRACT

Due to an increasing interest in the production of actives substances from natural sources, fungi has been considered an important group of microorganisms in function of its enormous potential for exploitation, representing an inexhaustible source to obtain several industrials biotechnology products. Among these products, the melanin pigment produced by fungi *Aspergillus nidulans* has considerable biotechnological potential to be used in cosmetic formulations, mainly for its antioxidant, anti-inflammatory and photoprotetor activities. However, for a possible practical application of this substance, is necessary to establish the optimal conditions of the fungal culture for large scale production with low cost compared to synthetic melanin. In this context, the objective of this work was to evaluate the influence of volume of culture medium, period of incubation and the use of by-products industrial (corn steep liquor, sugar cane bagasse and molasses) as nutritional source on growth and pigment production by strains MEL 1 and MEL 2 from *Aspergillus nidulans*. The results showed that, in the presence of 2% corn steep liquor, the cell growth was high while at concentration of 0,2% occurred an increase in the pigment production. When molasses (1 or 10%) was used as carbon sources, the pigment production was inhibited in both concentrations while a high yield of biomass was obtained with 10% molasses. The supplementation of medium with sugar cane bagasse hydrolysate didn't has a positive effect on pigment production but it provided an increase in the fungal growth. Also was observed that the fungal morphology (pellet size) influenced the production of pigment, being the smaller "pellets" more suitable for maximum production of the pigment. Thus, the results obtained suggest that corn steep liquor contain substances that stimulate the synthesis of pigment and thus the cultivation with 200mL minimum medium containing nitrate (0,6%), glucose (1%) and supplemented with corn steep liquor (0,2%) represents a low cost fermentation medium for the maximum pigment production by MEL1 and MEL2 strains from *Aspergillus nidulans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento das linhagens MEL 1 e MEL 2 do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> em meio sólido (A) e em meio líquido (B)	33
Figura 2 - Curva de referência da glicose para determinação da concentração de açúcar redutor	40
Figura 3 - Curva de referência do fenol	41
Figura 4 - Extração do pigmento melanina intra e extracelular da cultura do fungo	43
Figura 5 - Linhagem MEL 1 cultivada em 100 mL e 200 mL de meio mínimo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das mutações presentes nas linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas neste trabalho	34
Tabela 2 - Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> em 100 e 200 mL de meio mínimo contendo glicose (1%) e nitrato (0,6%), incubados por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm	46
Tabela 3 - Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> durante 5 e 10 dias de cultivo, em 200 mL de meio mínimo contendo glicose (1%) e nitrato (0,6%), à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm	49
Tabela 4 – Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 em meio mínimo contendo AMM (0,2% ou 2%), nitrato (0,6%) e glicose (1%), durante 5 dias de incubação à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm	51
Tabela 5 – Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 em meio mínimo contendo AMM (0,2% ou 2%), nitrato (0,6%) e glicose (1%), durante 10 dias de incubação à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm	52
Tabela 6 – Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo da linhagem MEL 1 crescida em meio contendo peptona (0,4%), nitrato (0,6%), água de maceração de milho (0,2%) e glicose (1%), mantidas em incubação por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm	55
Tabela 7 – Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL1 e MEL2 em meio contendo melaço (1 ou 10%) e nitrato (0,6%), durante 5 dias de incubação à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm	56

- Tabela 8** – Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL1 e MEL2 em meio com melaço 1% e 10 %%, AMM 0,2% e nitrato (0,6%), durante 5 dias de incubação a temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm 59
- Tabela 9** – Crescimento e produção de pigmento após cultivo da linhagem MEL1 em meio contendo 200 mL do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar (H.B.C.A.), AMM 0,2%, nitrato 0,6%, glicose 1% e solução de sais, por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm 60
- Tabela 10** – Crescimento e produção de pigmento após cultivo da linhagem MEL1 em meio com o hidrolisado da cana-de-açúcar (H.B.C.A.), AMM 0,2%, nitrato 0,6%, glicose (1%) e solução de sais, por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm 61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Materiais.....	32
3.1.a. Microrganismos.....	32
3.1.b. Meios de cultura.....	34
3.1.c. Suspensão de conídios.....	35
3.2. Métodos.....	36
3.2.a. Crescimento em frascos agitados.....	36
3.2.b. Influência da Água de Maceração de Milho (AMM).....	36
3.2.c. Influência da Peptona.....	37
3.2.d. Influência do melaço da cana-de-açúcar.....	37
3.2.e. Influência do bagaço da cana-de-açúcar.....	38
3.2.f. Quantificação de crescimento.....	39
3.2.g. Determinação de açúcar residual.....	40
3.2.h. Determinação de Fenol.....	41
3.2.i. Extração total do pigmento.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Volume de meio de cultura.....	45
4.2. Tempo de cultivo.....	48
4.3. Utilização de resíduos agroindustriais como fontes de nutrientes.....	50
4.3.1. Água de Maceração de Milho (AMM).....	51
4.3.2. Água de Maceração de Milho (AMM) e peptona.....	54
4.3.3. Melaço da cana-de-açúcar	56
4.3.4. Melaço e Água de Maceração de Milho.....	58
4.3.5. Hidrolisado do Bagaço da cana-de-açúcar.....	60
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos representam um importante grupo de microrganismos que atuam como agentes primários da decomposição do ciclo de carbono, nitrogênio e outros nutrientes na biosfera, podendo agir também de maneira prejudicial na deterioração de materiais e produtos e/ou como responsáveis por sérias doenças em plantas e animais, inclusive em seres humanos, através de seu ataque direto por invasão, ou indiretamente pela secreção de toxinas (GRIFFIN, 1994; PELCZAR et al., 1996). Além disso, os fungos apresentam uma grande diversidade genética e metabólica sendo considerado um dos grupos mais importantes pelo seu enorme potencial de exploração. Estes organismos são freqüentemente empregados em processos biotecnológicos industriais para a produção de substâncias como os antibióticos, alimentos, bebidas, ácidos orgânicos, álcool combustível e enzimas, onde várias delas podem apresentar diversas atividades biológicas e farmacêuticas incluindo antimicrobiana, antiinflamatória, imunoestimulação, antitumorais entre outras (BENNETT, 1998; PARK et al., 2001; GRIM et al., 2005; XU et al., 2006).

O crescente interesse na utilização de microrganismos para a produção de substâncias de interesse industrial é devido ao alto custo de produção por síntese química e a procura por produtos mais seguros. Vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de processos para a produção de pigmentos a partir de fontes naturais, por causa dos sérios problemas de segurança com muitos corantes sintéticos artificiais, os quais são amplamente utilizados em alimentos, fármacos e cosméticos (CHO et al., 2002).

Pigmentos produzidos pelos fungos têm sido utilizados em diferentes aplicações, como por exemplo, o pigmento vermelho produzido pelo *Monascus purpureus* o qual é muito utilizado no

preparo de arroz, vinho, queijo e peixe na tradicional culinária japonesa e chinesa; o pigmento carotenóide astaxantina produzido por *Phaffia rhodozyma* que é responsável pela coloração da carne do salmão; a produção de β -caroteno (precursor da vitamina A) por *Blakeslea trispora* que tem sido utilizado em produtos alimentícios (ADRIO; DEMAIN, 2003). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que o pigmento melanina produzido por *Aspergillus nidulans* apresenta atividade antiinflamatória sendo capaz de suprimir a produção de óxido nítrico, uma molécula efetora liberada pelos macrófagos após ativação imunológica (GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2007).

A melanina produzida por diversos fungos, incluindo o *Aspergillus nidulans*, pode estar incorporada na parede celular de esporos e hifas, denominada melanina intracelular, como também pode estar presente no meio de cultura referida como melanina extracelular (FOGARTY; TOBIN, 1996; BUTLER; DAY, 1998; PLONKA; GRABACKA, 2006). Este pigmento é formado durante o metabolismo secundário do fungo a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, associado ao processo de esporulação do microrganismo, sendo requerido para a formação ou integridade de esporos sexual e assexual. Vários estudos têm mostrado que o pigmento melanina confere ao fungo proteção contra a radiação ultravioleta, ação de enzimas líticas, dissecação, extremos de temperatura e outras condições ambientais adversas, aumentando o período de vida e a capacidade de competição por alimento em certos ambientes (FOGARTY; TOBIN, 1996; BUTLER; DAY, 1998; 2005). Gómez et al., (2001) observaram que células melanizadas de *Cryptococcus neoformans* eram menos susceptíveis aos danos causados pela luz UV, fagocitose mediada por macrófagos, peptídeos antimicrobianos, toxicidade por metais pesados e a drogas como a anfotericina B, comparado com células não melanizadas. A produção de melanina também tem sido estudada em fungos patogênicos, onde o pigmento não contribui apenas para a sobrevivência do esporo do fungo, mas também é um

importante fator de virulência, pois mutantes deficientes em melanina não são virulentos, uma vez que a melanização do apressório representa o seu único meio de invadir a superfície do hospedeiro e estabelecer a infecção (HENSON; BUTLER; DAY, 1999; CALVO, et al., 2002).

A capacidade da melanina em aumentar a sobrevivência dos fungos em condições desfavoráveis pode ser atribuída à sua função como um tampão redox extracelular, neutralizando os oxidantes gerados nestas condições (JACOBSON, 2000). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a melanina extraída do fungo *A. nidulans* é capaz de neutralizar os radicais gerados pelo ácido hipocloroso (HOCl), considerado um dos oxidantes biológicos mais abundante e tóxico da célula, apresentando uma magnitude de proteção comparável a melanina sintética (GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005).

Devido às várias atividades biológicas descritas, a melanina apresenta potencial biotecnológico para ser utilizada como matéria-prima farmacêutica, além de representar uma opção mais viável do ponto de vista econômico, pois sua produção em larga escala pode ser feita a um custo menor comparado ao da melanina sintética. No entanto, para viabilizar uma aplicação prática desta substância torna-se necessário o estabelecimento das condições ótimas de cultivo do fungo para que tenha a capacidade de produzi-la com altos rendimentos.

O conhecimento dos vários fatores que afetam o metabolismo dos microrganismos é importante não apenas quando considerados os aspectos industriais, mas também para os estudos de regulação do metabolismo e mecanismos de expressão gênica

Vários trabalhos têm mostrado que a via biossintética para a produção de pigmentos em fungos é diretamente afetada pelos parâmetros nutricionais e ambientais de cultivo, como composição do meio de cultura, pH, concentração de nutrientes, agitação, taxa de diluição e temperatura (CHASKES; TYNDALL 1975; CHEN; JOHNS, 1993; GRIFFIN, 1994; HAMDI et al., 1997; HAJJAJ

et al., 2002; TSENG; CHEN; LIN, 2000; CHO et al., 2002). Isto ocorre porque após a inoculação de um fungo no meio de cultura, a composição deste meio, a concentração de biomassa e metabólitos muda constantemente como resultado do metabolismo das células em função do crescimento do microrganismo.

O volume de meio de cultura presente em frascos é um fator importante a ser considerado, pois determina a quantidade de oxigênio disponível para a cultura podendo prejudicar o crescimento de microrganismos aeróbicos e, conseqüentemente a produção de metabólitos secundários. Segundo Han; Mudgett (1992), o nível de oxigênio no ambiente parece influenciar significativamente a produção de pigmento em *Monascus*. Também foi verificado por Lee et al. (1995) que uma menor concentração de oxigênio dissolvido pode inibir a produção de pigmento pelo fungo *Monascus* em fermentação submersa, pois em alta concentração de amido a viscosidade do meio aumentou o que levou a uma diminuição da produtividade de pigmento e formação de biomassa. Hajjaj et al. (2000) observaram que agitação e aeração eram parâmetros que influenciavam fortemente o crescimento e a produção de metabólitos secundários em *Monascus ruber*, sendo que a produção de pigmento foi inibida em cultura sob condições anaeróbicas. Estudos em nosso laboratório mostraram que a produção de pigmento melanina por *Aspergillus nidulans* só ocorreu quando o fungo cresceu sob agitação, pois em culturas não agitadas nenhum pigmento foi produzido (LISBOA, 2003).

A transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida em cultivos de fungos filamentosos enfrenta resistências físicas devido à geração de caldos mais viscosos em função do tempo de cultivo (ROSA, 2002 In: CERRI, 2005). A fase de crescimento do fungo está relacionada ao consumo de oxigênio e a viscosidade do meio, pois durante seu crescimento, a viscosidade do meio aumenta rapidamente junto com o crescimento exponencial do organismo e a formação de massa micelial. Quando os organismos entram na fase estacionária a viscosidade do meio diminui, fazendo

com que aumente a transferência de oxigênio para o meio (SINHA et al., 2001). O aumento da viscosidade do fluido, o qual é determinado pela diminuição do nível de oxigênio dissolvido, provavelmente reduz a transferência de oxigênio para a massa micelial e limita o aumento da biomassa ou de metabólitos secundários (XIAO et al., 2004). Paul; Priede; Thomas (1999), descreveram que em fermentação submersa de *Aspergillus niger*, a alta concentração de células pode alterar as propriedades reológicas do meio, criando alta viscosidade, o que pode levar à limitação do oxigênio resultando em baixa produtividade de ácido cítrico. Goksungur; Mantzouridou; Roukas (2002) relataram que baixos rendimentos na produção de pigmento carotenóide por *Blakeslea trispora* pode ser devido à alta viscosidade do meio que provavelmente limitou a transferência de oxigênio. Portanto, várias evidências sugerem que para um aumento na produção de metabólitos secundários é necessário uma diminuição da viscosidade do meio e como consequência um aumento da transferência de oxigênio (SINHA et al., 2001).

A morfologia do fungo também é considerada um fator importante na produção de metabólitos secundários, pois a forma de crescimento do fungo em cultura submersa (“pellets” ou filamentosa) afeta as propriedades reológicas do meio e como consequência a produtividade do processo. Quando o fungo cresce na forma filamentosa, o meio torna-se mais viscoso o que dificulta a transferência de nutrientes e oxigênio para as células. Deste modo, o crescimento na forma de “pellets” apresenta-se mais vantajoso devido à baixa viscosidade, o que favorece uma melhor homogeneidade dos componentes do meio com baixa agitação, tornando o processo mais econômico (PAZOUKI; PANDA, 2000; PAPAGIANINI, 2004). No entanto, não é possível estabelecer uma correlação simples entre morfologia do fungo e produtividade considerando que muitos parâmetros como tipo e concentração da fonte de carbono, níveis de nitrogênio e fosfato, minerais, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono, pH, temperatura, velocidade de agitação, aeração, sistema de fermentação, promovem

alterações morfológicas durante o crescimento do fungo em cultura submersa (PAPAGIANINI, 2004; GRIM et al., 2005). Paul; Priede; Thomas (1999) verificaram que maiores rendimentos de ácido cítrico foram obtidos quando o fungo *Aspergillus niger* apresentou uma morfologia de micélio dispersos comparada com a forma de “pellets”. Bae et al., 2001 observaram que “pellet” compacto foi mais favorável a produção de exo-biopolímeros por *Paecilomyces japonica*, sendo que esta morfologia foi obtida em meio contendo maltose. Sinha et al., (2001) também observaram que a concentração de sacarose (como fonte de carbono) afeta a morfologia deste fungo, o tamanho do “pellet” e as propriedades reológicas do meio e, como consequência, influencia a produção de exo-biopolímero por *Paecilomyces japonica*. Vários estudos têm mostrado que o tamanho do “pellet” também pode afetar o rendimento de metabólitos, pois nos “pellets” maiores há limitação de nutriente e oxigênio no seu interior, o que afeta o metabolismo celular e a síntese de produtos (PAZOUKI; PANDA, 2000). Feng et al. (2004) observaram que “pellets” grandes (2,6 mm) ou pequenos (1,7 mm) resultavam em baixa produção de destruxina B por *Metarhizium anisopliae*, sendo que o tamanho mais apropriado foi de 2,0mm. Assim, em cada processo fermentativo deve ser estabelecida a morfologia mais apropriada para a produção máxima do metabólito de interesse.

A natureza e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio também interferem no metabolismo do microrganismo, em relação à proliferação celular (trofofase) e à formação do produto (idiofase), os quais na maioria dos casos são fenômenos separados e cada um tem suas condições favoráveis (SINHA et al., 2001, BARBOSA et al., 2004). Tseng; Chen; Lin (2000) relataram que frutose foi a fonte de carbono mais favorável para o crescimento micelial e a produção de pigmento por *Monascus purpureus*, seguida de glicose e maltose, enquanto que na presença de sacarose e lactose o crescimento e a produção de pigmento foram muito baixas. Cho et al. (2002), estudando a produção de pigmento vermelho em cultura submersa de *Paecilomyces sinclairii* observaram que a máxima

produção de pigmento foi obtida em amido solúvel e peptona de carne, respectivamente fontes de carbono e nitrogênio. Pitlovanciv et al. (2006), testando as condições de cultivo adequadas à maior produção de violaceína por *Cromobacterium violaceum*, observaram que a produção de pigmento é dependente da fonte de carbono utilizada, sendo desfavorecida quando a fonte de carbono é a glicose e a frutose, porém estimulada em presença de glicerol. Pois, como este pigmento é um metabólito secundário sua produção é inibida pela presença de fontes de carbono com alto rendimento energético, tal como a glicose e frutose. O que também foi observado na síntese de melanina por *Cryptococcus neoformans*, a qual foi reprimida sob altas concentrações de glicose (NURUDEEN; AHEARN, 1979). Sinha et al. (2001) relataram que a produção de exo-biopolímero por *Paecilomyces japonica* foi afetada pela concentração de sacarose, sendo que 40g/L foi considerada a mais adequada para a produção máxima do biopolímero.

Em relação ao metabolismo do nitrogênio, a maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico, sob a forma de sais como o nitrato ou amônia, em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados, como aminoácidos encontrados em proteínas (COLEN, 2006). Da mesma maneira como acontece com a fonte de carbono, a produção de metabólitos secundários é negativamente afetada pelas fontes de nitrogênio, como os compostos inorgânicos, que são preferencialmente utilizados e que propiciam rápido crescimento, sendo consideradas fontes primárias. Segundo Griffin (1994), estas fontes de nitrogênio que são rapidamente metabolizadas, frequentemente reprimem ou inibem o metabolismo secundário, sendo que ele não começa enquanto a fonte adequada ao crescimento estiver sendo consumida. Assim, a intensidade de pigmentação obtida com uma específica fonte de nitrogênio não está necessariamente correlacionada com a capacidade desta fonte de promover o crescimento, sendo que compostos orgânicos que são lentamente assimilados podem ser usados como uma fonte de nitrogênio para estimular uma alta produção de metabólitos secundários

(NURUDEEN; AHEARN, 1979; ADRIO; DEMAINE, 2003). Martinková; Júzlová; Vesely (1995) mostraram que a produção de pigmento pelo fungo *Monascus purpureus* depende do tipo de fonte de nitrogênio utilizada em seu cultivo, observando que a utilização de aminoácidos, peptídeos ou proteínas como fontes de nitrogênio, propiciam a formação de pigmentos que possui atividade biológica. Chen; Johns, (1993), avaliando o efeito das fontes de nitrogênio na produção de pigmento por *M. purpureus*, observaram que em meio contendo peptona como fonte de nitrogênio, obtêve-se uma maior produção de pigmento, comparado com nitrato e amônia. Tseng; Chen; Lin (2000) observaram que baixas concentrações de nitrito de sódio ($< 0.2 \text{ g l}^{-1}$) promoveram crescimento micelial e produção de pigmento por *Monascus purpureus*. Bae et al. (2000) observaram que maltose e extrato de levedura foram, respectivamente, as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a máxima produção de exopolímeros por *Paecilomyces japonica*. Cho et al. (2002), estudando a produção de pigmento vermelho por *P. sinclarii*, também observaram que peptona de carne, de caseína e uma mistura de peptona e extrato de levedura tiveram um efeito positivo na produção de pigmento, enquanto peptona de soja e extrato de malte inibiram sua síntese. Assim, o tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio são fatores importantes para a produção de metabólitos secundários, pois influenciam o crescimento, a morfologia do fungo, como também as propriedades reológicas do meio.

Em processos industriais, a otimização do cultivo do fungo para se obter a substância desejada em quantidade satisfatória deve levar em conta também às limitações de ordem técnica e econômica. Para a produção em larga escala de substâncias de interesse biotecnológico deve-se utilizar meios de cultivo com baixo custo, pois este é um fator crítico na determinação de processos de fermentação economicamente viáveis (XIAO et al., 2004; COLEN, 2006).

Subprodutos da indústria como a água de maceração de milho (AMM), melaço, vinhaça e bagaço de cana, soro do queijo, as tortas oleaginosas como amendoim, algodão, mamona, e os resíduos

de usinas de beneficiamento de grãos, podem ser usados como meios de cultura em processos fermentativos por apresentarem uma composição rica em nutrientes, principalmente fontes de carbono e nitrogênio, e também por serem de baixo preço (SCHMIDELL, 2001 In; HAMANO; KILIKIAN, 2006). A utilização destes subprodutos também contribui para a preservação do meio ambiente, pois minimiza os problemas gerados pelo descarte destes resíduos.

A água de maceração de milho é um subproduto obtido da indústria de moagem do milho, sendo considerada uma fonte de nutriente satisfatória para o crescimento de microrganismos, pois apresenta em sua composição aminoácidos livres, pequenos peptídeos, altos níveis de vitaminas, carboidratos, minerais, metais, vitaminas e fosfatos (STANBURY; WITAKER, 1984). Segundo Schroeder (1966), a água de maceração de milho é um excelente suplemento para o meio definido (Czapek's), pois contém substâncias que estimulam o crescimento micelial e a produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus*. Hamano; Kilikian (2006) relataram que uma maior produção de pigmento por *Monascus ruber* foi obtida em meio contendo glicose, água de maceração de milho e glutamato monossódico. Kalingan; Krishnan (1997) mostraram que a adição de água de maceração de milho aumentou a taxa de crescimento em 4% de *Eremothecium ashbyii* e em mais de 50% a produção de riboflavina. Segundo Goksungur; Mantzouridou; Roukas (2002), a concentração de β -caroteno produzido por *Blakeslea trispora* aumentou com a adição de água de maceração de milho no meio de cultura. Durante o cultivo de *Candida krusei*, Liu; Liu; Xie (2002) observaram que a utilização de AMM promoveu um aumento na produção de glicerol bem como da taxa de crescimento celular, da concentração final de biomassa e da taxa de consumo de glicose, proporcional à concentração de água de maceração usada. A água de maceração de milho também tem sido utilizada em processos fermentativos para a produção de penicilina por *Penicillium chrisogenum* (LIGGET; KOFFLER,

1948), etanol por *Zymomonas mobilis* (SILVEIRA et al., 2002), ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* (RIVAS et al., 2004), e proteases (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Outro subproduto da agroindústria é o melaço obtido do processo de produção de açúcar, tanto da beterraba quanto da cana-de-açúcar, muito utilizado em processos fermentativos, como a produção de etanol, pois possui em sua composição grande quantidade de açúcares fermentescíveis, sendo utilizado como fonte de carbono para o metabolismo microbiano (JIMENEZ; BORJA; MARTÍN, 2004; CAZETTA; CELLIGOI, 2005; BERWANGER et al, 2007). De acordo com Litchfield (1996), o melaço de cana-de-açúcar apresenta em sua composição 17% de água, 66% de açúcares, sendo 16% de açúcares redutores (glicose e frutose) e 50% de sacarose; 8% de cinzas, 4% de matéria nitrogenada e 5% de metais. Devido a sua composição rica em açúcares fermentescíveis, seu baixo custo e alta disponibilidade no território brasileiro, uma vez que cerca de 17,9 milhões de toneladas são produzidos por ano no Brasil durante fabricação do açúcar, o melaço de cana-de-açúcar é sugerido como substrato para melhorar e reduzir custos na produção de substâncias de interesse biotecnológicos (HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003). Foi observado por Oliveira; Buzato; Haully (2005) que o melaço da cana-de-açúcar (previamente tratado com invertase) suplementado com extrato de levedura e peptona, mostrou ser um meio de cultivo economicamente viável para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Haully; Oliveira; Oliveira (2003), que verificaram a necessidade de suplementação do melaço com uma fonte de nitrogênio, como o extrato de levedura para melhorar a produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas. Bhosale; Gadre (2001), também observaram que quando o meio de melaço foi suplementado com extrato de levedura, houve um aumento de 30% no conteúdo de β -caroteno por *Rhodotorula glutinis*. De acordo com Goksungur; Mantzouridou; Roukas (2002), a adição de água de maceração de milho ao meio contendo melaço aumentou significativamente a concentração de β -caroteno por *Blakeslea*

trispora. A produção de ácido succínico por *Escherichia coli* teve um aumento de 0,8 a 1,53 gL⁻¹ após 60 horas de crescimento em meio contendo melaço de cana comparado ao meio com glicose, provavelmente porque o melaço contém várias substâncias como vitaminas, compostos nitrogenados e elementos traços, os quais são essenciais para a produção de ácido succínico (AGARWAL et al., 2006).

O bagaço da cana-de-açúcar, que é também um resíduo agroindustrial, tem sido muito utilizado como substrato em processos fermentativos para a obtenção de bioprodutos, pois sua fração hemicelulósica é rica em carboidratos fermentescíveis e porque eles constituem reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades (TAMANINI; HAULY; 2004). No Brasil, cada tonelada de cana-de-açúcar gera 180-280 Kg de resíduos de bagaço, o qual representa um excesso anual de 5-12 milhões de toneladas (PESSOA; MANCILHA; SATO, 1997). Este resíduo é mais comumente utilizado como combustível em caldeiras para a produção de energia elétrica, e como suplemento para ração animal. No entanto, estes processos não necessitam de grandes quantidades de bagaço, o que significa que nem todo o resíduo gerado pelas usinas é utilizado. Desta maneira, o uso do bagaço para a produção de bioprodutos, como enzimas, álcool combustível, xilitol, agrega um enorme valor a este material, trazendo benefícios ecológicos e econômicos (PESSOA; MANCILHA; SATO, 1997; PANDEY et al., 2000).

Devido à sua natureza polissacarídica, o bagaço precisa ser hidrolisado a monômeros para ser utilizado pelos microrganismos. Dentre vários métodos de hidrólise do bagaço, o mais utilizado é o tratamento ácido, o qual resulta em um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis (PESSOA; MANCILHA; SATO, 1997). Porém, este processo também leva a formação de compostos tóxicos provenientes da degradação de pentoses e hexoses (como o furfural e hidroximetilfurfural), ou da lignina (como os compostos aromáticos, fenólicos e aldeídicos), os quais podem agir como inibidores do crescimento microbiano (TAMANINI; HAULY; 2004). Por outro lado, os compostos fenólicos

presentes no hidrolisado podem representar um substrato para a produção de metabólitos secundários, como a melanina. Este pigmento é sintetizado através da oxidação de compostos fenólicos e indólicos pela enzima fenoloxidase até a formação de compostos coloridos de alto peso molecular (BUTLER; DAY; 1998). Shaw; Kapica (1972) verificaram que a produção de pigmento melanina por *Cryptococcus neofarmans* somente ocorre quando este fungo cresce em meio contendo compostos fenólicos como ácido clorogênico, dopamina, L-3,4-dihidroxyphenylalanina (L-DOPA) catecol, pois estes representam os substratos da fenoloxidase. KIM et al. (2004) também mostraram que o fenol é um fator determinante na produção de pigmento carotenóide por *Rhodotorula glutinis* K-501, pois o conteúdo de β -caroteno aumentou 35% quando 500 ppm de fenol foi adicionado ao meio de cultura.

Assim, verifica-se que estes subprodutos da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido apresentados como possíveis substitutos dos componentes energéticos presentes nos meios de cultivo dos microrganismos devido a sua alta disponibilidade, representando uma fonte alternativa de baixo valor comercial, e também por minimizarem os problemas ambientais causados pelo descarte desses resíduos (WOICIECHOWSKI, 2001 In: BERWANGER et al, 2007).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A melanina extraída de fungos tornou-se biotecnologicamente atraente, principalmente como matéria-prima cosmética, em função da sua atividade antioxidante e fotoprotetora, protegendo a pele contra os danos oxidativos gerados pela radiação. No entanto, para produzi-la em escala industrial em um processo economicamente viável é necessário otimizar as condições de cultivo do fungo usando fontes alternativas de nutrientes de baixo custo como os resíduos industriais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer as condições ótimas de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans*, em relação ao volume de meio de cultura nos frascos, o tempo de crescimento do fungo e a utilização de subprodutos da indústria (como a água de maceração de milho) e/ou resíduos agroindustriais (como o melaço e bagaço da cana-de-açúcar) e de uma fonte orgânica de nutriente (peptona) para a produção máxima de pigmento.

Os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir no sentido de encontrar alternativas para a redução de custos no processo de produção, em escala industrial, da melanina do fungo *A. nidulans*, tornando-a viável economicamente para futuras aplicações farmacológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.a. Microrganismo

O presente trabalho foi realizado com as linhagens do fungo *Aspergillus nidulans*, denominadas MEL 1 e MEL 2, obtidas por Pombeiro (1991) usando o agente mutagênico 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO). Estes mutantes apresentam produção aumentada do pigmento melanina intracelular (presente no micélio) e extracelular (presente no meio de cultura), como pode ser visto na figura 1.

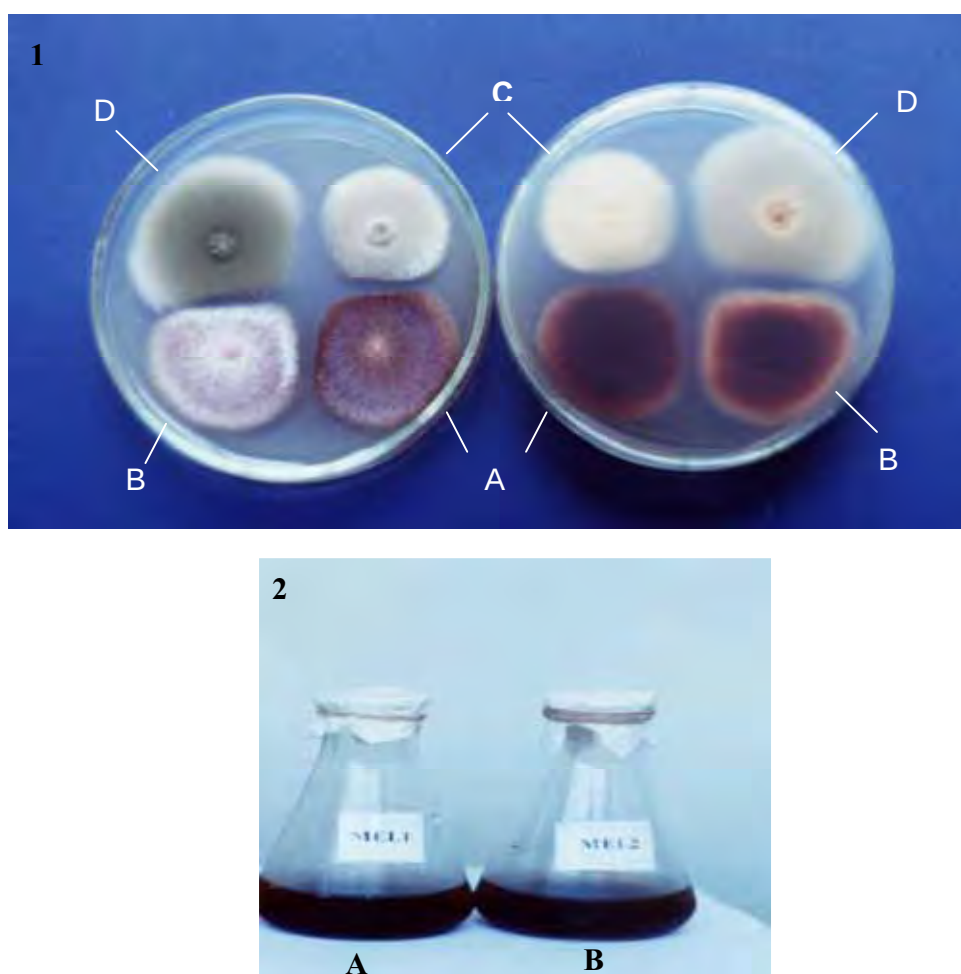


Figura 1: Crescimento das linhagens selvagem e mutantes do fungo *A. nidulans* em meio de cultura sólido (1) e em meio de cultura líquido (2). (A e B) linhagens mutantes MEL1 e MEL2, respectivamente; (C) linhagem mutante com ausência de produção de melanina denominada 0316 e (D) linhagem selvagem denominada VE.

As linhagens estão estocadas no Laboratório de Fungos Filamentosos no Departamento de Bioquímica Tecnológica do Instituto de Química (UNESP), e apresentam os seguintes marcadores genéticos:

MEL 1: *inoB2*; *melC1*

MEL 2: *pabaA*; *wA3*; *melD1*

O grupo de ligação e o fenótipo das mutações presentes nestas linhagens estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1: Relação das mutações presentes nas linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho.

Símbolo Gênico	Grupo de Ligação	Fenótipos
<i>pabaA1</i>	I	Auxotrofia para ácido p-aminobenzóico
<i>wA3</i>	II	Conídios brancos
<i>inoB2</i>	IV	Auxotrofia para inositol
<i>melC1</i>	VII	Produção excessiva de pigmento tipo-melanina
<i>melD1</i>	VII	Produção excessiva de pigmento tipo-melanina

3.1.b. Meios de Cultura

O meio utilizado para o crescimento das linhagens foi o meio mínimo descrito por Cove (1966), com a seguinte composição:

Meio Mínimo

Solução de Sais (descrita abaixo)..... 10 mL

Solução de Elementos Traços (descrita abaixo)..... 1 mL

Água Destilada..... 1000 mL

Após autoclavagem a 121,1 °C (1kgf/cm²) por 20 minutos, foram adicionados ao meio fontes de carbono (glicose 55 mM) e nitrogênio (nitrato 70 mM), e os requerimentos nutricionais específicos para cada linhagem, ácido p-aminobenzóico (5 mM) para a linhagem Mel 2 e inositol (20 µg/mL) para Mel 1. Para a preparação do meio mínimo sólido foi adicionado 1,5% de ágar antes da autoclavagem.

A solução de sais foi preparada segundo Cove (1966), e apresenta a seguinte composição:

Fosfato de potássio monobásico.....	14 gr
Fosfato de potássio bibásico	6,86 gr
Cloreto de potássio	1,0 gr
Sulfato de magnésio	1,0gr
Água destilada até completar 100 mL	

A solução de elementos traços foi descrita por Cove (1996), e é constituída por:

Borato de sódio decahidratado.....	.40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado.....	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado.....	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado.....	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado.....	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado.....	8 mg
Água destilada até completar 100 mL	

3.1.c. Suspensão de Conídios

A suspensão de conídios utilizada nos experimentos foi preparada a partir da raspagem dos conídios obtidos após crescimento das linhagens em meio mínimo sólido por 5 dias a 37°C. Estes conídios foram coletados em solução salina 0,85%, filtrados em lã de vidro e o seu número estimado por contagem através da Câmara de Neubauer.

3.2. MÉTODOS

3.2.a. Crescimento em frascos agitados

O cultivo das linhagens foi feito a partir do inóculo de 10^5 conídios/mL em meio mínimo pH 6,8 (contendo fontes de carbono e nitrogênio e requerimentos nutricionais para cada linhagem) e incubadas em temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

Para determinar a quantidade ideal de meio para a produção máxima de pigmento, o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo volumes de 100 e 200 mL de meio mínimo.

Para determinar o tempo de cultivo necessário para a produção máxima de pigmento, as linhagens foram crescidas por 5 e 10 dias sob agitação de 220 rpm à temperatura ambiente.

Após o crescimento, as culturas foram submetidas à filtração em bomba de vácuo para determinação da biomassa e extração do pigmento.

3.2.b. Influência da Água de Maceração de Milho (AMM)

A água de maceração de milho (AMM) foi cedida pela indústria Corn Products Brazil - Ingredientes Industriais LTDA, situada na cidade de Balsa Nova, Paraná. É um subproduto obtido da moagem do milho que possui grandes quantidades de nitrogênio e sais minerais, sendo, portanto, uma excelente fonte de nitrogênio.

A AMM foi previamente filtrada em bomba de vácuo para remoção de resíduos, esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121°C e adicionada nas concentrações de 0,2% e 2 % em 200 mL de meio mínimo suplementado com nitrato (0,6%) e glicose (1%).

3.2.c. Influência da Peptona

Foram realizados ensaios para verificar a influência de uma fonte orgânica de nitrogênio para a produção de pigmento. A fonte orgânica de nitrogênio escolhida foi a peptona, que é um hidrolisado enzimático de proteínas.

Foram realizados experimentos com as peptonas de carne, de caseína e bacteriológica, junto com a glicose como fonte de carbono, e água de maceração de milho (0,2%), e/ou nitrato como fontes suplementares de nitrogênio. Os estudos foram conduzidos em 200 mL de meio mínimo, mantidos em incubação por 5 dias, sob agitação de 220 rpm a temperatura ambiente.

3.2.d. Influência do melaço da cana-de-açúcar

O melaço utilizado neste trabalho foi cedido pela Usina Zillo Lorenzetti S.A. Grupo Zilor, situada na cidade de Macatuba, São Paulo. Possui em sua composição 60,5% de açúcares, sendo 52,5% de sacarose e 8% de açúcares redutores (glicose e frutose), além de sais, vitaminas e minerais.

Para que este resíduo possa ser usado como fonte de nutrientes para o crescimento celular e a produção de pigmento pelo fungo, é necessário realizar a hidrólise do melaço para quebrar a sacarose e liberar açúcares redutores. A hidrólise ácida, como descrita por Goksungur et al., (2002), foi feita pelo ajuste do pH do melaço até 2 com HCl 10 M seguida do aquecimento em banho a 80°C por 1 hora. Após o resfriamento o pH do melaço foi ajustado para 7 com NaOH 10 M e levado a autoclave por 15 minutos a 121°C.

Para avaliar o efeito do melaço como fonte de nutrientes para a produção do pigmento melanina, seu hidrolisado foi adicionado em 200 mL de meio mínimo nas concentrações de 1% e 10%

como fonte de carbono, suplementado com nitrato (0,6%) e/ou água de maceração de milho (0,2%) como fontes de nitrogênio, mantidos por 5 dias de incubação, sob agitação de 220 rpm à temperatura ambiente.

3.2.e. Influência do bagaço da cana-de-açúcar

O bagaço utilizado foi cedido pela Usina Zillo Lorenzetti S.A. Grupo Zilor, situada na cidade de Macatuba, São Paulo. É um resíduo agroindustrial muito utilizado como substrato para processos fermentativos, mas por ser um material de natureza polissacarídica não é diretamente utilizado pelos microrganismos, sendo necessário hidrolisá-lo aos seus respectivos monômeros.

O processo de hidrólise ácida do bagaço foi realizado como descrito por Gámez et al., (2006), onde em 10 g de bagaço seco e triturado foi adicionado 100 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 4% e levado para autoclave por um período de 30 minutos a 120°C. Após a autoclavagem, o bagaço foi filtrado em bomba de vácuo e o sobrenadante foi neutralizado pela adição de hidróxido de potássio (KOH) até o pH de 5,5, com posterior centrifugação para remoção dos sais formados. Após este procedimento, foram realizadas as dosagens de açúcar redutor e fenol no hidrolisado.

Para analisar a influência do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar como fonte de nutriente para a produção de pigmento melanina, foram realizados os seguintes experimentos:

- 200mL de hidrolisado suplementado com:
 - o Água de maceração de milho (0,2%).
 - o Água de maceração de milho (0,2%) e solução de sais.
 - o Água de maceração de milho (0,2%) e nitrato (0,6%).
 - o Água de maceração de milho (0,2%), nitrato (0,6%) e solução de sais.
 - o Água de maceração de milho (0,2%), nitrato (0,6%), solução de sais e glicose.

- 100mL do hidrolisado e 100mL de meio mínimo com:
 - o Água de maceração de milho (0,2%) e nitrato (0,6%).
 - o Água de maceração de milho (0,2%), nitrato (0,6%) e glicose.

- 50mL do hidrolisado e 150 mL de meio mínimo com:
 - o Água de maceração de milho (0,2%) e nitrato (0,6%).
 - o Água de maceração de milho (0,2%), nitrato (0,6%) e glicose.

Todos os frascos, totalizando 200 mL de meio, foram incubados por 5 dias a temperatura ambiente sob agitação de 220 rpm.

3.2.f. Quantificação de crescimento

O crescimento das linhagens foi expresso como grama de massa seca por litro de meio. Os valores referentes à massa seca foram obtidos multiplicando-se a massa úmida pelo fator de conversão igual a 0,335. Para a determinação deste fator, alguns micélios obtidos nas condições padrão de crescimento foram submetidos a secagem em estufa a 80° C, sendo feito o monitoramento da massa úmida até que esta não mais apresentasse variação. A massa seca obtida foi então dividida pela massa úmida inicial obtendo-se o fator de conversão.

3.2.g. Determinação de açúcar residual

O conteúdo de açúcares presente no hidrolisado foi determinado através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) o qual é baseado numa reação de oxi-redução entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, resultando em um composto colorido, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, o qual é medido espectrofotometricamente a 546 nm (MILLER, 1959).

Para a dosagem do açúcar, as amostras obtidas foram adequadamente diluídas (0,5 mL da amostra + 1 mL de água destilada) e adicionado 2,0 mL do reagente DNS em respectivos tubos de ensaio. O branco foi preparado colocando-se água no lugar da amostra. Os tubos foram transferidos para banho de água a 100°C por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para banho de gelo para resfriamento, e posteriormente fez-se a leitura das amostras em absorbância de 546 nm.

A quantificação de açúcar residual presente no hidrolisado foi feita utilizando o fator 1,5193 obtido a partir da curva de referência de glicose (figura 2).

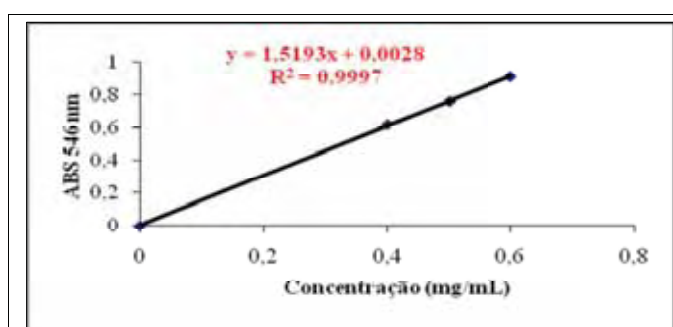


Figura 2: Curva de referência da glicose para determinação da concentração de açúcar redutor.

3.2.h. Determinação de Fenol

Durante o processo de hidrólise ácida do bagaço da cana-de-açúcar pode ocorrer a formação de compostos fenólicos, os quais foram quantificados pelo método do Folin Ciocalteu, descrito por Singleton et al., (1974). A partir de uma amostra de 0,1 mL do hidrolisado, adicionou-se 6 mL de água destilada, 0,5 mL de Folin sendo deixados em repouso por 4 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL de uma solução de carbonato de cálcio 20%, e o volume foi completado para 10 mL com a adição de 1,9 mL de água. Esta amostra foi deixada por 2 horas em temperatura ambiente para reação, e após este período foi realizada a leitura da absorbância a 760 nm em espectrofotômetro. O branco foi obtido substituindo apenas a volume da amostra pelo mesmo volume de água destilada. A concentração de fenol presente no hidrolisado foi determinada usando o fator de 117,88 obtido através da curva de referência (figura 3).

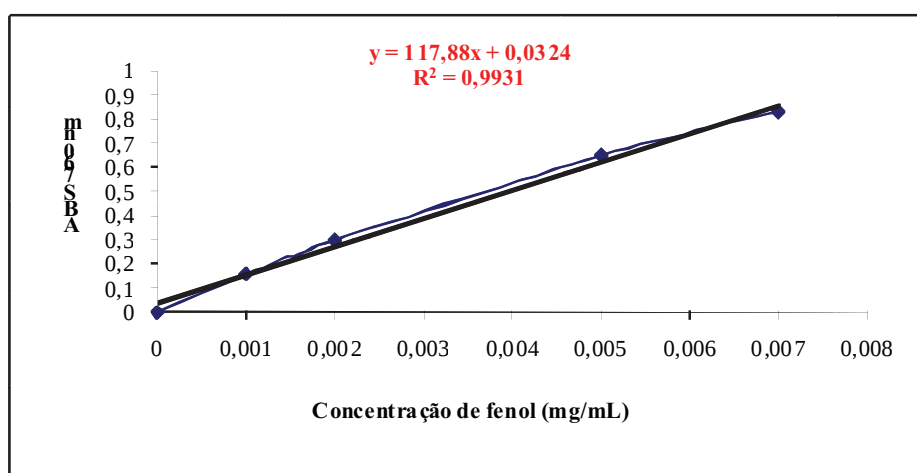


Figura 3: Curva de referência do fenol.

3.2.i. Extração total do pigmento

A extração do pigmento presente na cultura líquida do fungo seguiu o método descrito por Suryanarayanan et al. (2004), através da adição de NaOH 1 N seguida de autoclavagem a 121°C por 20 minutos (figura 4). Este procedimento foi repetido até que não fosse mais observada a coloração escura da massa micelial. A quantidade de pigmento extraído foi expressa em grama de pigmento por litro de meio. A produção específica foi calculada pela razão entre massa de pigmento e a biomassa obtida nas condições de cultivo.

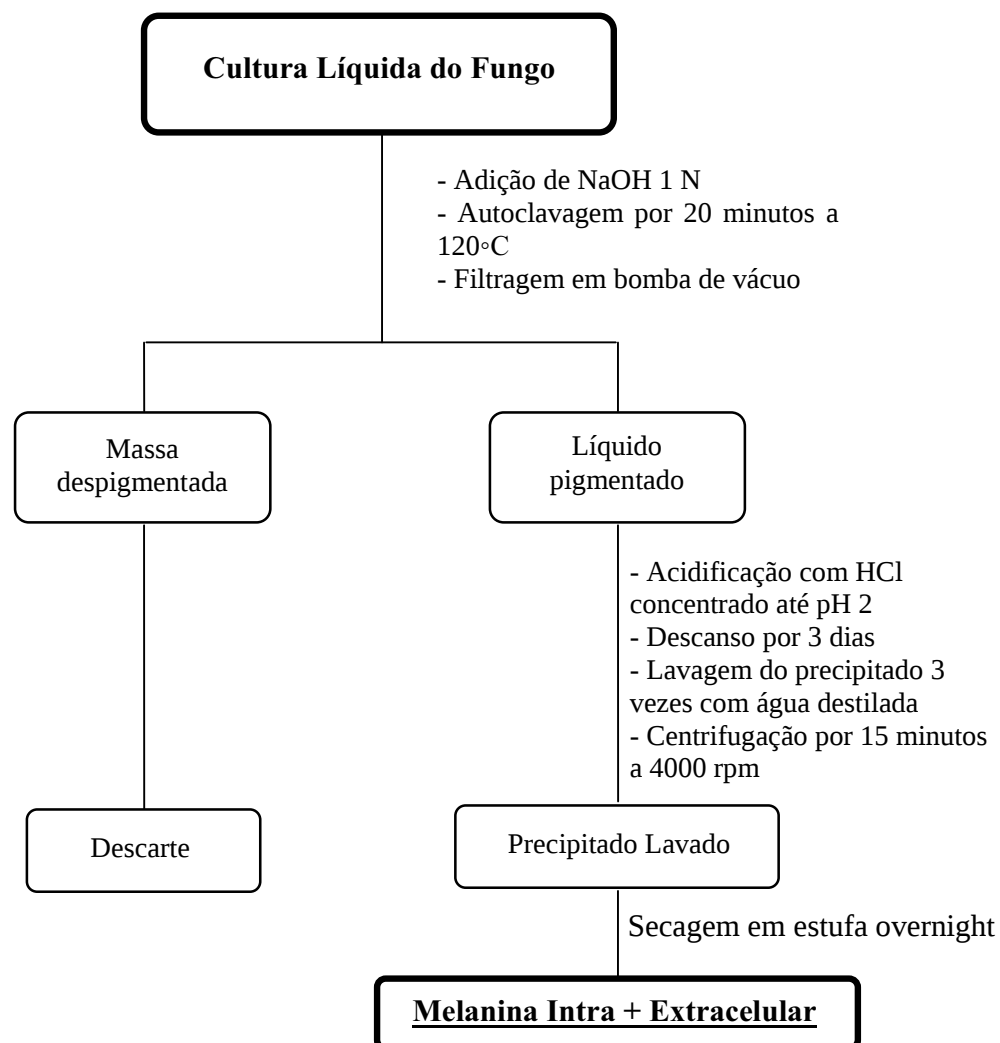


Figura 4: Fluxograma do método de extração do pigmento melanina intra e extracelular da cultura do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados experimentos com o objetivo de estudar a influência das condições de cultivo, como o volume de meio de cultura e o tempo de incubação, e também a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes na produção de pigmento melanina pelas linhagens MEL 1 e MEL 2 de *Aspergillus nidulans*.

4.1. Volume de meio de cultura

Este experimento teve como objetivo verificar a influência do volume de meio de cultura na produção do pigmento melanina pelo fungo *Aspergillus nidulans*. Como apresentado na tabela 2, os resultados mostraram que após o cultivo em 200 mL de meio houve um aumento de 45,7% e 70,8% no crescimento, e 220% e 176% na formação de pigmento, respectivamente para as linhagens MEL 1 e MEL 2, comparado aos valores obtidos pelo cultivo em 100 mL de meio. Analisando a produção específica também verifica-se que no volume de 200 mL houve um aumento de 121% e 63,6% para as linhagens MEL1 e MEL2 respectivamente, comparado ao volume de 100 mL.

Tabela 2: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 do fungo *Aspergillus nidulans* em 100 e 200 mL de meio mínimo contendo glicose (1%) e nitrato (0,6%), incubados por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

	<i>Volume (mL)</i>	<i>Biomassa (g/L) ^(a)</i>	<i>Pigmento (g/L) ^(a)</i>	<i>Produção Específica (g/g)</i>
MEL 1	100	1,27 ± 0,29	0,24 ± 0,04	0,19
	200	1,85 ± 0,08	0,77 ± 0,13	0,42
MEL 2	100	1,13 ± 0,18	0,25 ± 0,05	0,22
	200	1,93 ± 0,4	0,69 ± 0,06	0,36

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Também foi observado nos volumes analisados que o fungo apresenta crescimento na forma de “pellets”, sendo que em 100 mL houve a formação de “pellets” maiores com pouca pigmentação comparado àqueles formados em 200 mL, que tinham tamanho reduzido, mas apresentavam intensa pigmentação (figura 5).

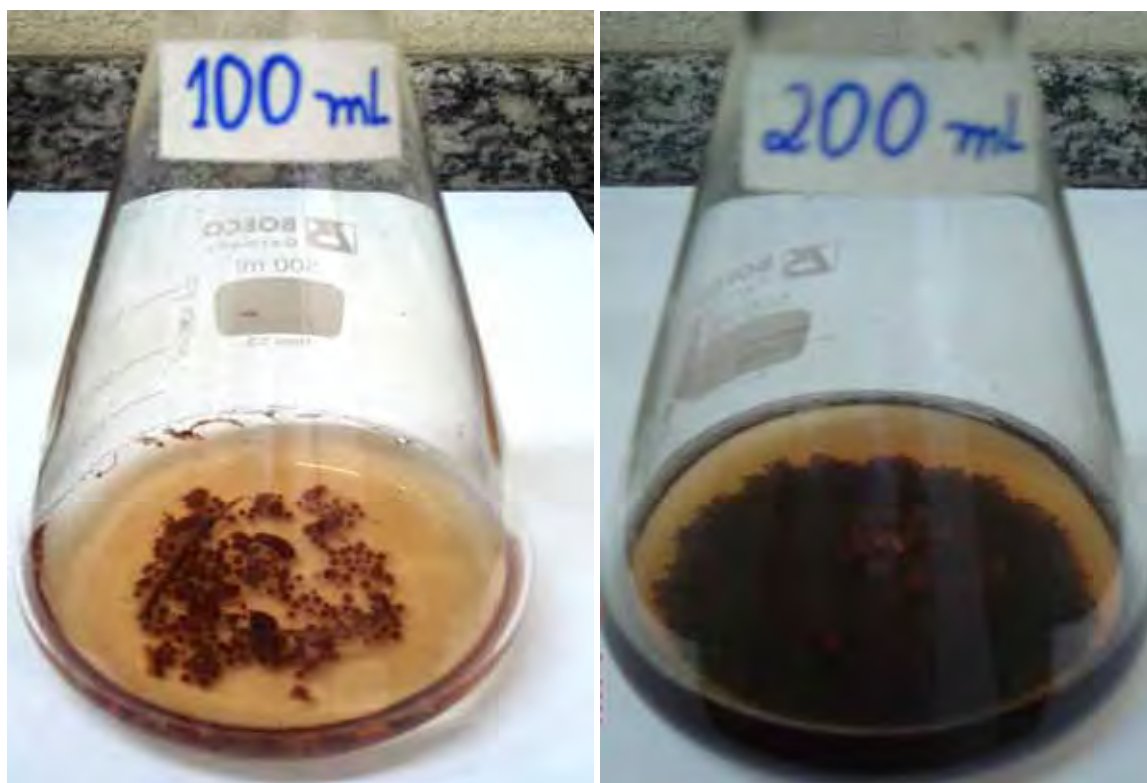


Figura 5: Linhagem MEL 1 cultivada em 100 mL e 200 mL de meio mínimo.

Muitos estudos de fermentação submersa mostram que a morfologia do fungo pode influenciar a produção de metabólitos. Feng et al., (2004) cultivando *Metarhizium anisopliae* para a produção de destruxina B, testaram diferentes volumes de meio de cultura (100, 150, 200, 250 ou 300 mL) em frascos de 500 mL, e seus resultados também mostraram que o volume de 200 mL apresentou maior rendimento da substância com 354 mg l^{-1} comparado a 100 mL (46 mg l^{-1}). Estes autores também observaram relação entre rendimento da DB e o tamanho do “pellet”, pois nas culturas com “pellets” de diâmetro menor ou maior que 2.0 mm a produção de destruxina foi reduzida. Paul; Priede; Thomas, (1999), mostraram que a produção de ácido cítrico está associada com a morfologia do fungo *Aspergillus niger*, pois maiores rendimentos do ácido foram obtidos quando o fungo cresceu de forma dispersa ou como “pellets” pequenos. Segundo Jiménez-Tobon et al., (1997), a síntese de produtos e o tamanho do “pellet” estão associados ao nível de oxigênio, pois o centro dos “pellets” grandes é

desprovido de oxigênio o que afeta o metabolismo celular e, conseqüentemente, a produção de substâncias.

De acordo com os nossos resultados, o volume de 200 mL foi o ideal para uma maior produção de pigmento provavelmente por apresentar um crescimento na forma de “pellets” pequenos, os quais possuem uma maior área superficial e como consequência têm uma maior velocidade de transferência de oxigênio. Como estes “pellets” têm maiores níveis de oxigênio estaria ocorrendo um estímulo da oxidação de compostos fenólicos ou indólicos que resultaram em uma maior produção de melanina.

4.2. Tempo de cultivo

Após estabelecer o volume de 200 mL de meio de cultura (item 4.1), foram realizados os ensaios para avaliar a influência do tempo de crescimento do fungo na produção de pigmento.

Como se pode observar na tabela 3, após 5 dias de cultivo o crescimento das linhagens MEL 1 e MEL 2 foi maior (respectivamente 29% e 77%) do que o alcançado em 10 dias, provavelmente porque a cultura de células estava em processo de autólise neste período. Em relação à produção de pigmento, após 10 dias obteve-se um aumento de 10% e 14% respectivamente para ambas as linhagens. Considerando a produção específica, o aumento foi de 40% para MEL1 e 100% para MEL2, em decorrência da diminuição da biomassa e do aumento na produção de pigmento alcançados após 10 dias de crescimento. Este aumento na pigmentação pode ser devido às substâncias liberadas durante o processo de autólise, incluindo compostos fenólicos ou indólicos, os quais agem como precursores da síntese do pigmento melanina. A produção específica em 10 dias também foi maior 40% para MEL1 e 100% para MEL2, em decorrência da diminuição da biomassa e do aumento na produção de pigmento

alcançados neste período. Bull (1970) também observou que culturas de *Aspergillus nidulans* em autólise mostram um acúmulo de melanina no meio.

Tabela 3: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 do fungo *Aspergillus nidulans* durante 5 e 10 dias de cultivo, em 200 mL de meio mínimo contendo glicose (1%) e nitrato (0,6%), à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

	<i>Tempo (dias)</i>	<i>Biomassa (g/L)^(a)</i>	<i>Pigmento (g/L)^(a)</i>	<i>Produção Específica (g/g)</i>
MEL 1	5	1,85 ± 0,08	0,77 ± 0,13	0,42
	10	1,43 ± 0,12	0,85 ± 0,12	0,59
MEL 2	5	1,93 ± 0,04	0,69 ± 0,06	0,36
	10	1,09 ± 0,14	0,79 ± 0,16	0,72

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Nossos resultados confirmaram que a fase de crescimento do fungo é um fator importante na produção do pigmento melanina, pois a pigmentação foi observada após 72 hs, que corresponde ao início da fase de crescimento estacionária. Resultados anteriores mostraram que com 48 hs de cultivo, que corresponde a fase de crescimento exponencial, nenhum pigmento foi produzido (LISBOA, 2003). Outros estudos também mostraram que o tempo de cultivo interfere na produção de metabólitos secundários. Sinha et al., (2001) também observaram que depois do sétimo dia de cultivo do fungo *Paecilomyces japonica*, ocorreu autólise dos “pellets” o que pode ter facilitado a secreção de exopolímeros aumentando a sua produção no final da fase estacionária. Xião et al (2004) também obtiveram a máxima produção de exo-biopolímeros por *Cordyceps pruinosa* após a fase estacionária, e segundo estes autores o nível de oxigênio dissolvido influenciou a produção destes exopolissacarídeos, pois durante o crescimento exponencial ocorreu um aumento na viscosidade do meio, o que provavelmente reduziu a transferência de oxigênio para o micélio e limitou a formação de metabólitos.

Xu et al., (2006), observaram que a taxa de aeração contribuiu para mudanças na produção de exopolímeros por *Paecilomyces japonica* e *Paecilomyces tenuipes*, pois para produzi-los em grande quantidade foi necessário manter alto o nível de oxigênio dissolvido em fermentador. Jiménez-Tobon et al., (1997) relataram que a redução na produção da enzima Mn (II) peroxidase ocorreu quando o fungo *Phanerochaete chrysosporium* cresceu sob a forma de “pellets” grandes, certamente devido a uma diminuição na taxa de transferência de oxigênio dentro dos “pellets”, sendo que pequenos “pellets” são completamente oxigenados, o que pode levar a um aumento na secreção da enzima.

Os nossos resultados estão de acordo com relatos da literatura, pois com a diminuição da massa micelial, após 10 dias de cultivo, houve uma redução da viscosidade do meio, em função da diminuição do tamanho dos “pellets”, o que pode ter resultado em uma maior aeração do meio e como consequência um aumento na produção de pigmento. No entanto, calculando a produtividade do processo não observa-se diferença entre 5 e 10 dias, pois os valores obtidos estão em torno de 0,003 independente do tempo de cultivo. Por este motivo, os experimentos subsequentes foram realizados com 5 dias de crescimento.

4.3. Utilização de resíduos agroindustriais como fontes de nutrientes

Com as linhagens MEL 1 e MEL 2 do fungo *Aspergillus nidulans*, foram realizados experimentos a fim de verificar a possível utilização de resíduos da agroindústria como fontes de nutrientes visando a produção do pigmento melanina com baixo custo.

4.3.1. Água de Maceração de Milho (AMM)

Foram realizados experimentos com água de maceração de milho (AMM), pelo fato desta representar principalmente uma fonte de nitrogênio, e também, de vitaminas, minerais e carboidratos (LIGGETT; KOFFLER, 1948). AMM foi utilizada nas concentrações 0,2% e 2% em meio mínimo contendo com nitrato de sódio (0,6%) e glicose (1%).

Pelos resultados apresentados na tabela 4 pode-se verificar que, após 5 dias de cultivo em 2% de AMM, ocorreu um aumento significativo na produção de biomassa, de 120% e 114% respectivamente para as linhagens MEL 1 e MEL 2, enquanto que a quantidade de pigmento produzida foi menor em comparação ao cultivo em nitrato e glicose. Por outro lado, com a adição de 0,2% de AMM, a produção de pigmento melanina aumentou em relação ao meio contendo somente nitrato e glicose. Em termos de produção específica, o aumento foi cerca de 12% e 20% respectivamente para as linhagens MEL 1 e MEL 2.

Tabela 4: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 em meio mínimo contendo AMM (0,2% ou 2%), nitrato (0,6%) e glicose (1%), durante 5 dias de incubação à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

	<i>Condição de Cultivo</i>	<i>Biomassa (g/L)^(a)</i>	<i>Pigmento (g/L)^(a)</i>	<i>Produção Específica (g/g)^(a)</i>
MEL1	0,2% AMM + Nitrato + Glicose	1,95 ± 0,1	0,91 ± 0,3	0,47
	2% AMM + Nitrato + Glicose	4,1 ± 0,1	0,54 ± 0,1	0,13
	Nitrato + Glicose	1,85 ± 0,1	0,77 ± 0,1	0,42
MEL2	0,2% AMM + Nitrato + Glicose	1,72 ± 0,2	0,74 ± 0,0	0,43
	2% AMM + Nitrato + Glicose	4,14 ± 0,0	0,39 ± 0,1	0,09
	Nitrato + Glicose	1,93 ± 0,0	0,69 ± 0,1	0,36

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

De acordo com os dados da Tabela 5, após 10 dias de cultivo foi observado o mesmo comportamento das linhagens em relação à produção de biomassa e de pigmento. Na presença de 2% de AMM houve um aumento de 95% e 67% na biomassa, enquanto que a maior quantidade de pigmento foi obtida com 0,2% de AMM, apresentando um aumento de 8,5% na produção específica da linhagem MEL1 em relação ao cultivo em nitrato e glicose. Nota-se que para a linhagem MEL2 a presença de 0,2% de AMM resultou em uma redução da pigmentação em torno de 36% da produção específica obtida em nitrato e glicose. Comparando os resultados obtidos com 5 e 10 dias de cultivo (Tabela 4 e 5), verifica-se que a AMM, na concentração de 0,2%, somente exerce um efeito estimulador da pigmentação após 5 dias de cultivo, com um aumento de 12% e 20% respectivamente para as linhagens MEL 1 e MEL. No entanto, a utilização da AMM deve ser feita em conjunto com o nitrato, pois foi observado que na presença de AMM, como única fonte de nitrogênio, a pigmentação foi menor comparado com o meio contendo AMM, nitrato e glicose (dados não mostrados).

Tabela 5: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 em meio mínimo contendo AMM (0,2% ou 2%), nitrato (0,6%) e glicose (1%), durante 10 dias de incubação à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

	<i>Condição de Cultivo</i>	<i>Biomassa (g/L)^(a)</i>	<i>Pigmento (g/L)^(a)</i>	<i>Produção Específica (g/g)</i>
MEL 1	0,2% AMM + Nitrato + Glicose	1,76 ± 0,1	1,12 ± 0,4	0,64
	2% AMM + Nitrato + Glicose	3,43 ± 0,1	0,55 ± 0,2	0,16
	Nitrato + Glicose	1,43 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,59
MEL2	0,2% AMM + Nitrato + Glicose	1,86 ± 0,0	0,86 ± 0,0	0,46
	2% AMM + Nitrato + Glicose	3,11 ± 0,4	0,48 ± 0,1	0,15
	Nitrato + Glicose	1,09 ± 0,1	0,79 ± 0,2	0,72

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Também foi verificado que a morfologia do fungo, em relação ao tamanho dos “pellets”, variou em função da concentração de AMM, sendo que na concentração de 0,2% de AMM ocorreu a formação de “pellets” pequenos com intensa pigmentação, enquanto que com 2% de AMM ocorreu formação de “pellets” maiores com menor pigmentação. Como já foi discutido anteriormente, o tamanho dos “pellets” influencia a formação de pigmento melanina pelo fungo, pois “pellets” grandes têm níveis reduzidos de oxigênio na parte central, o que compromete a síntese oxidativa do pigmento.

Comparando estes resultados com aqueles obtidos em meio não suplementado com AMM (nitrato + glicose) pode-se verificar que a presença de AMM na concentração de 0,2%, estimulou a produção de pigmento com um aumento de 32% para a linhagem MEL 1 e 8% para a MEL 2. No entanto, a utilização da AMM deve ser feita em conjunto com o nitrato, pois foi observado que na presença de AMM, como única fonte de nitrogênio, a pigmentação foi menor comparado com o meio contendo AMM, nitrato e glicose (dados não mostrados).

Resultados semelhantes aos obtidos em nosso trabalho foram relatados na literatura. Liu; Liu; Xie (2002) também verificaram que a máxima produção de glicerol por *Candida krusei* foi obtida com 2 g l⁻¹ (0,2%) e o rendimento de glicerol diminuiu em concentração acima deste valor. Goksungur; Mantzouridou; Roukas, (2002) observaram que em concentrações de AMM acima de 5.0 g/L a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* caiu drasticamente. Hamano; Kilikian (2006) também analisaram o efeito da AMM no cultivo de *Monascus ruber* e mostraram que a máxima produção de pigmento foi obtida utilizando glicose (10 g/L), AMM (5 g/L) e glutamato monossódico (7,6 g/L), sugerindo que a AMM é uma fonte de nitrogênio adequada para a produção deste pigmento vermelho.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a AMM contém substâncias indutoras da síntese de melanina e, portanto, a adição de AMM (na concentração 0,2%) ao meio de cultura deve ser feita para otimizar a produção do pigmento pelas linhagens MEL 1 e MEL 2 do *Aspergillus nidulans*.

4.3.2. Água de Maceração de Milho (AMM) e peptona

A peptona é um hidrolisado de proteínas que pode ser utilizado como fonte orgânica de carbono e nitrogênio para o cultivo do fungo. Nestes ensaios foram testadas a peptona de carne, de caseína e bacteriológica (mistura de carne e caseína) utilizadas como fonte de nitrogênio (0,4%) junto com água de maceração de milho (0,2%) e glicose (1%) como fonte de carbono.

Os resultados obtidos mostraram que a presença de peptona (carne ou caseína ou bacteriológica) promoveu um maior crescimento da linhagem MEL 1, mas a pigmentação foi reduzida nestas condições comparado com o meio contendo glicose e nitrato. Também observa-se que a adição de AMM não mostrou efeito estimulador na produção de pigmento nestas condições (tabela 6).

Tabela 6: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo da linhagem MEL 1 crescida em meio contendo peptona (0,4%), nitrato (0,6%), água de maceração de milho (0,2%) e glicose (1%), mantidas em incubação por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

<i>Condição de cultivo</i>	<i>Biomassa (g/L)^(a)</i>	<i>Pigmento (g/L)^(a)</i>	<i>Produção Específica (g/g)</i>
P. Bacto+Glicose	3,59 ± 0	0,47 ± 0	0,13
P. Caseína+Glicose	3,43 ± 0,09	0,13 ± 0,01	0,04
P. Carne+Glicose	4,05 ± 0,01	0,125 ± 0,06	0,03
P. Bacto+Glicose+AMM	4 ± 0	0,32 ± 0	0,08
P. Caseína+Glicose+AMM	4,07 ± 0,5	0,21 ± 0	0,05
P. Carne+Glicose+AMM	3,03 ± 0	0,24 ± 0	0,08
P. Bacto+Glicose+Nitrato	3,97 ± 0,3	0,287 ± 0,08	0,07
P. Caseína+Glicose+Nitrato	3,86 ± 0,19	0,38 ± 0,14	0,10
P. Carne+Glicose+Nitrato	4,22 ± 0,12	0,142 ± 0,01	0,03
Glicose + Nitrato	1,85 ± 0,08	0,77 ± 0,13	0,42
P. Bacto+Glicose+AMM +Nitrato	3,72 ± 0,15	0,39 ± 0,15	0,10
P. Caseína+Glicose+AMM +Nitrato	3,99 ± 0,28	0,29 ± 0,09	0,07
P. Carne+Glicose+AMM +Nitrato	4,84 ± 0,28	0,14 ± 0,02	0,03
AMM + Nitrato + Glicose	1,95 ± 0,1	0,91 ± 0,3	0,47

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Park et al. (2001) que mostraram que fontes orgânicas de nitrogênio como a peptona de carne (0,1%), polipeptona e extrato de levedura foram favoráveis ao crescimento micelial de *Cordyceps militaris*, porém a produção de exo-biopolímero foi pequena nestas condições comparada ao obtido em meio contendo água de maceração de milho.

Nestes ensaios com peptona também foi observada a formação de “pellets” maiores do que o obtido em meio com glicose e nitrato, o que pode explicar a redução da pigmentação da cultura em função da diminuição de oxigênio no centro dos “pellets”. Os resultados obtidos parecem estar de acordo com as observações feitas por Lin; Demain (1993), in Tseng; Chen; Lin (2000), de que as fontes

orgânicas (como peptona e extrato de levedura) são mais favoráveis para crescimento, mas não para a produção de pigmento comparado as fontes inorgânicas (como glutamato monossódico, nitrato de sódio e sulfato de amônio). Portanto, a peptona não pode ser considerada uma fonte de nutrientes adequada para a produção de pigmento pela linhagem MEL1 de *A. nidulans*.

4.3.3. Melaço da cana-de-açúcar

Nestes experimentos o melaço proveniente da hidrólise ácida, foi usado como fonte de carbono em substituição à glicose nas concentrações de 1 e 10%, o que corresponde respectivamente a 5,6 e 56 g/L de açúcar redutor. Nitrato (0,6%) foi usado como fonte de nitrogênio. A tabela 7 mostra os valores referentes ao crescimento e produção do pigmento melanina pelas linhagens MEL1 e MEL2 nestas condições.

Tabela 7: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 em meio contendo melaço (1 ou 10%) e nitrato (0,6%), durante 5 dias de incubação à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

Condição de cultivo			Biomassa (g/L) ^(a)	Pigmento (g/L) ^(a)	Produção Específica (g/g)
MEL 1	Melaço	1%	1,92 ± 0,04	0	0
		10%	7,9 ± 0,8	0	0
	Glicose	1%	1,85 ± 0,08	0,77 ± 0,13	0,42
MEL 2	Melaço	1%	1,77 ± 0	0	0
		10%	9,44 ± 1	0	0
	Glicose	1%	1,93 ± 0,4	0,69 ± 0,06	0,36

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Como podemos observar nesta tabela, o aumento na concentração de melaço promoveu um maior crescimento do fungo, pois na concentração de 10% de melaço a biomassa produzida pelas linhagens foi muito superior (respectivamente 311% e 433% para MEL 1 e MEL 2) em relação a concentração de 1% de melaço, e também comparado com a glicose (327% e 389% para MEL 1 e MEL 2, respectivamente). Porém, nenhum pigmento foi produzido nas concentrações de melaço testadas, provavelmente devido à presença de alguma substância inibidora no melaço.

De acordo com a literatura, os substratos agroindustriais são bastante complexos e podem conter substâncias que inibem o metabolismo microbiano, incluindo a produção de metabólitos secundários (VALDUGA et al., 2007). Goksungur; Mantzouridou; Roukas (2002) relataram que substâncias presentes no melaço como os metais pesados e o cloreto de sódio formado durante o ajuste do pH podem ter reduzido a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora*. Ikram-ul et al., (2004) também mostraram que a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é extremamente sensível a metais presentes no melaço tais como, zinco, ferro, cobre, especialmente durante a fermentação submersa. Kona; Quereshi; Pai (2001), também observaram que o melaço não é uma fonte adequada para a máxima produção de glicose oxidase por *Aspergillus niger*, possivelmente porque existe alta concentração de minerais que podem ter inibido a síntese da enzima.

Há estudos mostrando que o tipo e a concentração de açúcares presentes no hidrolisado do melaço também afetam a produção de metabólitos secundários. Tseng et al., 2000 relataram que na presença de sacarose (100g/L) ocorreu uma redução na produção de pigmento por *M. purpureus* em comparação ao cultivo em glicose. Bae et al (2001) avaliaram o efeito da fonte de carbono na produção de exo-biopolímero por *Paecilomyces japonica*, e observaram que a concentração de biopolímeros foi maior em meio contendo maltose (30 g/L) do que com sacarose (25 g/L). Sinha et al., (2001) também mostraram que a concentração de sacarose (20, 40 e 60 g/L), influenciou a produção de exo-biopolímero, o crescimento, e a morfologia do fungo *Paecilomyces japonica*, sendo que em meio

contendo 40g/L de sacarose a produção deste polímero foi máxima e a morfologia predominante foi na forma de “pellets” compactos.

Nos experimentos realizados neste trabalho também foi observado que em ambas as concentrações de melaço testadas (1 e 10%) houve a formação de “pellets” maiores que aqueles obtidos em meio contendo glicose como fonte de carbono (dados não mostrados). Isto provavelmente foi devido à grande quantidade de nutrientes, em especial fonte de carbono, que favoreceram o crescimento micelial (trofofase) ao invés da formação de pigmentos (ídiofase). Como já mencionado anteriormente, a parte central dos “pellets” grandes é desprovida de oxigênio, o que afetaria o processo oxidativo de síntese do pigmento melanina, explicando a não pigmentação observada, sendo que a maior produção deste pigmento foi obtida em culturas com “pellets” de tamanhos menores.

4.3.4. Melaço e Água de Maceração de Milho

Nesse experimento o melaço foi usado nas concentrações de 1 ou 10% como fonte de carbono, em meio contendo nitrato (0,6%) e suplementado com água de maceração de milho (0,2%) como fonte de nitrogênio para verificar o efeito estimulador da AMM na produção de pigmento pelas linhagens estudadas.

Como mostrado na tabela 8, a adição de 0,2% de AMM ao meio contendo melaço 10% também promoveu um aumento no crescimento das linhagens MEL1 e MEL2, respectivamente de 203% e 366%, em comparação com 1% de melaço. Com relação à produção de pigmento, esta só foi observada na concentração de 1% de melaço.

Tabela 8: Crescimento e produção de pigmento obtidos após o cultivo das linhagens MEL 1 e MEL 2 em meio com melaço 1% ou 10 % , AMM 0,2% e nitrato (0,6%), durante 5 dias de incubação a temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

<i>Condição de cultivo</i>		<i>Biomassa (g/L)</i>	<i>Pigmento (g/L)</i>	<i>Produção específica (g/g)</i>
MEL 1	Melaço + AMM (0,2%)	1%	1,44 ± 0,07	0,422 ± 0,16
		10%	4,37 ± 0,09	0 ± 0
	Glicose + AMM (0,2%)	1%	1,95 ± 0,1	0,91 ± 0,3
MEL2	Melaço + AMM (0,2%)	1%	1,18 ± 0	0,247 ± 0,06
		10%	5,51 ± 0,2	0 ± 0
	Glicose + AMM (0,2%)	1%	1,72 ± 0,2	0,74 ± 0,0

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Estes resultados mostram que a AMM consegue exercer um efeito estimulador da pigmentação na presença de 1% de melaço, mas o mesmo não ocorre na concentração de 10%. Isto pode ser explicado pela alta concentração de açúcares e/ou substâncias presentes em 10% de melaço, as quais exercem efeito inibidor da pigmentação.

Goksungur; Mantzouridou; Roukas (2002) também relataram que a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* aumentou significativamente com a adição de água de maceração de milho (5.0 g/L) ao meio contendo melaço obtido da beterraba. Oliveira; Buzato; Haully (2005), mostraram em seu trabalho com *Lactobacillus curvatus*, que para obter um maior rendimento tanto na produção de biomassa quanto na produção de ácido lático, há a necessidade de suplementação do melaço com fontes de nitrogênio como o extrato de levedura e peptona.

No entanto, a presença de melaço 1% juntamente com AMM 0,2% não resultou em um aumento na produção de pigmento superior ao obtido após o cultivo em meio contendo glicose, nitrato e AMM 0,2% (Tabela 8). Portanto, a utilização de melaço como fonte de carbono não se mostrou adequada para maximizar a produção do pigmento melanina pelas linhagens MEL1 e MEL2.

4.3.5. Hidrolisado do Bagaço da Cana-de-açúcar

Estes experimentos foram realizados para verificar o efeito do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar no crescimento e na produção do pigmento melanina pela linhagem MEL 1 do fungo *Aspergillus nidulans*.

Os resultados obtidos usando 200 mL do hidrolisado, mostraram que o crescimento foi maior na presença de solução de sais, nitrato de sódio (0,6%), água de maceração de milho (0,2%) e glicose (1%), enquanto que nesta condição a produção de pigmento foi menor (tabela 9).

Tabela 9: Crescimento e produção de pigmento após cultivo da linhagem MEL 1 em meio contendo 200 mL do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar (H.B.C.A.), AMM 0,2%, nitrato 0,6%, glicose 1% e solução de sais (SS), por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

<i>Condição de cultivo</i>	<i>Biomassa (g/L)^(a)</i>	<i>Pigmento (g/L)^(a)</i>	<i>Produção Específica (g/g)</i>
200 mL H.B.C.A. + AMM	1,51 ± 0,12	0,18 ± 0,01	0,12
200 mL H.B.C.A. + Nitrato + AMM	2,32 ± 0,14	0,2 ± 0,05	0,09
200 mL H.B.C.A. + AMM + SS	1,37 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,13
200 mL H.B.C.A. + Nitrato + AMM + SS	2,51 ± 0,09	0,78 ± 0,08	0,31
200 mL H.B.C.A. + Nitrato + AMM + SS + Glicose	6,14 ± 0,4	0,49 ± 0,07	0,08

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Este resultado pode ser explicado em função da alta concentração de açúcar total presente nesta condição, a qual atingiu valores de 93,4g/L comparado com a mesma condição sem glicose, cujo valor foi 60,5g/L. A inibição da pigmentação causada pela concentração de açúcar também foi

observada por Nurudeen; Ahearn (1979) na produção de melanina por *Cryptococcus neoformans*, onde eles mostraram que em alta concentração de glicose (em torno de 5%) a pigmentação foi reduzida, sendo que uma maior pigmentação foi obtida quando as células cresceram em meio com baixa concentração de glicose (0,05%).

Também foram avaliados os volumes de 100 mL e 50 mL do hidrolisado, (suplementado com 100 mL e 150 mL de meio mínimo respectivamente). Os resultados mostraram que a maior produção de pigmento foi obtida em meio contendo 100 mL do hidrolisado, glicose, nitrato e AMM 0,2%, sendo que com 50 mL do hidrolisado a produção de pigmento foi menor (Tabela 10), com valor semelhante ao obtido com 200 mL de hidrolisado (Tabela 9). Isto confirma que a concentração de açúcar afeta a produção de pigmento, pois em concentrações maiores ou menores que 1,0% de glicose ocorreu redução da pigmentação.

Tabela 10: Crescimento e produção de pigmento após cultivo da linhagem MEL 1 em meio com o hidrolisado da cana-de-açúcar (H.B.C.A.), AMM 0,2%, nitrato 0,6%, glicose (1%) e solução de sais, por 5 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 220 rpm.

<i>Condição de cultivo</i>	<i>Biomassa (g/L)</i>	<i>Pigmento (g/L)</i>	<i>Produção específica (g/g)</i>
100 mL H.B.C.A. + 100mL M.M.+ AMM + Nitrato	2,1 ± 0,08	0,29 ± 0,04	0,14
100 mL H.B.C.A. + 100mL M.M.+ AMM + Nitrato + Glicose	3,46 ± 0,07	1,01 ± 0,05	0,29
50 mL H.B.C.A. + 150mL M.M.+ AMM + Nitrato	1,11 ± 0,08	0,14 ± 0	0,13
50mL H.B.C.A. + 150mL M.M.+ AMM + Nitrato + Glicose	4,02 ± 0,06	0,79 ± 0,03	0,2
200 mL M.M. + AMM + Nitrato + Glicose	1,85 ± 0,1	0,77 ± 0,1	0,42

(a): Os valores correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Comparando a produção específica obtida em meio contendo glicose, nitrato e AMM 0,2%, observa-se que a presença do hidrolisado do bagaço de cana não resultou em um aumento da pigmentação (Tabela 10).

Assim, com os resultados obtidos podemos concluir que o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar não mostrou ser um componente necessário para a produção do pigmento melanina pelas linhagens em estudo.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se considerar que:

- ✓ O volume de meio, o tempo de incubação e os resíduos agroindustriais (como fonte de nutrientes) influenciam no crescimento, na morfologia e na produção de pigmento pelas linhagens melanizadas MEL1 e MEL2 do fungo *Aspergillus nidulans*.
- ✓ A maior produção de pigmento foi obtida em 200 mL de meio provavelmente devido a formação de "pellets" pequenos, os quais exibiram maior pigmentação comparado com os "pellets" maiores observados em 100mL de meio.
- ✓ Em relação ao tempo de incubação, observou-se que, embora a produção de pigmento tenha sido maior em 10 dias, a produtividade do processo foi muito semelhante em 5 e 10 dias de cultivo.
- ✓ A água de maceração de milho adicionada na concentração 0,2% ao meio de cultura aumentou a produção do pigmento pelas linhagens MEL1 e MEL2 provavelmente por conter substâncias indutoras da síntese de melanina.
- ✓ A suplementação do meio contendo AMM (0,2%) com uma fonte orgânica de nitrogênio, como a peptona, proporcionou grandes quantidades de biomassa, mas não resultou em aumento na produção de pigmento pelas linhagens em estudo, o que pode ser devido à formação de "pellets" grandes.

- ✓ O melaço da cana-de-açúcar, nas concentrações de 1 e 10%, em meio suplementado com o nitrato (6%) ou AMM (0,2%), não mostrou ser uma fonte de nutriente adequada para a produção máxima de pigmento, provavelmente devido à grande quantidade de açúcares que favoreceu o crescimento do fungo na forma de "pellets" grandes.

- ✓ A adição do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar ao meio contendo solução de sais, glicose (1%), nitrato (0,6%) e AMM (0,2%) não estimulou a produção de pigmento pela linhagem MEL1.

- ✓ A morfologia do fungo também mostrou ser um fator importante na produção de melanina, sendo que a maior produção de pigmento ocorreu quando as linhagens cresceram na forma de "pellets" pequenos, os quais por apresentarem maior nível de oxigenação permitem a polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos para síntese do pigmento.

- ✓ Dentre os subprodutos analisados, a água de maceração de milho (AMM) na concentração de 0,2%, mostrou ser um componente nutricional importante para a produção máxima de pigmento pelas linhagens MEL1 e MEL2 do fungo *Aspergillus nidulans*, visando à diminuição dos custos para produção do pigmento em escala industrial para futuras aplicações farmacológicas.

REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAİN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, p. 191-199, 2003.

AGARWAL, L.; ISAR, J.; MEGHWANSHI, G. K.; SAXENA, R. K. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1348-1354, 2006.

BAE, J. T.; PARK, J. P.; SONG, C. H.; YU, C. B.; PARK, M. K.; YUN, J. W. Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 5, p. 522-524, 2001.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicação de exopolissacarídeos fúngicos. **Seminário Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun. 2004.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101-107, 1998.

BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 1, p. 177-183, jan./fev. 2007.

BHOSALE, P.; GRADE, R. V. β -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 327-332, 2001.

BULL, A. T. Inhibition of polisaccharases by melanins: enzyme inhibition in relation to mycolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 137, p. 345-356, 1970.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canada Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1115-1136, 1998.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanin detection by the use of copper sulfide-silver. **Micologia**, v. 97, n. 2, p. 312-319, 2005.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 447-459, Sept. 2002.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para a produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactérias. **Seminário Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, jul./dez. 2005.

CERRI, M. O. **Avaliação de transferência de calor e massa de um biorreator airlift de circulação interna de bancada para a produção de ácido clavulânico**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CHASKES, S.; TYNDALL, R. L. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from *para*- and *ortho*-Diphenols: effect of the nitrogen source. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 509-514, June 1975.

CHEN, M.; JOHNS, M. R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 132-138, 1993.

CHO, Y. J.; PARK, J. P.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 195-202, May 2002.

CLUTTERBUCK, A. J. The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 136, p. 1731-1738, 1990.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lípases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 113, p. 51-56, 1966.

COSTA, J. M.; COBERLLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L. Study of different nitrogen sources on glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultured in tricyclazole. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 633-636, 2004.

CUI, F. J.; LI, Y.; XU, Z. H.; XU, H. Y.; SUM, K.; TAO, W. Y. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and *exo*-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1209-1216, 2006.

- FENG, K. C.; ROU, T. M.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M.; CHANG, Y. N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of dextruxin B by *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 22-25, 2004.
- FOGARTY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 311–317, Sept. 1996.
- GOKSUNGUR, Y.; MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T. Optimization of the production of β -carotene from molasses by *Blakeslea trispora*: a statistical approach. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 933-943, 2002.
- GONÇALVES, R. C.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidante activity of melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1129-1131, June 2005.
- GONÇALVES, R. C.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Effect of the melanin extracted from *Aspergillus nidulans* in nitric oxide production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 6th. 2007. Ribeirão Preto. **Program and Abstracts...** Ribeirão Preto, 2007.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 nd ed. New York: Willey-Liss, 1994. p. 134-136.
- GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, Nov. 2005.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus rubber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 619-625, 2000.
- HAMANO, P. S.; KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus rubber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.
- HAMDI, M.; BLANC, P. J.; LORET, M. O.; GOMA, G. A new process for red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus*. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 75-79, 1997.
- HAN, O.; MUDGETT, R. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solide-state fermentations. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 5-10, 1992.

HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R. de; OLIVEIRA, A. S. de. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Seminário Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 133-142, jan./jun. 2003.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 447-471, Sept. 1999.

IKRAM-UL, H.; ALI, S.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Citric acid production by selected of *Aspergillus niger* from cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 125-130, 2004.

JACOBSON, E. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 708-717, Oct. 2000.

JIMENEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion untreated molasses and molasses previously fermented *Penicillium decumbens* in batch reactors. **Biochemical Engineering Journal Amsterdam**, v. 18, n. 2, p. 121-132, 2004.

JIMÉNEZ-TOBON, G. A.; PENNINCKX, M. J.; LEJEUNE, R. The relationship between pellet size and production of Mn (II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 537-542, 1997.

KALINGAN, A. E.; KRISHAN, M. R. V. Agro industrial by-products as flavinogenic stimulations for riboflavin production. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 87-91, 1997.

KERMASHA, S.; BAO, H.; BISAKOWSKI, B.; YAYLAYAN, V. Characterization of the biocatalysis of tyrosinase in selected organic solvent media using model phenolic substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 335-345, 2002.

KIM, B. K.; PARK, P. K.; CHAE, H. J.; KIM, E. Y. Effect of phenol on β -Carotene content in total Carotenoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Korean Journal Chemistry Engeenering**, v. 21, n. 3, p. 689-692, 2004.

KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 123-126. 2001.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LEE, Y. K.; CHEN, D. C.; CHAUVATCHARIN, S.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Production of Monascus pigment by a solid-liquid state culture method. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 8, p. 516-518, 1995.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriology Review**, v. 12, n. 4, p. 297-311, 1948.

LISBOA, H. C. F. **Estudo das condições de cultivo na produção de pigmento melanina por linhagens (mutantes) do fungo *Aspergillus nidulans***. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

LIU, Y.; LIU, D.; XIE, D. Improvement of glycerol production by *Candida krusei* in batch and continuous cultures using corn steep liquor. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 19, p. 1539-1542, Oct. 2002.

MARTINKOVA, L.; JÚZLOVÁ, P.; VESELY, D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 609-616, 1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NURUDENN, T.; AHEARN, D. G. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 724-729, Nov. 1979.

OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. B.; HAULY, M. C. O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. **Seminário Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 53-60, jan./mar. 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARK, J. P.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 76-81, 2001.

PAUL, G. C.; PRIEDE, M. A.; THOMAS, C. R. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 121-129, 1999.

PAZOUKI, M.; PANDA, T. Understanding the morphology of fungi. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 127-143, 2000.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v.1.

PESSOA, A. J.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Evaluation of sugar cane hemicellulose hydrolyzate for cultivation of yeasts and filamentous fungi. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 360-363, 1997.

PITLOVANCIV, A. K.; CARIS, M. E.; PORTO, L. M.; PEDROSA, R. C.; ANTÔNIO, R. V. Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 13-18, mar. 2006.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 429-443, 2006.

POMBEIRO, S. R. C. **Controle da expressão gênica do transporte e metabolismo de fontes de nitrogênio em *Aspergillus nidulans***: influência da concentração de nitrito, do pH e da presença de citrato. 1991. 130 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMINGUEZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 93-98, 2004.

SCHROEDER, H. W. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 381-385. May 1996.

SHAW, C. E.; KAPICA, L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 824-830, Nov. 1972.

SILVA, M. C. **O efeito da natureza das fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo de fungos filamentosos**. 1998. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1994.

SINHA, J.; BAE, J. T.; PARK, J. P. SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 392-399, June 2001.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Oxford: Pergamon Press, 1984.

SURYANARAYANAN, T. S.; RAVISHANKAR, J. P.; VENKATESAN, G.; MURALI, T. S. Characterization of the melanin pigment of a Cosmopolitan fungal endophyte. **Mycology Research**, v. 108, n. 8, p. 974-978, Aug. 2004.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004.

TSENG, Y. Y.; CHEN, M. T.; LIN, C. F. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 31-37, 2000.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. di. Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1860-1866, out. 2007.

XIAO, J. H.; CHEN, D. X.; XIAO, Y.; LIU, J. W.; LIU, Z. L.; WAN, W. H.; FANG, N.; TAN, B. B.; LIANG, Z. Q.; LIU, A. Y. Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2241-2247, 2004.

XU, C. P.; SINHA, J.; BAE, J. T.; KIM, S. W.; YUN, J. W. Optimization of physical parameters for exo-biopolymer production in submerged mycelial cultures of two entomopathogenic fungi *Paecilomyces japonica* and *Paecilomyces tenuipes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 501-506, 2006.