



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 007952 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO ASPERGILLUS NIDULANS

Resumo: É descrito um processo de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* (do mutante MEL1) para promover uma maior produção do pigmento melanina, sendo prevista uma primeira etapa, denominada de pré-cultura, com o objetivo de estimular o crescimento do fungo, usando água de maceração de milho (AMM) como meio de cultura, e ajuste nas variáveis que influenciam o cultivo do mutante MEL 1, e uma segunda etapa, denominada de cultura, onde a massa micelial da etapa de pré-cultura é adicionada em um meio mínimo com água de maceração de milho e ajuste das variáveis pH, temperatura, concentração de AMM na pré-cultura, concentração de AMM na cultura, concentração de esporo, concentração de pré-inóculo, concentração de Tween e velocidade de agitação, obtendo um aumento considerável na produção do pigmento com redução de custos do bioprocesso para posterior aplicação em escala industrial.

Figura a publicar: 3

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Sérgio Victor Mastrorocco

Numero OAB: 296946SP

Numero API: 1705

CPF/CNPJ: 02990560823

Endereço: Rua Amaral Gama, 333 - Conjunto 164 - Santana

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 02018-001

Telefone: (11) 2639-7200

Fax: (11) 2973-5032

Email: sergio@mastrorocco.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO

CPF: 05074450829

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, Quitandinha,

Cidade: ARARAQUARA

Estado: SP

CEP: 14800-060

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 2 de 4

Nome: GABRIELA SANTANA DE SOUSA

CPF: 39847044880

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua João Pessoa, Centro

Cidade: Matão

Estado: SP

CEP: 15990-020

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 3 de 4

Nome: HELEN CRISTINA FÁVERO LISBOA

CPF: 26739656886

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Binário Norte, 4175, Jd. Village do Cerrado

Cidade: Rondonópolis

Estado: MT

CEP: 78735-000

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 4 de 4

Nome: RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONÇALVES

CPF: 24612267842

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Av. Piratininga, 33, Praia da Costa

Cidade: Vila Velha

Estado: ES

CEP: 29101-220

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU INPI 17AUIN015.pdf
Procuração	procuracao FUNDUNESP para o INPI.pdf
DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO	17AUIN015_declaração negativa.pdf
Documento de Cessão	17AUIN015_Termo de Cessão.pdf
Relatório Descritivo	relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	reivindicacao.pdf
Desenho	desenhos.pdf
Resumo	resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

GUIA UTILIZADA NO DEPÓSITO DA 17AVINOIS

BANCO DO BRASIL		001-9		RECIBO DO SACADO	
Local de Pagamento				Vencimento	
Pagável em qualquer Banco				Contra-apresentação	
Cedente				Agência/Código Cedente	
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial				2234-9/333.028-1	
Data do Documento	Nº. documento	Especie doc.	Acerto	Data Proces.	Nosso Número
01/12/2016	1609705585	RC	N	01/12/2016	00.000.2.2.16.0970558.5
Uso Banco	Carteira	Especie	Quantidade	Valor	(=)Valor Documento
	18/027	RS			RS 70,00
Número:				(-)Desconto/Abatimento	
NN Complementar:					
Petionamento: Eletrônico					
Natureza: 20 - Modelo de				(-) Outras deduções	
Cod					
Serviço					
Petição Vinculada RPI				(+)Mora/Multa	
Valor					
200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT				(-)Outros Acréscimos	
				(-)Valor Cobrado	
				RS 70,00	
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					
Sacado					
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO					
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010					
Sacador/Avalista					
Corte na linha pontilhada				Autenticação mecânica - Controle Cedente	

BANCO DO BRASIL		001-9		00199.53637 10000.022169 09705.585215 4 00000000007000	
Local de Pagamento				Vencimento	
Pagável em qualquer Banco				Contra-apresentação	
Cedente				Agência/Código Cedente	
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial				2234-9/333.028-1	
Data do Documento	Nº. documento	Especie doc.	Acerto	Data Proces.	Nosso Número
01/12/2016	1609705585	RC	N	01/12/2016	00.000.2.2.16.0970558.5
Uso Banco	Carteira	Especie	Quantidade	Valor	(=)Valor Documento
	18/027	RS			RS 70,00
Instruções:				(-)Desconto/Abatimento	
1. Valores expressos em reais.					
2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'.				(-) Outras deduções	
3. Pagamento via SIAFI(OB-FATURA): Identificar na 'ob' o 'Nosso Número'.					
4. Vencimento contra apresentação.				(+)Mora/Multa	
				(+)Outros Acréscimos	
				(-)Valor Cobrado	
				RS 70,00	
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					
Sacado					
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO					
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010					
Sacador/Avalista					
Corte na linha pontilhada				Autenticação mecânica - Ficha de Compensação	

- GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI, como comprovante da retribuição, deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento. - PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio: 0033-0239-004900019792 Conta de Débito: 0239-000130027340
Tipo do Documento: CPF/CNPJ do Fornecedor:
Nome do Fornecedor: 000009853INPI - INST. NACIONAL
No. compromisso banco: 1024121000100007 No. compromisso cliente: 970558/DS1 1011
Tipo de Pagamento: BLQ Outros
Código de Barras: 00199536371000002216909705585215400000000007000
Valor Nominal: 70,00
Desc./Abat.: 0,00 Juros: 0,00
Data de Vencimento: 20/12/2016
Data de Pagamento: 20/12/2016
Situação: Efetivado
No. Lista de Débito: No. Protocolo: PGTFORNB20122016900117252
Autenticação: 11CBC4E9002F86B072DF813

Valor a Pagar: 70,00

retornar

Central de Atendimento 4004-2125 (Regiões Metropolitanas) SAC 0800 762 7777
Santander Empresarial 0800 726 2125 (Demais Localidades) Ouvidoria 0800 726 0322

SANTANDER

PROCURAÇÃO

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, brasileiro, professor universitário, portador do RG nº 10.289.419-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 083.891.058-02, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; **2) SÉRGIO VICTOR MASTROROCCO**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 296.946, e **3) VITOR GARCIA KOPP**, brasileiro, engenheiro, portador do RG nº 36.688.444-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 375.214.338-07, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 30 de junho de 2018.

São Paulo, 27 de junho de 2017.

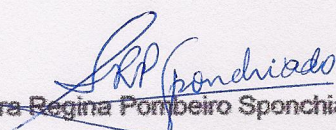

SANDRO ROBERTO VALENTINI

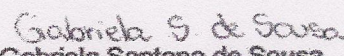
DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

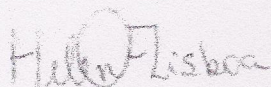
Título:	Processo de produção do pigmento melanina pelo fungo <i>Aspergillus nidulans</i>
Titulares:	Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventores:	Sandra Regina Pombeiro Sponchiado, Gabriela Santana de Sousa, Helen Cristina Fávero Lisboa e Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves

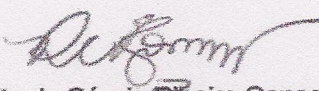
Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que, nos termos da Resolução nº 34, de 12 de fevereiro de 2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN, e da Resolução nº 207, de 24 de abril de 2009, do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2018.


Sandra Regina Pombeiro Sponchiado


Gabriela Santana de Sousa


Helen Cristina Fávero Lisboa


Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO**, brasileira, casada, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 050.744.508-29, portadora do documento de identidade RG nº 9.825.689, SSP/SP, residente em Araraquara (SP), na Rua Prof. Francisco Degni, Quitandinha, CEP 14800-060; 2. **GABRIELA SANTANA DE SOUSA**, brasileira, solteira, estudante de mestrado, inscrita no CPF/MF sob o nº 398.470.448-80, portadora do documento de identidade RG nº 43.623.719-2, SSP/SP, residente em Matão (SP), na Rua: João Pessoa, Centro, CEP 15990-020; 3. **HELEN CRISTINA FÁVERO LISBOA**, brasileira, casada, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 267.396.568-86, portadora do documento de identidade RG nº 25.677.626-X, SSP/SP, residente em Rondonópolis (MT), na Av. Binário Norte, 4175, Jd. Village do Cerrado, CEP 78.735-000; 4. **RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONÇALVES**, brasileira, solteira, farmacêutica, inscrita no CPF/MF sob o nº 246.122.678-42, portadora do documento de identidade RG nº 27.146.377-6, SSP/SP, residente em Vila Velha (ES), na Av. Piratininga, 33, Praia da Costa, CEP 29101-220.

Cessionária: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

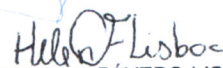
Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**Processo de produção do pigmento melanina pelo fungo Aspergillus nidulans**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

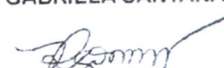
Araraquara, 13 de novembro de 2017.

Cedentes:


SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO


HELEN CRISTINA FÁVERO LISBOA


GABRIELA SANTANA DE SOUSA


RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONÇALVES

Cessionária:


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR

Testemunhas:


1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55


2. Sabrina Paduan
CPF/MF: 389.723.218-93

17AUIN015

PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO ASPERGILLUS NIDULANS

[001] CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente patente de invenção descreve um processo para maior produção do pigmento melanina usando o mutante MEL1 de *Aspergillus nidulans*. O método compreende duas etapas de crescimento do fungo em meio quimicamente definido usando água de maceração de milho como fonte nutricional de baixo custo, sob condições ótimas de pH, temperatura, concentração de AMM na pré-cultura, concentração de AMM na cultura, concentração de esporo, concentração de pré-inóculo, concentração de Tween e velocidade de agitação, as quais foram determinadas por planejamento fatorial e análise de superfície resposta. No final do processo, a biomassa é separada do caldo da cultura para posterior extração do pigmento melanina, o qual tem potencial aplicação em várias áreas.

[003] ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Os pigmentos sintéticos são muito utilizados na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos, porém muitos corantes sintéticos artificiais apresentam efeitos potencialmente prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (MAPARI, S. A. S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? Trends in Biotechnology, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010. MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. Current Opinion in Biotechnology, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005.)

[005] Uma alternativa tem sido a produção de pigmentos a partir de fontes microbianas. Os 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 (DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. Current Opinion in Biotechnology, v. 26, p. 56-61, 2014.).

[006] O estado da técnica descreve diversos processos de produção de pigmentos a partir de microrganismos. O documento BR102013015305 descreve um processo de produção e aplicação de pigmento oriundo do fungo *Fusarium oxysporum*.

[007] O documento BR112012021846 descreve um processo para produção de violaceína e deoxiviolaceína contendo pigmento bioativo de *Chromobacterium sp.* (MTCC 5522)

[008] O documento BRPI1005241 descreve um processo para obtenção de pigmentos liberados no meio, em cultivos de microalgas da classe Eustigmatophyceae.

[009] O documento JP2700839 descreve um processo de obtenção de pigmento vermelho a partir de fungo do gênero *Monascus*.

[010] O documento CN103232724 descreve fermentação líquida de *Aspergillus niger* para extração de pigmento vermelho.

[011] Dentre estes microrganismos, encontramos o fungo *Aspergillus nidulans*, uma espécie filamentosa da classe dos Ascomicetos, que pode ser encontrado em solos moderadamente quente e sobre plantas apodrecidas. Tem sido muito estudado por apresentar vantagens experimentais que podem ser resumidas em: crescimento rápido em meio quimicamente definido sob ampla faixa de temperatura e pH; formação de colônias compactas em meio sólido;

presença dos ciclos assexual e sexual curtos, além do ciclo parassexual e esporos sexuais com núcleos diploides, relativamente estáveis, adequados para os testes de ação gênica. E ainda fornece um excelente sistema para estudo genético do desenvolvimento e regulação do ciclo celular (WARD, O. P. et al. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. Advances in Applied Microbiology, v. 58, p. 1-75, 2005.).

[012] Alguns fungos, incluindo o *Aspergillus nidulans*, produzem pigmentos escuros, conhecidos como melaninas, que estão presentes na parede celular de hifas e esporos e/ou também no meio extracelular, tal como polímeros solúveis (ELLIS, D. H.; GRIFFITHS, D. A. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. Canadian Journal of Microbiology, v. 20, p. 1379-1386, 1974; GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and fungi. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 16, n. 2, p. 91-96, 2003.).

[013] Melaninas são classificadas como um dos principais pigmentos naturais, pois são sintetizadas por membros de todos os reinos biológicos, incluindo uma grande variedade de fungos e bactérias (NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cellular Microbiology, v. 5, p. 203-223, 2003.). Este pigmento é formado durante o metabolismo secundário do fungo a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, formando pigmentos hidrófobos carregados negativamente de elevado peso molecular e associado ao processo de esporulação do microrganismo, sendo requerido para a formação ou integridade de esporos sexual e assexual. As melaninas tipicamente são de cor escura (geralmente pretas ou castanhas), insolúveis em fluídos aquosos ou orgânicos, resistentes ao ácido concentrado e susceptíveis ao branqueamento por agentes oxidantes

(BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 1115-1136, 1998.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 11, p. 3519-3528, 2006).

[014] A estrutura da melanina permanece mal definida. As metodologias clássicas não podem ser aplicadas para decifrar a estrutura da melanina porque este polímero é insolúvel em fluídos aquosos ou orgânicos e qualquer tentativa de solubilização pode alterar a sua estrutura (NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: what do we know about structure? *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.01463.).

[015] Nos fungos, vários tipos diferentes de melanina foram identificados, sendo classificadas de acordo com os seus precursores: glutaminil-3,4-dihydroxibenzeno (GDHB) ou catecol ou 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) ou 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA). Nos basidiomicetos foram identificadas a GDHB- e a catecol-melanina, enquanto a maioria dos ascomicetos produzem a DHN-melanina. Entretanto, algumas espécies de fungos são capazes de sintetizar DOPA-melanina por uma via semelhante à biossíntese de melanina em humanos (LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 38, p. 143-158, 2003.; PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, n. 3, p. 429-443, 2006; EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.).

[016] Vários estudos têm mostrado que o pigmento melanina, extraída

de vários microrganismos, exibem diversas atividades biológicas, incluindo antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, foto- e radio-protetora, imunomoduladora e antitumoral (SOLANO, F. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 2014. doi:10.1155/2014/498276.; SPONCHIADO, S. R. P. et al. Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. In: BLUMENBERG, M. (Ed.). *Melanin*. Rijeka: InTech, 2017. doi:10.5772/67375).

[017] No entanto, para viabilizar a produção em larga escala e com custo menor comparado ao da melanina sintética, é necessário desenvolver processos fermentativos de menor custo e ambientalmente sustentáveis. Uma alternativa é a utilização de meios de cultivo de baixo custo, pois este é um fator crítico na determinação de processos de fermentação economicamente viáveis (DURÁN, N. et al. Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 42, n. 1, p. 53-66, 2002).

[018] Atualmente, as pesquisas têm demonstrado um grande interesse na utilização de subprodutos agroindustriais 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, em processos fermentativos para obter produtos de valor agregado, como pigmentos microbianos (PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, p. 70-76, 2015.). Esses subprodutos 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

produzidos em grande quantidade apresentam baixo preço. A utilização destes subprodutos também contribui para a preservação do meio ambiente, pois minimiza os problemas gerados pelo descarte destes resíduos.

[019] A água de maceração de milho, subproduto na moagem da indústria de milho, pode ser utilizado para crescimento de microrganismos, pois possui em sua composição elementos orgânicos e inorgânicos que podem satisfazer as exigências nutricionais dos microrganismos. A água de maceração de milho constitui uma fonte rica em carboidratos, aminoácidos livres, pequenos peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato, podendo substituir componentes caros como o extrato de levedura (PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, p. 70-76, 2015.).

[020] Hamano e Kilikian (HAMANO, P. S.; KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.) avaliaram a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* em diferentes composições de meios de cultura e verificaram que os cultivos em meio contendo glicose 10 g L⁻¹, água de maceração de milho 5 g L⁻¹ e glutamato monossódico 7,6 g L⁻¹ apresentaram os maiores valores de produtividade do pigmento quando comparados ao meio sintético.

[021] Pretti (PRETTI, T. S. Otimização das condições de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009) avaliou a utilização de subprodutos industriais

(água de maceração de milho, hidrolisado do bagaço de cana de açúcar e melaço) como fontes de nutrientes para o crescimento e produção de pigmento melanina pela linhagem MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*. Os resultados mostraram que na presença de 2% de água de maceração de milho, o crescimento celular foi maior que na concentração de 0,2%, porém nessa menor concentração houve um aumento na produção de pigmento pelas linhagens em estudo.

[022] Masetto e colaboradores (MASETTO, A. et al. Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 92, n. 1, p. 55-58, 2001.) observaram que a suplementação de 4,6% de água de maceração de milho no cultivo de *Flavobacterium sp* resultou em um aumento de 86% na produção de zeaxantina.

[023] Khan et al. (KHAN, I. et al. Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. doi:10.1007/s00253-013-5326-7.), verificou que a adição de 0,5% (v/v) de água de maceração de milho no cultivo de *Penicillium viticola* 152 estimulou a produção de malato de cálcio e obteve um rendimento de 1,28 g.g⁻¹.

[024] Berger et al. (BERGER, L. R. R. et al. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. Molecules, v. 19, n. 3, p. 2771-2792, 2014.), também utilizou a água de maceração de milho como nutriente no cultivo de *Cunninghamella elegans* e observou uma maior produção de quitina e quitosana quando utilizou 4% de água de maceração de milho.

[025] Araújo (ARAÚJO, H. W. C.; FUKUSHIMA, K.; TAKAKI, G. M. C. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using

renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 6931-6940, 2010.) relatou que o cultivo de *Serratia marcescens* produziu o maior nível de prodigiosina ($49,5 \text{ g L}^{-1}$) quando utilizou 2% de água de maceração de milho, provavelmente devido aos carboidratos presentes na AMM desempenharem um papel no crescimento celular, o que favoreceu o aumento da produção de prodigiosina.

[026] As pesquisas de produção de pigmentos utilizando microrganismos vêm focando não somente a seleção de linhagens produtoras, mas também a otimização das condições de cultivo, visando um aumento na produção do pigmento com redução de custos do bioprocesso para posterior aplicação em escala industrial (MAPARI, S. A. S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010.). Vários trabalhos têm mostrado que a produção de pigmentos em fungos pode ser afetada pela composição do meio de cultura, concentração de inóculo, pH e temperatura de crescimento (VALDUGA, E. et al. Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. *Quimica Nova*, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.).

[027] O método de otimização tradicional consiste em alterar uma variável independente enquanto mantém as outras variáveis em um nível fixo. Esse método demanda muito tempo, é trabalhoso e tem um gasto excessivo de reagentes, levando a um incompleto entendimento do comportamento do sistema (QI, B. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. *Industrial Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 15, p. 7346-7353, 2009.). A razão para isso é que as variáveis podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para

uma delas pode depender do valor da outra, esse comportamento que chamamos de interação entre os fatores, é um fenômeno que ocorre com muita frequência (BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Porto Alegre: Bookman, 2010.).

[028] Uma abordagem alternativa e mais eficiente é o uso planejamento fatorial que é uma técnica de modelagem empírica para a avaliação da relação de um conjunto de fatores experimentais através dos resultados observados. Essa é uma poderosa ferramenta matemática que pode analisar o efeito de múltiplas variáveis ou fatores, sozinhos ou em combinação, num dado processo de forma rápida e eficiente com um número mínimo de experimentos, mantendo um elevado nível de significância estatística nos resultados (ZHANG, M. et al. Production and characterization of melanin by submerged culture of culinary and medicinal fungi *Auricularia auricula*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 176, n. 1, p. 253-266, 2015.; SHARMILA, G.; NIDHI, B.; MUTHUKUMARAN, C. Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. Industrial Crops and Products, v. 44, p. 158-164, 2013.; PRAJAPATI, V. S.; SONI, N.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 2, p. 140-145, 2014.).

[029] Dessa forma, tendo em vista o grande potencial biotecnológico da melanina produzido pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*, é objeto da presente patente de invenção descrever um processo para maior produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*, usando água de maceração de milho como fonte

nutricional de baixo custo, sob condições ótimas de pH, temperatura, concentração de AMM na pré-cultura, concentração de AMM na cultura, concentração de esporo, concentração de pré-inóculo, concentração de Tween e velocidade de agitação, as quais foram determinadas por planejamento fatorial e análise de superfície resposta.

[030] BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[031] A figura 1 apresenta o Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis pH(1), temperatura(2), concentração de AMM na pré cultura(3), concentração de AMM na cultura(4), concentração de esporo(5), concentração de pré-inóculo(6), concentração de Tween(7) e velocidade de agitação(8) que impactam nas condições de cultivo do mutante MEL 1 para uma maior produção do pigmento melanina.

[032] A figura 2 apresenta o Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis independentes temperatura(1), concentração de esporo(2), concentração de Tween(3) e velocidade de agitação(4) e de suas interações em relação a produção do pigmento pelo fungo.

[033] A Figura 3 apresenta o gráfico superfície de resposta do planejamento completo para a produção do pigmento em função das variáveis temperatura e velocidade de agitação, considerando as variáveis concentração de esporos e concentração de Tween 80 fixadas no nível zero (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2 = 0,92627$).

[034] A figura 4 apresenta o Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis independentes temperatura(1) e velocidade de agitação(2) e de suas interações em relação a produção do pigmento pelo fungo.

[035] A figura 5 apresenta a superfície de resposta do planejamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) para as variáveis

temperatura e velocidade de agitação (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2=0,91858$).

[036] As figuras 6a e 6b apresenta o perfil de contorno das variáveis temperatura e velocidade de agitação do DCCR (6a) e do planejamento completo (6b).

[037] A figura 7 apresenta as imagens do cultivo do mutante MEL1 nas condições antes e após a otimização.

[038] DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[039] Para obter a condição ótima de cultivo do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* para uma maior produção do pigmento melanina, foi utilizado o mutante MEL1 desse fungo o qual apresenta auxotrofia para inositol (inoB1) e produção aumentada do pigmento DOPA-melanina (melC1) (GONÇALVES, R. de C. R.; LISBOA, H. C. F.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, p. 1467-1474, 2012.).

[040] Para o crescimento das linhagens foi utilizado o meio mínimo descrito por Cove (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.), com a seguinte composição: 10 mL de solução de sais, 1 mL de solução de elementos traços, sendo o volume completado até 1000 mL com água destilada. Após autoclavagem, a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos, foram adicionados ao meio as fontes de carbono (glicose 55 mol L⁻¹), nitrogênio (nitrato de sódio 70 mol L⁻¹) e o requerimento nutricional (inositol 20 mg L⁻¹). Para a preparação do meio mínimo sólido foi adicionado 1,5% de ágar antes da autoclavagem.

[041] A solução de sais foi preparada segundo Cove (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.), apresentando a seguinte composição: Fosfato de potássio monobásico (14 g); Fosfato de potássio bibásico (6,86 g), Cloreto de potássio (1,0 g), Sulfato de magnésio (1,0 g), Água destilada em q.s.p.

[042] A solução de elementos traços foi descrita por Cove (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.), sendo 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) e Água destilada até completar 100 mL.

[043] Água de maceração de milho (AMM), previamente filtrada para remoção de resíduos e esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121°C, foi adicionada ao meio mínimo suplementado com nitrato de sódio, glicose e inositol. A AMM é um subproduto obtido da moagem do milho que possui na sua composição: 40,8% proteína, 16% ácido láctico, 12,8% açúcares redutores e 30,4% de outros compostos, sendo utilizada como uma excelente fonte de carbono e nitrogênio de baixo custo.

[044] Os esporos do fungo foram obtidos após o crescimento do mutante MEL1 em meio mínimo sólido suplementado com nitrato de sódio, glicose e inositol por 5 dias a 37°C. Após este período, realizou-se a raspagem dos conídios, os quais foram coletados em 5 mL de solução salina 0,85% e, em seguida filtrados em lã de vidro. O número de conídios por mililitro foi estimado por meio da contagem em câmara de Neubauer, usando microscópio Zeiss (objetiva de 40x). A partir do valor obtido foi calculado o volume a ser inoculado para a concentração final desejada (10^5 ou 10^6 esporos mL^{-1} de meio).

[045] Para uma maior pigmentação da biomassa do mutante MEL1, o cultivo foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, denominada de Pré-cultura, com o objetivo de estimular o crescimento do fungo, o cultivo foi realizado em frascos (Erlenmeyer de 500 mL) contendo 200 mL de meio mínimo suplementado com glicose (55 mol L^{-1}), nitrato de sódio (70 mol L^{-1}), inositol (20 mg L^{-1}), AMM (1% ou 2%), inoculados com esporos (1×10^5 ou 1×10^6) e mantidos por 48 h sob agitação constante (100 rpm ou 200 rpm) em diferentes temperaturas (28°C ou 37°C). Na segunda etapa, denominada de cultura, foi realizada a transferência da massa micelial (10% ou 20%), obtida na etapa da pré-cultura, para frascos (Erlenmeyer de 500 mL) contendo 200 mL de meio mínimo da mesma composição da pré-cultura, porém, suplementado com menor concentração de AMM (0,1% ou 0,2%) na presença ou não de 2% de uma solução de Tween 80 (50%), e mantidos por 3 dias, sob agitação constante (100 rpm ou 200 rpm) em diferentes temperaturas (28°C ou 37°C). Ao final desse período de cultivo, a biomassa obtida foi separada do caldo de cultivo por filtração a vácuo, posteriormente foi lavada com água bidestilada e seca em estufa a $55\text{-}60^\circ\text{C}$ até peso constante. A biomassa seca foi pesada e guardada a -4°C para a posterior extração do pigmento.

[046] Para a análise comparativa, foi realizado também o cultivo do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans* na condição inicial (antes da otimização), a qual foi feita em apenas uma etapa e não foi adicionada água de maceração de milho. Nessa condição inicial, as linhagens foram inoculadas com esporos (1×10^5 esporos mL^{-1}) em meio mínimo (descrito no item 3.1) suplementado com glicose (55 mol L^{-1}), nitrato de sódio (70 mol L^{-1}) e inositol (20 mg L^{-1}) e o fungo foi mantido a 37°C por 5 dias, sob agitação constante de 200 rpm. Ao final desse período de cultivo, a biomassa obtida foi separada do caldo de cultivo

por filtração a vácuo, posteriormente foi lavada com água bidestilada e seca em estufa a 55-60°C até peso constante. A biomassa seca foi pesada e guardada a -4°C para a posterior extração do pigmento.

[047] A extração do pigmento melanina presente na massa micelial foi feita seguindo o método descrito por Sava et al. (2001) com algumas modificações. Em um frasco contendo a biomassa foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹, na proporção 1:10 (m/v) seguida de autoclavagem a 121°C por 20 minutos e filtração em bomba de vácuo. Este procedimento foi repetido várias vezes até a completa descoloração da massa micelial. O filtrado contendo o pigmento extraído foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) concentrado até pH 2,0, deixado em repouso por 7 dias e fervido por 10 minutos. Após isso, foi feita a lavagem do sedimentado (5 vezes) com água destilada seguida de centrifugação (centrifuga Sorvall Biofuge Primo R) por 15 minutos a 2576 xg. O pigmento obtido foi seco em estufa a 55 – 60°C.

[048] Conforme apresentado na tabela 1, foram realizados 16 experimentos para avaliar a influência das variáveis independentes (pH, temperatura, concentração de água de maceração de milho na pré-cultura e na cultura, concentração de esporos e do pré-inóculo, concentração de Tween e velocidade de agitação) para a produção de pigmento.

[049] Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴ com as oito variáveis independentes, sendo produção de pigmento e de biomassa são as variáveis resposta.

Exp	pH	Temp (°C)	AMM P.C. (%)	AMM C. (%)	Esporos (con/mL)	Inóculo (%)	Tween (%)	Veloc. Agitação (rpm)	Produção biomassa (g.L ⁻¹)	Produção pigmentos (mg.g ⁻¹)
1	6,8	28	1	0,1	10 ⁶	10	0	100	4,31 ± 0,09	81,76 ± 2,36
2	8	28	1	0,1	10 ⁵	20	0,2	100	5,69 ± 0,32	57,43 ± 0,00
3	6,8	37	1	0,1	10 ⁵	20	0	200	5,80 ± 0,12	133,10 ± 2,64
4	8	37	1	0,1	10 ⁶	10	0,2	200	3,47 ± 0,13	51,02 ± 7,30

5	6,8	28	2	0,1	10^5	20	0,2	200	$5,68 \pm 0,44$	$84,63 \pm 13,44$
6	8	28	2	0,1	10^6	10	0	200	$4,16 \pm 0,11$	$110,67 \pm 18,10$
7	6,8	37	2	0,1	10^6	10	0,2	100	$5,39 \pm 0,17$	$20,85 \pm 1,31$
8	8	37	2	0,1	10^5	20	0	100	$5,30 \pm 0,23$	$79,36 \pm 8,71$
9	6,8	28	1	0,2	10^5	10	0,2	200	$4,04 \pm 0,08$	$134,10 \pm 19,30$
10	8	28	1	0,2	10^6	20	0	200	$4,47 \pm 0,03$	$101,04 \pm 18,95$
11	6,8	37	1	0,2	10^6	20	0,2	100	$6,91 \pm 0,55$	$26,90 \pm 3,17$
12	8	37	1	0,2	10^5	10	0	100	$4,31 \pm 0,30$	$109,38 \pm 9,36$
13	6,8	28	2	0,2	10^6	20	0	100	$6,17 \pm 0,16$	$113,46 \pm 27,43$
14	8	28	2	0,2	10^5	10	0,2	100	$5,47 \pm 0,05$	$72,22 \pm 8,45$
15	6,8	37	2	0,2	10^5	10	0	200	$4,57 \pm 0,04$	$89,67 \pm 0,76$
16	8	37	2	0,2	10^6	20	0,2	200	$6,11 \pm 0,08$	$47,44 \pm 3,97$

[050] Analisando os dados obtidos nos 16 experimentos realizados, é verificado que as condições de cultivo afetam o crescimento do fungo, pois a produção de biomassa (g L^{-1}) apresentou uma variação na faixa de 3,47 a 6,91 g L^{-1} para as condições testadas. Em relação à produção de pigmento, nota-se que houve uma grande variação entre os resultados obtidos, com valores entre 20,85 a 134,10 mg L^{-1} , indicando um maior efeito das condições de cultivo nesse parâmetro.

[051] Comparando as condições de cultivo para obter maior produção de biomassa (experimento 11) com aquelas que resultaram em uma maior produção de pigmento (experimento 9), verifica-se que a temperatura, concentração de esporos e pré-inóculo e velocidade de agitação, foram as variáveis com os níveis diferentes entre os dois experimentos.

[052] Ao analisar a influência de cada variável (Figura 1), é verificado que a temperatura, concentração de esporos, concentração de Tween e velocidade de agitação, exercem um efeito importante na produção de pigmento. De acordo com as análises ANOVA, (Tabela 2), as variáveis mencionadas acima apresentaram um efeito significativo na

produção de pigmento, pois os valores de p foram inferiores a 0,1 (com o nível de significância de 90%) confirmando o que foi mostrado na Figura 1.

[053] Por outro lado, as variáveis pH, concentração de água de maceração de milho (na pré-cultura e na cultura) e concentração do pré-inóculo, não influenciaram de modo significativo a produção de pigmento, como pode ser visto na Figura 1 e Tabela 2.

[054] Tabela 2 - Análises de variância (ANOVA) a 90% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos da produção de pigmento; SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática; Coeficiente de determinação $R^2 = 0,82945$.

Valores em negrito indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,1$) entre os grupos.

Fator	SQ	GL	MQ	F	P
pH	195,37	1	195,371	0,44669	0,525329
Temperatura	2440,36	1	2440,360	5,57956	0,050185
[AMM] P.C.	365,10	1	365,097	0,83474	0,391287
[AMM]C.	355,13	1	355,134	0,81197	0,397481
[Esporos]	2671,34	1	2671,339	6,10766	0,042747
[Inóculo]	43,30	1	43,296	0,09899	0,762214
[Tween]	6555,33	1	6555,331	14,98789	0,006120
Vel. Agitação	2263,62	1	2263,619	5,17546	0,057058
Erro	3061,63	7	437,375		
Total SQ	17951,17	15			

[055] Em função dos resultados obtidos na Tabela 1, em que as variáveis pH, concentração de água de maceração de milho (na pré-cultura e na cultura) e concentração de pré-inóculo, não influenciaram

a quantidade de pigmento produzido, seus valores foram definidos de acordo com os dados da Figura 1: a variável foi fixada no nível inferior (-1) quando o seu efeito no Diagrama de Pareto foi expresso por um valor negativo, enquanto que para aquelas variáveis, cujo valor do efeito foi positivo, foi considerado o valor da variável no nível superior (+1), como mostrado na Tabela 3.

[056] Tabela 3 - Variáveis e valores fixados no planejamento fatorial fracionado, de acordo com Diagrama de Pareto (Figura 1).

pH	[AMM] Pré-cultura	[AMM] Cultura	[Inóculo]
-1	-1	+1	-1
6,8	1%	0,2%	10%

[057] Para confirmar que o efeito das variáveis temperatura, concentração de esporos, concentração de Tween e velocidade de agitação, são realmente importantes na produção de pigmento pelo mutante MEL1, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4 com um total de 16 experimentos.

[058] Os resultados deste planejamento estão mostrados na Tabela 4, onde se pode observar que a maior produção de pigmento ($227,77 \text{ mg g}^{-1}$) foi obtida no experimento 15, com as seguintes condições: temperatura de 28°C ; inóculo de 10^6 conídios mL^{-1} ; 0,2% Tween e agitação de 200 rpm.

[059] Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 com as quatro variáveis independentes e a produção de pigmento como variável resposta.

Exp.	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Esporos (conídios mL^{-1})	Tween (%)	Velocidade agitação (rpm)	Produção de pigmentos (mg.g^{-1})
1	-1(28)	-1(10^5)	-1(0)	-1(100)	$79,17 \pm 6,87$
2	1(37)	-1(10^5)	-1(0)	-1(100)	$84,00 \pm 20,83$
3	-1(28)	1(10^6)	-1(0)	-1(100)	$104,82 \pm 9,30$
4	1(37)	1(10^6)	-1(0)	-1(100)	$79,60 \pm 6,06$

5	-1(28)	-1(10^5)	1(0,2)	-1(100)	$87,43 \pm 19,18$
6	1(37)	-1(10^5)	1(0,2)	-1(100)	$67,74 \pm 5,32$
7	-1(28)	1(10^6)	1(0,2)	-1(100)	$185,86 \pm 6,24$
8	1(37)	1(10^6)	1(0,2)	-1(100)	$28,27 \pm 2,62$
9	-1(28)	-1(10^5)	-1(0)	1(200)	$130,26 \pm 18,58$
10	1(37)	-1(10^5)	-1(0)	1(200)	$131,32 \pm 4,62$
11	-1(28)	1(10^6)	-1(0)	1(200)	$126,63 \pm 15,91$
12	1(37)	1(10^6)	-1(0)	1(200)	$76,61 \pm 7,57$
13	-1(28)	-1(10^5)	1(0,2)	1(200)	$174,62 \pm 8,39$
14	1(37)	-1(10^5)	1(0,2)	1(200)	$57,79 \pm 0,08$
15	-1(28)	1(10^6)	1(0,2)	1(200)	$227,77 \pm 8,03$
16	1(37)	1(10^6)	1(0,2)	1(200)	$18,66 \pm 2,08$

[060] Ao analisar o experimento 1, onde todas as variáveis estão no nível inferior -1 (temperatura de 28°C ; inóculo de 10^5 conídios mL^{-1} ; 0% Tween e agitação de 100 rpm), pode-se notar que a produção de pigmento foi maior (79,17 mg de pigmento por g de pigmento), comparado ao experimento 16, onde todas as variáveis estão no nível superior +1 (temperatura de 37°C ; inóculo de 10^6 conídios mL^{-1} ; 0,2% Tween e agitação de 200 rpm) e a produção de pigmento foi menor ($18,66 \text{ mg g}^{-1}$). Desse modo, nota-se que as variáveis estudadas têm uma grande influência na produção do pigmento pelo mutante MEL1.

[061] Os efeitos estimados das variáveis independentes e as suas interações em relação a variável resposta (produção de pigmento) estão apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 2).

[062] Como pode ser observado na Figura 2, as variáveis independentes temperatura e velocidade de agitação tiveram um efeito relevante sobre a produção de pigmento. Também nota-se que as interações da temperatura com a concentração de Tween, temperatura com a concentração de esporo, temperatura com a velocidade de agitação, concentração de esporo com a velocidade de agitação e concentração de esporo com a concentração de Tween,

também influenciaram a resposta. Essas conclusões foram confirmadas pela análise ANOVA (Tabela 5), cujo valor de p foi inferior a 0,05 para os parâmetros mencionados acima.

[063] Tabela 5 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos da produção de pigmento; SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática; Coeficiente de determinação $R^2 = 0,92627$. Valores em negrito indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Fator	SQ	GL	MQ	F	P
Temperatura	40978,83	1	40978,83	351,9196	0,000000
[Esporos]	161,15	1	161,15	1,3839	0,256645
[Tween]	159,62	1	159,62	1,3708	0,258813
Veloc.agitação	6429,50	1	6429,50	55,2155	0,000001
Temp._[espore]	12113,85	1	12113,85	104,0318	0,000000
Temp._[Tween]	23530,94	1	23530,94	202,0799	0,000000
Temp._veloc. agit	3926,53	1	3926,53	33,7204	0,000027
[esporos]_[Tween]	1514,56	1	1514,56	13,0068	0,002367
[esporos]_veloc. agit	1939,55	1	1939,55	16,6566	0,000870
[Tween] c/ veloc. agit	7,44	1	7,44	0,0639	0,803661
Erro Puro	1863,10	16	116,44		
Total SQ	97986,48	31			

[064] Deste modo, como as variáveis concentração de esporos e concentração de Tween não mostraram efeito significativo ($p > 0,05$), ambas foram fixadas no nível superior (+1), pois o valor do efeito estimado pelo Gráfico de Pareto foi positivo (Figura 2). Os valores fixos das variáveis não significativas (concentração de esporos e concentração de Tween) são mostrados na Tabela 6.

[065] Tabela 6 - Variáveis e valores fixados no planejamento fatorial completo, de acordo com Diagrama de Pareto (Figura 2).

Concentração de esporo	Concentração de Tween
+1	+1

10 ⁶	0,2%
-----------------	------

[066] A Figura 3 apresenta o gráfico superfície-resposta, no qual pode-se observar os efeitos simultâneos das variáveis independentes temperatura e velocidade de agitação, sobre a variável resposta produção de pigmento. O gráfico mostra o tipo de interações entre as duas variáveis testadas e a relação entre as respostas e os níveis testados de cada variável.

[067] Como mostrado na Figura 3, a temperatura teve um efeito significativo na produção de pigmento, sendo que esse efeito foi negativo. Isso quer dizer que temperaturas acima de 28°C não são favoráveis para a produção de pigmento. A temperatura de 28°C é considerada favorável para a maioria dos microrganismos terrestres por manter as suas propriedades fisiológicas no meio ambiente (GUNASEKARAN, S.; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp under submerged cultivation. African Journal of Biotechnology, v. 7, p. 1894-1898, 2008). Valduga et al. (VALDUGA, E. et al. Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. Quimica Nova, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.) em seus estudos com *Sporidiobolus salmonicolor* também observou menor produção de carotenóides com temperaturas acima de 28°C, provavelmente devido à desnaturação do sistema enzimático do microrganismo.

[068] A velocidade de agitação também influenciou significativamente a resposta e, como seu efeito foi positivo, pode-se dizer que aumentando a velocidade de agitação poderá ocorrer um aumento da produção de pigmento. Hajjaj e colaboradores (HAJJAJ, H. et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, p. 619-625, 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 (sem agitação). Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que a produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1 de *Aspergillus nidulans* só ocorreu quando o fungo cresceu sob agitação, pois em culturas estacionárias (não agitadas) nenhum pigmento foi produzido (LISBOA, H. C. F. Influência das condições de cultivo na produção de pigmento melanina pelo fungo *Aspergillus nidulans*. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003).

[069] Portanto, como existe a possibilidade de aumentar a produção de pigmento, variando a temperatura de crescimento e a velocidade de agitação, foi elaborado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , como mostrado na Tabela 7. Nesse planejamento composto central foi organizado inicialmente um planejamento fatorial 2^2 (experimentos de 1 a 4) com as variáveis normalizadas entre -1 e +1. Os experimentos de 5 a 8 representam os pontos axiais ou estrela, aqui neste caso, eles são normalizados entre -1,41 e +1,41. Já os experimentos de 9 a 12 mostram quatro réplicas no ponto central (variáveis normalizadas em 0). A resposta foi avaliada como produção de pigmento (mg g^{-1}).

[070] Tabela 7 – Matriz do Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 para as variáveis temperatura e velocidade de agitação em relação às respostas produção de pigmento e de melanina.

Exp	x1	x2	Produção Pigmento	Produção Melanina
-----	----	----	-------------------	-------------------

	Temperatura (°C)	Velocidade de Agitação (rpm)	(mg pigmento g biomassa ⁻¹)	(mg melanina g pigmento ⁻¹)
1	-1(24)	-1(80)	34,92 ± 4,61	10,07 ± 0,31
2	1(28)	-1(80)	24,39 ± 1,40	10,07 ± 0,73
3	-1(24)	1(200)	110,20 ± 7,45	23,01 ± 9,88
4	1(28)	1(200)	227,5 ± 7,78	136,40 ± 4,26
5	-1,41(23)	0(140)	81,55 ± 3,89	40,22 ± 3,22
6	1,41(29)	0(140)	169,94 ± 11,83	116,32 ± 9,98
7	0(26)	-1,41(55)	23,71 ± 3,12	6,84 ± 0,31
8	0(26)	1,41(225)	107,82 ± 3,57	51,40 ± 8,83
9	0(26)	0(140)	131,03 ± 4,11	57,79 ± 6,03
10	0(26)	0(140)	126,82 ± 5,95	54,71 ± 6,44
11	0(26)	0(140)	126,05 ± 1,08	96,84 ± 0,52
12	0(26)	0(140)	127,58 ± 1,01	97,02 ± 0,26

[071] Ao analisar a resposta produção de pigmento na Tabela 7, verifica-se que no experimento 4, usando temperatura 28°C e velocidade de agitação 200 rpm, foi obtido uma maior produção de pigmento (227,5 mg g⁻¹) e na mesma condição também foi observado uma maior concentração de melanina (136,40 mg g⁻¹).

[072] De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 4), foi possível observar que para o nível de significância considerado (5%), os parâmetros temperatura linear, velocidade de agitação linear, velocidade de agitação quadrática e a interação das variáveis temperatura e velocidade de agitação, apresentaram efeito significativo para o modelo matemático. Para todas as variáveis exceto a velocidade de agitação quadrática, o valor do efeito foi positivo na produção de pigmento (Figura 4).

[073] De acordo com as análises de variância (ANOVA) pode-se concluir que os modelos matemáticos propostos para a produção de pigmento se ajustou razoavelmente aos dados experimentais, pois os valores de p dos modelos são inferiores ao nível de significância considerado (5%) (Tabela 8).

[074] Tabela 1 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos da produção de pigmento; SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática; Coeficiente de determinação $R^2 = 0,92627$. Valores em negrito indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Fator	SQ	GL	MQ	F	P
Temperatura Linear	6740,35	1	6740,35	12,46473	0,012360
Temperatura Quadrática	0,72	1	0,72	0,00134	0,971991
Veloc.agitação Linear	19720,66	1	19720,66	36,46885	0,000932
Veloc.agitação Quadrática	5773,97	1	5773,97	10,67763	0,017084
Temp_Veloc. Agitação	4085,41	1	4085,41	7,55503	0,033352
Erro Puro	3244,52	6	540,75		
Total SQ	39849,65	11			

[075] A superfície de resposta do planejamento DDCR das variáveis temperatura e velocidade de agitação, representativa do modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança para produção de pigmento está representada na Figura 5. A superfície de resposta apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,91858.

[076] Ao observar a Figura 5 verifica-se que a temperatura mostrou um efeito significativo no nível superior, ou seja, temperaturas acima de 28°C contribuem para um aumento na resposta desejada.

[077] Entretanto, comparando o gráfico de contorno da superfície de resposta do planejamento completo e do DCCR (Figura 6 a e b), observa-se que o DCCR indica que temperaturas acima de 28°C são mais favoráveis para a produção de pigmento, enquanto que no planejamento completo foi observado que temperaturas abaixo de 30°C contribuem para um aumento na resposta desejada.

[078] Considerando esses resultados obtidos, podemos concluir que a temperatura ótima para a produção de pigmento está na faixa de 28 a 30°C. Para a maioria dos microrganismos, a temperatura é um sinal ambiental crítico para regular o processo de desenvolvimento, pois

influencia as atividades metabólicas e o crescimento microbiano (BABITHA, S. et al. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. Journal of Basic Microbiology, v. 47, p. 118-126, 2007.). Yongsmith et al. (YONGSMITH, B. et al. Fermentation and quality of yellow pigments from golden brown rice solid culture by a selected *Monascus* mutant. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, 2013. doi:10.1007/s00253-013-5106-4.) observou uma maior concentração de pigmento amarelo em uma cultura de *Monascus* crescida sob uma faixa de temperatura ótima de 28 a 32 °C. Subsaendee (SUBSAENDEE, T.; KITPREECHAVANICH, V.; YONGSMITH, B. Glucoamylase, pigments and monacolin K production on rice solid culture in flask and koji chamber using *Monascus* sp. KB9. Chiang Mai Journal of Science, v. 41, p. 1044-1057, 2014.) relatou que a temperatura de 30° C para o cultivo do fungo *Monascus* sp. foi a mais favorável para a formação de metabólitos secundários tais como pigmentos.

[079] Também se pode observar na Figura 5 que a velocidade de agitação obteve um efeito significativo no nível superior, ou seja, velocidades acima de 200 rpm, contribuem para um aumento na produção de pigmento. No entanto, a agitação máxima testada foi 225 rpm, devido ao cisalhamento dos “pellets”, que ocorreu com o aumento da velocidade de agitação.

[080] Em função desses resultados, também se pode concluir que a faixa ótima de velocidade de agitação foi de 200 a 225 rpm. De acordo com a literatura, a velocidade de agitação adequada conduz a uma melhor dispersão do substrato, nutrientes e oxigênio no meio e a sua correspondente disponibilidade para a célula (SINGH, R. S.; SOOCH, B. S.; PURI, M. Optimization of medium and process parameters for

the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*YS-1. Bioresource Technology, v. 98, p. 2518-2525, 2007.). Além disso, a agitação promove uma redução no tamanho das partículas de nutrientes, favorecendo a homogeneização de nutrientes no meio de cultura, proporcionando um aumento das taxas de transferência de massa e a absorção de nutrientes pelo fungo, o que favorece o crescimento do mesmo (HAQ, U. I.; BAIG, M. A.; ALI, S. Effect of cultivation conditions on invertase production by hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 21, p. 487-492, 2005).

[081] Os resultados do experimento de validação permitiram obter modelo quadrático para a produção de pigmento em função das variáveis temperatura e velocidade de agitação. As análises de regressão resultaram na Equação 1, sendo as variáveis independentes expressas em seus valores reais e a resposta (produção de pigmento) expressas em mg de pigmento por grama de biomassa. Os modelos matemáticos foram ajustados a um grau de confiança de 95%.

[082] Equação 1: Produção de pigmento (PP) = $399,5835 \pm 19,2138(29) \pm 0,0768(841) \pm 3,7535(225) \pm 0,0084(50625) \pm 0,2663(6525)$

[083] Comparando o cultivo do mutante MEL1 antes e após a otimização foi possível observar visualmente um aumento na pigmentação da biomassa do mutante na condição otimizada comparada a condição não otimizada, como mostrado na Figura 7.

[084] Esse comportamento foi confirmado com os dados referentes a quantificação do pigmento produzido pelo mutante MEL1 em ambas as condições de cultivo (Tabela 9).

[085] **Tabela 9** - Crescimento e produção do pigmento após o cultivo

mutante MEL1 antes e após a otimização das condições de cultivo.

Linhagem	Condição	Biomassa (g L ⁻¹)	Pigmento (mg g ⁻¹)
MEL 1	Antes otimização	1,23 ± 0,06	59,15 ± 17,36
MEL 1	Após otimização	4,86 ± 0,1	254,42 ± 8,49

[086] Como pode ser observado na Tabela 9, a produção de pigmento pelo mutante MEL1 na condição otimizada aumentou cerca de 430% em comparação ao cultivo na condição não otimizada. Isso pode ser explicado pelo fato de que a otimização das condições de cultivo, busca alcançar uma melhoria na produtividade do metabolismo microbiano, por meio da manipulação dos parâmetros físico-químicos e nutricionais, os quais podem alterar significativamente o rendimento do produto de interesse (SHARMILA, G.; NIDHI, B.; MUTHUKUMARAN, C. Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. Industrial Crops and Products, v. 44, p. 158-164, 2013.).

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans* caracterizado pela alta produção do pigmento melanina.
2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar água de maceração de milho (1%), como suplemento nutricional para uma maior produção de esporos pelo fungo em meio sólido, compreendendo as seguintes etapas:
 - a. Preparo do meio mínimo sólido, descrito por Cove (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.), contendo 1% de solução de sais e 0,1 % de solução de elementos-traços e 1,5% de ágar, seguida de esterilização por autoclavagem a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos;
 - b. Adição ao meio mínimo de 55 mol L⁻¹ de glicose, 70 mol L⁻¹ de nitrato de sódio, 20 mol L⁻¹ de inositol e 1% água de maceração de milho, previamente esterilizados em autoclave a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos;
 - c. Inoculação do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* e crescimento por cinco dias em temperatura de 25 a 40°C, preferencialmente entre 29 e 37°C;
 - d. Coleta dos esporos em solução salina (0,85%), seguida de filtração em lã de vidro, e estimativa do número de esporos presentes por mililitro da suspensão.
3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*, de acordo com as

reivindicações 1 e 2, caracterizado por utilizar a fermentação submersa, a suspensão de esporos obtido na etapa f do processo descrito na reivindicação 2 e a água de maceração de milho (1%), para um maior crescimento da biomassa do fungo em meio líquido, compreendendo as seguintes etapas:

- a. Preparo do meio mínimo líquido, como descrito por Cove (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.), contendo 1% de solução de sais e 0,1 % de solução de elementos-traços, seguida de esterilização por autoclavagem a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos;
- b. Posterior adição de 55 mol L⁻¹ de glicose, 70 mol L⁻¹ de nitrato de sódio, 20 mol L⁻¹ de inositol e 1% água de maceração de milho, previamente esterilizados em autoclave a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos;
- c. Inoculação do meio pela adição de esporos do mutante MEL1, na concentração de 1x10⁶ esporos por mililitro de meio;
- d. Crescimento do fungo por 48 h sob agitação constante de 225 rpm na temperatura entre 25 a 30°C, preferencialmente 29°C;
- e. Coleta da biomassa por centrifugação, filtração ou outro meio conveniente de separação.

4. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*, de acordo com as reivindicações 1 e 3, caracterizado por utilizar a fermentação submersa, a água de maceração de milho (0,2%) e a biomassa obtida na etapa d do processo descrito na reivindicação 3, para

maior produção do pigmento melanina pelo fungo em meio líquido, compreendendo as seguintes etapas:

- a. Preparo do meio mínimo líquido, como descrito por Cove (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.), contendo 1% de solução de sais e 0,1 % de solução de elementos-traços, seguida de esterilização por autoclavagem a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos;
- b. Posterior adição de 55 mol L⁻¹ de glicose, 70 mol L⁻¹ de nitrato de sódio, 20 mol L⁻¹ de inositol, 0,2% de água de maceração de milho e 2% da solução de Tween 80 (50%), previamente esterilizados em autoclave a 121,1°C (1kgf/cm²) por 20 minutos;
- c. Transferência da massa micelial, obtida na etapa d do processo descrito na reivindicação 3, correspondendo a 10% do volume total da cultura;
- d. Separação da biomassa do caldo de cultivo por filtração a vácuo e posterior lavagem com água destilada;
- e. Secagem da biomassa na temperatura entre 55 a 60°C até peso constante.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*, de acordo as reivindicações 1 e 4, caracterizado por utilizar a biomassa obtida na etapa e do processo descrito na reivindicação 4, para extração do pigmento melanina, compreendendo as seguintes etapas:

- a. Trituração da biomassa seca para a extração do pigmento usando solução de NaOH e temperatura de 120°C, seguida de precipitação em pH ácido e centrifugação.

b. Secagem e trituração do material sólido sedimentado para obtenção de um pó escuro contendo o pigmento melanina.

6. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*, de acordo com todas as reivindicações anteriores, caracterizado pelo potencial uso do pigmento melanina em produtos cosméticos, farmacêuticos, alimentícios e têxteis.

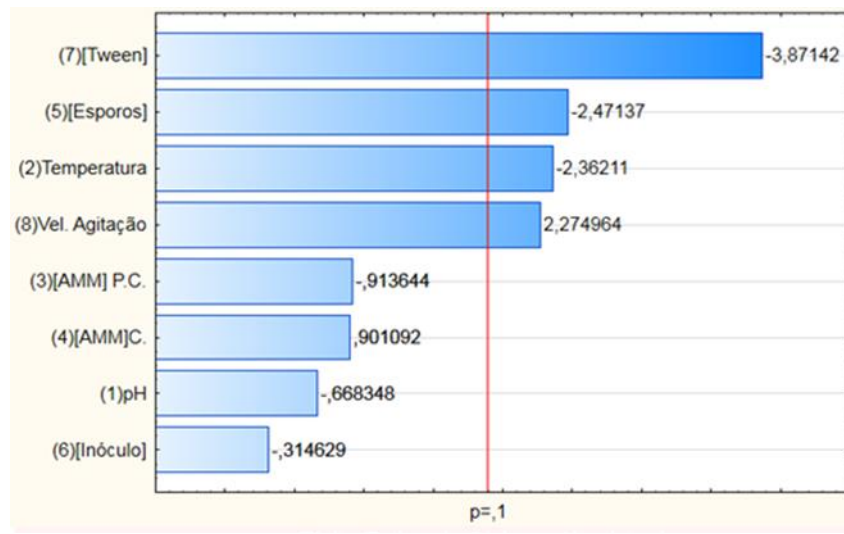


Figura 1

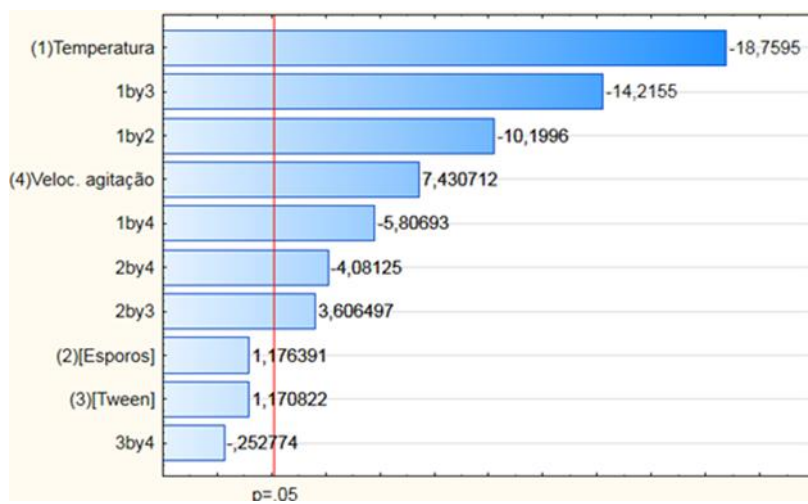


Figura 2

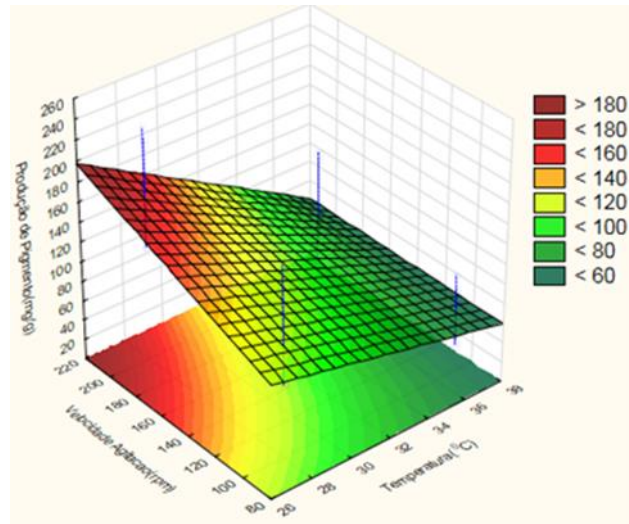


Figura 3

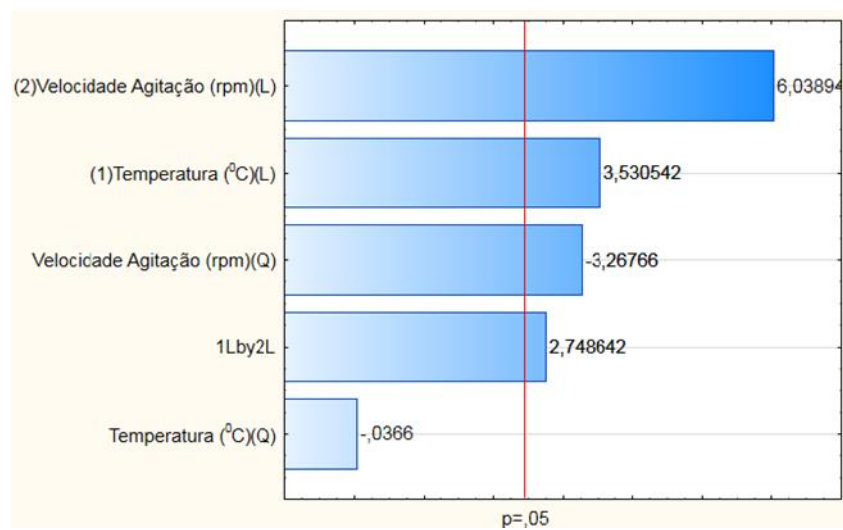


Figura 4

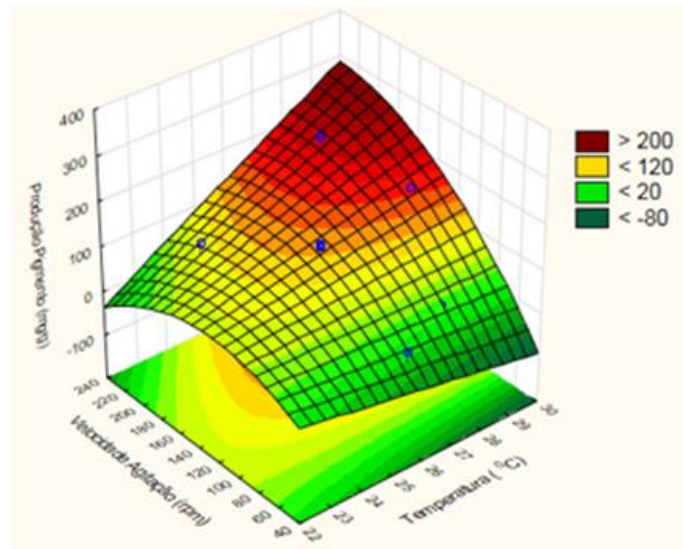


Figura 5

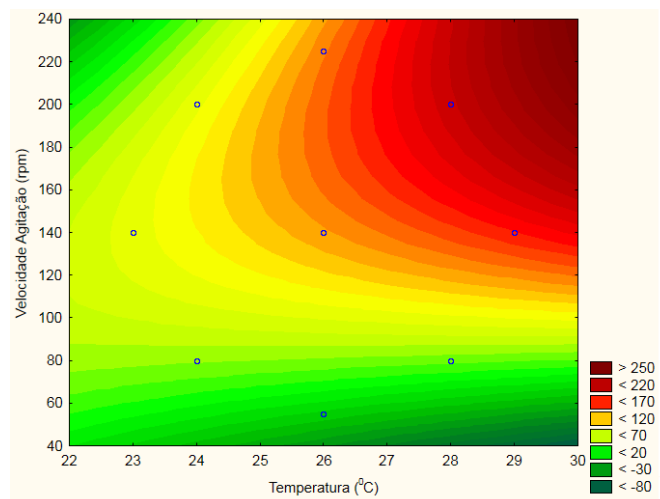
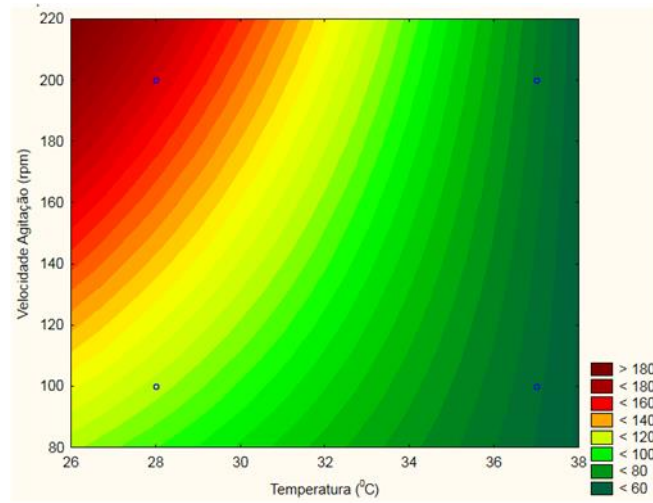
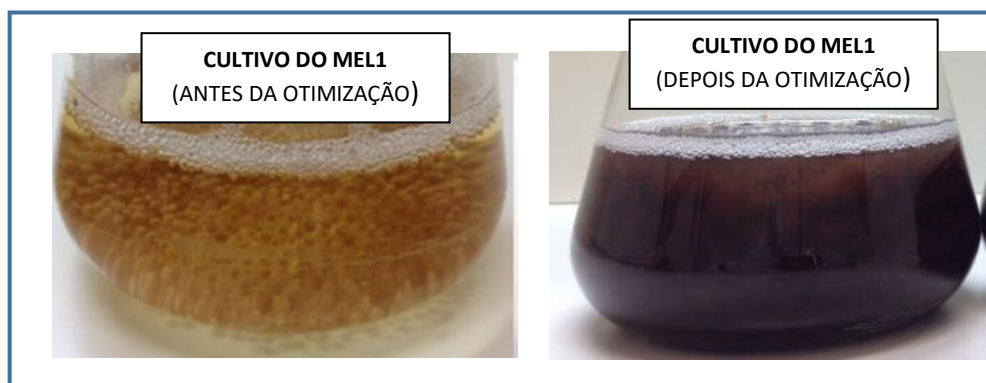


Figura 6a

**Figura 6b****Figura 7**

RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO ASPERGILLUS NIDULANS

É descrito um processo de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* (do mutante MEL1) para promover uma maior produção do pigmento melanina, sendo prevista uma primeira etapa, denominada de pré-cultura, com o objetivo de estimular o crescimento do fungo, usando água de maceração de milho (AMM) como meio de cultura, e ajuste nas variáveis que influenciam o cultivo do mutante MEL 1, e uma segunda etapa, denominada de cultura, onde a massa micelial da etapa de pré-cultura é adicionada em um meio mínimo com água de maceração de milho e ajuste das variáveis pH, temperatura, concentração de AMM na pré-cultura, concentração de AMM na cultura, concentração de esporo, concentração de pré-inóculo, concentração de Tween e velocidade de agitação, obtendo um aumento considerável na produção do pigmento com redução de custos do bioprocesso para posterior aplicação em escala industrial.