

**BEATRIZ SILVA CAMPANHOL**

**Otimização da produção de pigmento melanina  
por *Aspergillus nidulans* usando  
subprodutos agroindustriais como substrato  
para cultivo em frascos e biorreatores**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

Coorientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Kelly Johana Dussán Medina

**ARARAQUARA**

**2023**

C186o

Campanhol, Beatriz Silva

Otimização da produção de pigmento melanina por *Aspergillus nidulans* usando subprodutos agroindustriais como substrato para cultivo em frascos e biorreatores / Beatriz Silva Campanhol. -- Araraquara, 2023

103 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

Coorientadora: Kelly Johana Dussán Medina

1. Planejamento experimental. 2. Vinhaça. 3. Melanina. 4. *Aspergillus nidulans*. 5. Biorreatores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

Com base nos resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, os quais demonstraram que a melanina produzida pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* apresenta atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e também age como agente quelante para a recuperação de metal, esse pigmento tornou-se um material promissor para utilização nas áreas da medicina, farmacoscsmética e ambiental. Diante disso, o presente estudo tem como impacto potencial possibilitar um aumento na produção de melanina com redução de custos do processo em escala industrial, tornando possível uma futura aplicação biotecnológica desse pigmento em diferentes áreas.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

On the basis of the previous results obtained by our research group, which demonstrated that the melanin produced by the MEL1 mutant of *Aspergillus nidulans* exhibits antioxidant and anti-inflammatory activities and also acts as a chelating agent for metal recovery, this pigment has become a promising candidate for biotechnological applications in the fields of medicine, pharmacosmetics and the environment. In view of this, the potential impact of the present study is to enable an increase in melanin production with a reduction in process costs on an industrial scale, making possible a future biotechnological application of this pigment in different areas.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: "Otimização da produção de pigmento melanina por *Aspergillus nidulans* usando subprodutos agroindustriais como substrato para cultivo em frascos e biorreatores."

**AUTORA: BEATRIZ SILVA CAMPANHOL**

**ORIENTADORA: SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO**

**COORDINADORA: KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -UNESP - Araraquara

Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia Agro-Industrial e Sócio-Economia Rural / Universidade Federal de São Carlos -UFSCar - Araras

Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -UNESP - Araraquara

Araraquara, 13 de junho de 2023



**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Pombeiro Sponchiado**

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Beatriz Silva Campanhol

**Nome em citações bibliográficas:** CAMPANHOL, B.S.; CAMPANHOL, BEATRIZ SILVA

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química. Unesp – Campus de Araraquara. Jardim Quitandinha. 14800900 - Araraquara, SP – Brasil.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018 - Atual: Doutorado em andamento em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Otimização da produção de pigmento melanina por *Aspergillus nidulans* usando subprodutos agroindustriais como substrato para cultivo em frascos e biorreatores.

Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado.

Coorientador: Kelly Johana Dussán Medina.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2016 – 2018: Mestrado em Agricultura e Ambiente.

Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

Título: Efeito da solução nutriente na produção microbiana sequencial de ácido cítrico e etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça, Ano de Obtenção: 2018.

Orientador: Reinaldo Gaspar Bastos.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2011 – 2015: Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

Título: Efeitos dos processos produtivos convencionais e orgânicos sobre a atividade e biomassa microbiana de carbono do solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

Orientador: Silvana Perissatto Meneghin.

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

2021 – 2021: Inglês para pesquisadores: da escrita a publicação. (Carga horária: 6h). UNA Assessoria Linguística, UNA, Brasil.

2021 – 2021: Maratona da Neuroeducação 2.0. (Carga horária: 30h). Instituto Thais Faria Coelho, ITFC, Brasil.

2020 – 2020: Técnicas de Oratória. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

2019 – 2019: Planejamento e Otimização de Processos Industriais. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2018 – 2018: Bases de dados Clarivate Analytics. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2018 – 2018: Bases de dados da Elsevier. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 – 2016: Tópicos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (Carga horária: 10h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

2016 – 2016: Otimize suas pesquisas e trabalhos com o Portal de Periódicos CAPES. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

2014 – 2014: Pequenos RNAs e Controle da Expressão Gênica. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

2013 – 2013: Microbiologia Ambiental. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

### **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.**

Vínculo institucional

2018 - Atual: Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante de Pós-graduação (nível Doutorado), Regime de dedicação exclusiva.

Atividades

08/2018 – Atual: Pesquisa e desenvolvimento, Instituto de Química de Araraquara.

Linha de pesquisa: Biotecnologia industrial e Ambiental.

04/2021 – 08/2021; Estágio-docência, Instituto de Química de Araraquara.

Estagio realizado na Disciplina de Bioquímica Geral e Experimental II.

### **Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.**

Vínculo institucional

2016 – 2018: Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante de pós-graduação (nível Mestrado), Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

01/2016 - 02/2018: Pesquisa e desenvolvimento, Universidade Federal de São Carlos - Campus Araras.

Linha de pesquisa: Utilização sustentável dos recursos naturais e soluções para problemas agroambientais

01/2016 - 12/2017: Conselhos, Comissões e Consultoria, Universidade Federal de São Carlos - Campus Araras.

Cargo ou função: Titular – Representante Discente.

07/2016 - 12/2016: Estágios, Universidade Federal de São Carlos - Campus Araras.

Estagio realizado na Disciplina de Enzimologia.

**Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.**

Vínculo institucional

2012 – 2014: Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Membro, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

PIBID/CAPES - Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência. Este programa tem por fim aperfeiçoar e valorizar a prática docente para estudantes em processo de formação. Orientadora: Dra. Helka Fabbri Broggian Ozelo.

## **PRODUÇÕES**

- **Artigos completos publicados em periódicos:**

ROCHA, LAURA MACEDO; CAMPANHOL, BEATRIZ SILVA; BASTOS, REINALDO GASPAR. Solid-State Cultivation of *Aspergillus niger-Trichoderma reesei* from Sugarcane Bagasse with Vinasse in Bench Packed-Bed Column Bioreactor. APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, v. 193, p. 2983-2992, 2021.

CAMPANHOL, B. S.; SILVEIRA, G.C.; CASTRO, M.C.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; BASTOS, R.G. Effect of the nutrient solution in the microbial production of citric acid from sugarcane bagasse and vinasse. BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, v. 19, p. 101147, 2019.

- **Artigos aceitos para publicação**

CAMPANHOL, B. S.; RIBEIRO, B. D.; CASELLATO, F.; MEDINA, K. J. D.; SPONCHIADO, S. R. P. Improvement of melanin pigment production by *Aspergillus nidulans* using eco-friendly and inexpensive substrates. JOURNAL OF FUNGI, 2023.

- **Trabalhos completos publicados em anais de congressos:**

BASTOS, R. G.; FRANCA, H. C. R. ; CAMPANHOL, B. S.; SILVEIRA, G. C.; CASTRO, M. Sequential process of citric acid production in sugarcane bagasse by microbial consortium and ethanol fermentation from fungal extract.. In: ASABE Annual International Meeting, 2017, Spokane. ASABE Annual International Meeting, 2017.

CAMPANHOL, B. S.; SILVEIRA, G. C. ; CASTRO, M.C.; BASTOS, R. G. Citric acid production by microbial consortium from sugarcane bagasse: effect of ethanol and vinasse in moisturizing solution. In: XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) - XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), 2017, Aracaju. Anais do XXI SINAFERM - XII SHEB, 2017., 2017.

- **Resumos publicados em anais de congressos**

SILVEIRA, G. C. ; FRANCA, H. C. R.; CAMPANHOL, B. S. ; BASTOS, R. G. Ethanol fermentation of fungal extract by solid-state cultivation of *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse. In: VIII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2017, Rio Claro. Anais do VIII SMA, 2017, 2017.

SILVEIRA, G. C.; CAMPANHOL, B. S.; BASTOS, R. G. Perspectiva da produção de etanol a partir de extrato obtido via cultivo em estado sólido de consórcio fúngico em bagaço de cana-de-açúcar. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2017, Araras. Anais do XXIV CIC UFSCar, 2017.

FRACETTO, F. J. C.; FRACETTO, G. G. M.; PEDROSO, A.; CAMPANHOL, B. S.; SILVA, C. S.; STOROLLI, G. M.; ROSA, L. B. G.; BELOTO, L. M. Bactérias Desnitrificantes no Agrossistema do Solo de Cana-de-açúcar. In: II Semana dos Estudantes de Biologia, 2014, Araras. Bactérias Desnitrificantes no Agrossistema do Solo de Cana-de-açúcar, 2014.

FRACETTO, F. J. C.; FRACETTO, G. G. M.; BELOTO, L. M.; PEDROSO, A.; CAMPANHOL, B. S.; SILVA, C. S.; STOROLLI, G. M.; ROSA, L. B. G. Measurement of Denitrifying Bacteria in Agrosystem Sugarcane Soils. In: VI Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2013, Rio Claro. Measurement of Denitrifying Bacteria in Agrosystem Sugarcane Soils., 2013.

- **Apresentações de Trabalho:**

MEDEIROS, W. B.; CAMPANHOL, B. S.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Efeito da Granulometria da Biomassa no Processo de Extração da Melanina em Fungos. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

RIBEIRO, B. D.; CAMPANHOL, B. S.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* com substratos de baixo custo. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MACEDO, L. R.; CAMPANHOL, B. S.; CARACA, S. N.; ZUMPANO, C. B. C.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; BASTOS, R.G. Cultivo em Estado Sólido de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça: Produção de Ácido Cítrico em biorreator de bancada. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MACEDO, L. R.; CAMPANHOL, B. S.; CARACA, S. N.; ZUMPANO, C. B. C.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; BASTOS, R.G. Efeito da vinhaça e etanol como solução nutriente na Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MACEDO, L. R.; CAMPANHOL, B. S.; BASTOS, R.G. Efeito da altura de leito na produção de ácido cítrico por consórcio fúngico em biorreator de coluna a partir de bagaço de cana-de-açúcar. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SILVEIRA, G. C.; CAMPANHOL, B. S.; FRANCA, H. C. R.; BASTOS, R. G. Ethanol fermentation of fungal extract by solid-state cultivation of *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CAMPANHOL, B. S.; SILVEIRA, G. C. ; CASTRO, M.C; BASTOS, R. G.. Citric acid production by microbial consortium from sugarcane bagasse: effect of ethanol and vinasse in moisturizing solution. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BASTOS, R. G.; FRANCA, H. C. R.; SILVEIRA, G. C.; CAMPANHOL, B. S.; CASTRO, M. C . Sequential process of citric acid production in sugarcane bagasse by microbial consortium and ethanol fermentation from fungal extract. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

FRACETTO, F. C.; FRACETTO, G. G. M.; BELOTO, L. M.; PEDROSO, A.; CAMPANHOL, B. S.; SILVA, C. S.; STOROLLI, G. M.; ROSA, L. B. G. Bactérias Desnitificadoras no Agrossistema do Solo de cana-de-açúcar. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

BELOTO, L. M.; FRACETTO, F. C.; FRACETTO, G. G. M.; PEDROSO, A.; CAMPANHOL, B. S.; SILVA, C. S.; STOROLLI, G. M.; ROSA, L. B. G. Measurement of denitrifying bacteria in agrosystem sugarcane soils. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

FIORINI, B. R.; MARTARELLO, N. S.; SOUZA, I. A.; CAMPANHOL, B. S.; OLIVEIRA, E. H.; STEFANI, J. L.; BARBOSA, V. M. B.; MENEZHIN, S. P.; OZELO, H. F. B.; LUCA, L. Q. J.; SOUZA, P.. Uma Ferramenta eficaz para o aprendizado. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SOUZA, I. A.; CAMPANHOL, B. S.; CARNEIRO, F. G.; MOMO, D. H. Equação do 2º grau. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

## EVENTOS

- 4ª Escola de Pesquisadores do Campus USP São Carlos. 2020. (Outra).
- Eletroquímica-Técnicas de medição de pH. 2020. (Outra).
- Live con experto: como escribir un articulo científico. 2020. (Outra).
- X Simpósio Agroambiental e Jornada Agronômica 2020. 2020. (Simpósio).
- XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2020. (Congresso).
- 4º Congresso de Educação Profissional e Tecnológica. Congresso de Educação Profissional e Tecnológica. 2018. (Congresso).
- Oficina sobre o cadastro no SISGEN. 2018. (Oficina).
- VIII Congresso Farmacêutico da Unesp e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ia. 2018. (Congresso).
- XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos. Citric acid production by microbial consortium from sugarcane bagasse: effect of ethanol and vinasse in moisturizing solution. 2017. (Simpósio).
- XXIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar. XXIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar. 2017. (Congresso).
- VI Simpósio Agroambiental e Jornada Agronômica 2016. 2016. (Simpósio).
- III Semana dos Estudantes de Biologia. 2015. (Outra).
- II Semana dos Estudantes de Biologia. Bactérias Desnitrificadoras no Agrossistema do Solo de cana-de-açúcar. 2014. (Outra).
- 10ª Jornada Científica e Tecnológica da UFSCar. Uma Ferramenta Eficaz para o Aprendizado. 2013. (Congresso).
- III Encontro PIBID-UFScar: um balanço das ações compartilhada entre Universidade e Escola. Equação do 2º Grau. 2013. (Encontro).
- I Semana dos Estudantes de Biologia. 2013. (Outra).
- I Simpósio de linhas de pesquisas. 2013. (Simpósio).
- IV Encontro PIBID-UFScar: um balanço das ações compartilhadas entre Universidade e Escola. 2013. (Encontro).
- VI Simpósio de Microbiologia Aplicada. Measurement of Denitrifying Bacteria in Agrosystem Sugarcane Soils. 2013. (Simpósio).
- Cine PET. 2012. (Encontro).

- A Inclusão escolar no município de Araras. 2011. (Seminário).

#### **Organização de eventos, congressos, exposições e feiras:**

- CAMPANHOL, B. S.; SANTOS, P. H. V.; BERNARDO, C. P.; CIRINO, A. E. M.; MEDINA, A. F.; ROSA, L. B. G.; ROSARIO, V. A. C.; CAETANO, L. F.; TALLARICO, L. C.; OLIVEIRA, A. A. S.; STELUTTI, I. M.; FADIN, D. A.; SILVA, V. R.; CURIEL, A. C.; CAMPREGHER JUNIOR, J. C. VII Simpósio Agroambiental e Jornada Agronômica. 2017. (Outro).
- CAMPANHOL, B. S.. III Encontro PIBID-UFSCar: um balanço das ações compartilhadas entre Universidade e Escola. 2013. (Outro).

#### **SUPERVISÃO CIENTÍFICA**

##### **Iniciação científica:**

Beatriz Dias Ribeiro. Produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* com substratos de baixo custo. 2019. Iniciação Científica. (Graduando em Bacharelado em Química Tecnológica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Supervisor: Beatriz Silva Campanhol.

Dedico este trabalho a Deus que me  
permitiu viver esta experiência.

Aos meus pais e irmão pelo apoio,  
incentivo, amor e carinho.

Aos meus amigos pela convivência, apoio  
e atenção nos momentos tristes e alegres.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me permitido viver e a realizar este sonho.

Aos meus pais Eli e Valdirene, e ao meu irmão Hugo, por todo amor, carinho e por sempre estarem ao meu lado me apoiando em todos os momentos.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado, por ter acreditado em mim, ter sido paciente e ter me proporcionado grandes conhecimentos. Muito obrigada.

A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Kelly Johana Dussán Medina, por ter sido paciente e atenciosa para sanar todas as minhas dúvidas. Muito obrigada.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por estar sempre de prontidão e dispostos a ajudar.

Aos meus companheiros de Laboratório Fátima, Jazmina, William e Karen por todo apoio, amizade, troca de conhecimento e por tornarem a rotina no laboratório mais leve e agradável.

Aos amigos do departamento, Raul, Guilherme, Marcos, Rebeca, David, Fuller, Gabriela, Naiara, Carolina e Gregório, muito obrigada por todo ensinamento e amizade ao longo dessa jornada.

Aos amigos de longa data, que mesmo distante se fazem presente, para dar apoio, atenção e boas risadas. A Drielle, Caroline, Tamires, Camila Gruber, Ângela, Marília, Larissa, Isabela, Rafaela, Camila Azevedo e Tatiane obrigada por toda amizade.

E agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e contribuíram para que este dia chegasse. Obrigada.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, com a qual pude concretizar todo o trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Brasil CAPES – Código de financiamento 001.

## RESUMO

Com o grande interesse das indústrias pelo uso de pigmentos naturais em substituição aos corantes sintéticos, os fungos filamentosos destacam-se como uma fonte mais vantajosa por produzirem uma gama de pigmentos com altos rendimentos por meio de estratégias econômicas e sustentáveis. Em estudos anteriores foi demonstrado que a melanina extraída do mutante MEL1 de *Aspergillus nidulans* exibe atividades antioxidante e anti-inflamatória, não apresentando efeito citotóxico ou mutagênico, e também mostrou ser eficiente na remoção de metais em solução. Estes resultados sugerem que este pigmento pode ser considerado um material promissor para utilização nas áreas da medicina, farmacoscética e ambiental. Neste contexto, o presente estudo teve como principal objetivo otimizar a composição do meio usando melaço, vinhaça e água de maceração de milho para o cultivo em fermentação submersa do mutante MEL1, visando uma maior produção do pigmento melanina com menor custo. Também foi avaliada a produção de melanina nos reatores em escala de bancada, tanque agitado e coluna de bolhas. Com os resultados obtidos nos planejamentos experimentais, realizados em frascos, foi possível observar que a adição de 0,81 % (v/v) de vinhaça e 1,62 % (m/v) de glicose ao meio de cultura resultou na produção de  $291,74 \pm 4,59$  mg de melanina não purificada por g de biomassa, o que equivale a um aumento de 88% (acréscimo de 136,59 mg de melanina não purificada por g de biomassa) comparado as condições antes da otimização. Na condição otimizada, a produção da melanina purificada foi de  $225,39 \pm 4,52$  mg de melanina purificada por g de biomassa, equivalendo a um aumento de 125% (acréscimo de 125,07 mg de melanina purificada por g de biomassa) quando comparado as condições antes da otimização. Os resultados obtidos nos biorreatores mostraram que o cultivo em reator de coluna de bolhas resultou em maior produção de melanina não purificada ( $271,56 \pm 9,37$  mg g<sup>-1</sup> de biomassa) quando comparado ao cultivo em tanque agitado ( $231,11 \pm 21,09$  mg g<sup>-1</sup> de biomassa), chegando a uma produção total de 1,2 g L<sup>-1</sup>. Portanto, o cultivo do mutante MEL1 em biorreator de coluna de bolhas, utilizando o meio de cultura contendo glicose e vinhaça como substrato de baixo custo, torna o processo de produção da melanina pelo mutante MEL1 de *A. nidulans* economicamente viável para futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: otimização; vinhaça; melanina; *Aspergillus nidulans*; biorreator.

## ABSTRACT

Due to the great interest of industries for the use of natural pigments to replace synthetic dyes, filamentous fungi stand out as a more advantageous source for producing a range of pigments with high yields through economic and sustainable strategies. In previous studies, it was demonstrated that the melanin extracted from the MEL1 mutant of *Aspergillus nidulans* exhibits antioxidant and anti-inflammatory activities, not showing cytotoxic or mutagenic effects, and also proved to be efficient in removing metals in solution. These results suggest that this pigment can be considered a promising material for use in medicine, pharmacosmetics and environment. In this context, the main objective of the present study was to optimize the composition of the medium using molasses, vinasse and corn steep liquor for submerged fermentation cultivation of the MEL1 mutant, aiming at a greater production of the pigment melanin with lower cost. Melanin production in bench-scale using stirred tank and bubble column reactors was also evaluated. With the results obtained in the experimental design carried out in flasks, it was possible to observe that the addition of 0.81% (v/v) of vinasse and 1.62% (w/v) of glucose to the culture medium resulted in the production of  $291.74 \pm 4.59$  mg of unpurified melanin per g of biomass, which is equivalent to an increase of 88% (increase of 136.59 mg of unpurified melanin per g of biomass) compared to the conditions before optimization. In the optimized condition, the production of purified melanin was  $225.39 \pm 4.52$  mg of purified melanin per g of biomass, equivalent to an increase of 125% (increase of 125.07 mg of purified melanin per g of biomass) when compared to the conditions before optimization. The results obtained in the bioreactors showed that cultivation in a bubble column reactor resulted in greater unpurified melanin production ( $271.56 \pm 9.37$  mg g<sup>-1</sup> of biomass) when compared to cultivation in a stirred tank ( $231.11 \pm 21.09$  mg g<sup>-1</sup> of biomass), reaching a total production of 1.2 g L<sup>-1</sup>. Therefore, the cultivation of the MEL1 mutant in a bubble column bioreactor, using the culture medium containing glucose and vinasse as a low-cost substrate, makes the process of melanin production by the MEL1 mutant of *A. nidulans* economically viable for future biotechnological applications.

Keywords: optimization; vinasse; melanin; *Aspergillus nidulans*; bioreactor.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferentes pigmentos produzidos por fungos.....	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> Modelo para estrutura da eumelanina.....	<b>33</b>
<b>Figura 3.</b> Via de síntese de melanina em fungos.....	<b>34</b>
<b>Figura 4.</b> Morfologia do mutante MEL1 de <i>A. nidulans</i> em meio mínimo suplementado com glicose (1% m/v), nitrato de sódio (0,60% m/v), inositol (20 ppm) e com AMM (1% v/v).....	<b>42</b>
<b>Figura 5.</b> Cultivo de mutante MEL1 (etapa de cultura) em reator de tanque agitado com impelidor náutico.....	<b>47</b>
<b>Figura 6.</b> Cultivo do mutante MEL1 (etapa de cultura) em reator de coluna de bolhas com difusor circular de ar.....	<b>48</b>
<b>Figura 7.</b> Curva de referência de DOPA-melanina sintética.....	<b>50</b>
<b>Figura 8.</b> Gráfico de Pareto sobre a análises dos principais efeitos das variáveis independentes sobre a produção de melanina pelo mutante MEL1 em função do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ .....	<b>64</b>
<b>Figura 9.</b> Gráfico da Correlação de ordem de Spearman com os dados da produção de biomassa e melanina não purificada obtidos no DCCR $2^3$ .....	<b>70</b>
<b>Figura 10.</b> Gráfico de Pareto sobre a análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de melanina pelo mutante MEL1 em função do planejamento composto central rotacional (DCCR) $2^3$ .....	<b>71</b>
<b>Figura 11.</b> Superfície de resposta para a produção de melanina não purificada ( $\text{mg g}^{-1}$ de biomassa) pelo mutante MEL1 e a interação entre as variáveis independentes.....	<b>74</b>
<b>Figura 12.</b> Função de desejabilidade (com valores reais) para a produção de melanina não purificada ( $\text{mg g}^{-1}$ de biomassa) em função da combinação das variáveis independentes em seus níveis ótimos.....	<b>76</b>
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática da biossíntese da DOPA-Melanina em fungos. Reações 1 e 2 são catalisadas por tirosinase e reação 3 pode ser catalisada por tirosinase ou lacase.....	<b>80</b>
<b>Figura 14.</b> Cinética de crescimento, produção de melanina e consumo de glicose pelo mutante MEL1 durante o cultivo na condição otimizada.....	<b>83</b>
<b>Figura 15.</b> Velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ), velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e a velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ) em relação ao tempo do mutante MEL1.....	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ocorrência natural de pigmentos fúngicos do solo e sua aplicação sugerida.....	<b>31</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição química do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar, e água de maceração de milho.....	<b>43</b>
<b>Tabela 3.</b> Concentrações das variáveis independentes em diferentes níveis para o planejamento fracionado $2^{5-1}$ .....	<b>46</b>
<b>Tabela 4.</b> Concentrações das variáveis independentes em diferentes níveis para o delineamento composto central rotacional (DCCR).....	<b>47</b>
<b>Tabela 5.</b> Condições operacionais dos reatores de tanque agitado e coluna de bolhas.....	<b>49</b>
<b>Tabela 6.</b> Matriz dos ensaios do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ para a produção de biomassa e melanina pelo mutante MEL1. Os valores reais estão entre parênteses.....	<b>57</b>
<b>Tabela 7.</b> Matriz dos ensaios do DCCR $2^3$ para a produção de biomassa e melanina pelo mutante MEL1. Os valores reais estão entre parênteses.....	<b>65</b>
<b>Tabela 8.</b> Análise de variância para a produção de melanina pelo mutante MEL1 em função do planejamento composto central rotacional (DCCR) $2^3$ .....	<b>72</b>
<b>Tabela 9.</b> Produção de melanina não purificada e purificada pelo mutante MEL1 nas condições antes e após otimização.....	<b>78</b>
<b>Tabela 10.</b> Atividade das enzimas tirosinase e lacase após cultivo do mutante MEL1 nas condições antes e após otimização.....	<b>81</b>
<b>Tabela 11.</b> Avaliação dos parâmetros relativos aos fatores de conversão de substrato em biomassa, de substrato em produto, de biomassa em produto e produtividade máxima de melanina não purificada em relação a produção de biomassa e de melanina não purificada com o consumo de glicose durante o cultivo do mutante MEL1 na condição otimizada.....	<b>86</b>
<b>Tabela 12.</b> Avaliação da produção de biomassa, melanina não purificada e produção total de melanina não purificada obtida após o cultivo do mutante MEL1 por 72 e 96 horas em reator de tanque agitado e coluna de bolhas na condição otimizada.....	<b>89</b>
<b>Tabela 13.</b> Avaliação dos parâmetros fermentativos produção de biomassa, melanina não purificada, consumo de glicose, fator de conversão de substrato em biomassa, fator de conversão de substrato em melanina não purificada e produtividade máxima de melanina não purificada no cultivo do mutante MEL1 em biorreatores por 72 e 96 horas.....	<b>93</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMM: Água de Maceração de Milho

ANOVA: Análise de variância

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm: Centímetro

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

DHN: 1,8-dihidroxi-naftaleno

Esporos mL-1: Esporos por mililitro

EDTA: Etilenodiamino tetra-acético

g: grama

H: Horas

HMG: 2,5-dihidroxifenilacetato

L: Litros

L-DOPA: L-3,4-di-hidroxifenilalanina

LED: Diodo Emissor de Luz

LPS: Lipopolissacarídeo

m/v: Massa por Volume

mg g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>: Miligrama por grama por hora

mg g<sup>-1</sup>: Miligrama por grama

min: minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetros

mol L<sup>-1</sup>: Mol por litro

nm: Nanômetros

PMFS: Fluoreto de fenilmetilsulfonil

ppm: Partes por milhão

rpm: Rotação por minuto

THN: 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno

U/mL: unidade de atividade enzimática por mililitro

v/v: Volume por Volume

vvm: Volume de ar por volume de meio por minuto

xg: Força centrífuga relativa

$\mu\text{g}$ : Micrograma

$\mu\text{mol}$ : Micromol

$\mu\text{L}$ : Microlitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem

<: Menor

>: Maior

±: Mais ou menos

°C: Graus Celsius

$\mu_p$ : Velocidade específica de formação de produto

$\mu_s$ : Velocidade específica de consumo de substrato

$\mu_x$ : Velocidade específica de crescimento

$\mathcal{E}$ : Coeficiente de extinção molar

HCl: Ácido clorídrico

HGA: Ácido homogentésico

HOCl: Ácido hipocloroso

KOH: Hidróxido de potássio

$K_s$ : Constante de saturação

NaOH: Hidróxido de sódio

$\text{NH}_4\text{OH}$ : Hidróxido de amônio

P: Quantidade de pigmento final

$P_0$ : Quantidade de pigmento inicial

$P_m$ : Concentração máxima de pigmento

$P_0$ : Concentração inicial de pigmento

$Q_p$ : Produtividade de pigmento

$R^2$ : Coeficiente de determinação

S: Concentração final de glicose

$S_0$ : Concentração inicial de glicose

$t_{fp}$ : Tempo final da fermentação

U: unidade de atividade enzimática

$V_e$ : Volume de extrato enzimático utilizado

X: Concentração final de biomassa

$X_0$ : Concentração inicial de biomassa

$Y_{P/S}$ : Fator de conversão de glicose em melanina não purificada

$Y_{X/S}$ : Fator de conversão de glicose em biomassa

$\Delta A$ : Variação da absorbância

$\mu_m$ : Velocidade máxima específica de crescimento

$\mu_x$ : Velocidade específica de crescimento do micro-organismo

$\mu_m$ : Máxima velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$r_x$ : Velocidades instantâneas de crescimento

$r_p$ : Velocidades instantâneas de formação produto

$r_s$ : Velocidades instantâneas de consumo de substrato

$dt$ : Variação do tempo

$ds$ : Variação do consumo de substrato

$dp$ : Variação de formação de produto

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1. PRODUÇÃO DE PIGMENTO E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	28
2.2 SÍNTESE E EXTRAÇÃO DA MELANINA PRODUZIDA POR FUNGOS.....	32
2.3 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS.....	36
2.4 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM BIORREATORES.....	39
3. OBJETIVO.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Fungo.....	42
4.2 Vinhaça, Água de maceração de milho e Melaço.....	42
4.3 Obtenção dos esporos.....	44
4.4 Cultivo do fungo em frascos.....	45
4.5 Otimização das condições de cultivo do mutante MEL1 em frascos.....	46
4.6 Cultivo do fungo em biorreatores de bancada.....	47
4.7 Extração do pigmento.....	49
4.8 Purificação da melanina.....	50
4.9 Quantificação da melanina.....	50
4.10 Determinação da atividade enzimática tirosinase e lacase pelo mutante MEL 1.....	51
4.11 Determinação do teor de glicose.....	52
4.12 Determinação dos parâmetros cinéticos de pigmentação.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Efeito da glicose, nitrato de sódio, melaço, vinhaça e AMM na produção de melanina pelo mutante MEL1.....	56
5.2 Avaliação da atividade das enzimas lacase e tirosinase no mutante MEL1.....	79
5.3 Estudo dos parâmetros fermentativos de pigmentação em frascos.....	82
5.4 Avaliação do processo de produção de melanina pelo mutante MEL1 em biorreatores de bancada.....	88
6. CONCLUSÃO.....	96
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
8. REFERENCIAS.....	98

## 1. INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêutica, cosmética, têxtil e de alimentos tem demonstrado um crescente interesse no uso de pigmentos naturais em substituição aos pigmentos sintéticos, devido ao seu alto custo de produção por síntese química e também aos seus efeitos indesejáveis e potencialmente prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (RAO; XIAO; LI, 2017). Com o aumento da demanda por pigmentos naturais mais seguros e ecologicamente estima-se que até 2025 o mercado mundial de pigmentos naturais arrecade US\$ 37,5 bilhões, devido à procura por alimentos que ofereçam propriedades funcionais e à rápida expansão do setor de alimentos e bebidas em todo o mundo (SANTOS et al., 2021).

Pesquisas tem sido realizadas para substituir pigmentos sintéticos por pigmentos naturais, uma vez que, a natureza é uma fonte rica de organismos produtores de pigmentos, incluindo plantas, animais e micro-organismos (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020; LYU et al., 2022; TULI et al., 2015). No entanto, os pigmentos obtidos a partir de animais e vegetais têm limitações devido a disponibilidade sazonal, preocupações com o desmatamento e a extinção de espécies e também produção de compostos instáveis e insolúveis. Com isso, micro-organismos como fungos e bactérias são fontes alternativas mais vantajosas de biopigmentos devido ao seu rápido crescimento, produção independente das condições climáticas, com altos rendimentos por meio de estratégias econômicas e sustentáveis (MERUVU; DOS SANTOS, 2021).

Os fungos têm atraído atenção especial para a produção de pigmentos naturais por esses compostos apresentarem amplo espectro de cores com alta estabilidade luminosa e química (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020). Várias espécies de fungos conseguem produzir diferentes classes de pigmentos, incluindo carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas e quinonas, os quais têm inúmeras aplicações (BELL; WHEELER, 1986; CORDERO; CASADEVALL, 2017; POMBEIRO-SPONCHIADO et al., 2017; TULI et al., 2015; VENIL; LAKSHMANAPERUMALSAMY, 2009). Dentre estes micro-organismos, pode-se citar o fungo ascomiceto *Aspergillus nidulans*, o qual é capaz de produzir pigmentos escuros, como a melanina, que são encontradas na parede celular das hifas e esporos e/ou também no meio extracelular, como polímeros insolúveis (ELLIS, 1974; GOMEZ; NOSANCHUK, 2003; MARTINELLI, 1994). A função deste pigmento nos fungos pode ser vista como

vantagem de adaptação e/ou sobrevivência em condições ambientais extremas, pois confere proteção contra radiação ultravioleta, ação de enzimas líticas, dessecação, extremos de temperatura, toxicidade a metal pesado e drogas antimicrobianas (CORDERO; CASADEVALL, 2017).

As melaninas podem ser definidas como metabólitos secundários, constituídos por monômeros fenólicos e/ou indólicos, formando polímeros complexos (TOLEDO et al., 2017). Devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo radioproteção, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral e imunestimulante, a melanina apresenta potencial para ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas nas áreas da medicina, ambiental, farmacoscética e nanotecnologia (POMBEIRO-SPONCHIADO et al., 2017; SOLANO, 2014). No entanto, para uma aplicação prática desse pigmento é necessário estabelecer rotas mais econômicas para a sua produção em larga escala. Uma alternativa é a utilização de meios de cultivo de baixo custo, uma vez que a composição do meio é um fator crítico na determinação de bioprocessos economicamente viáveis (LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

Atualmente os pesquisadores tem demonstrado um grande interesse na utilização de subprodutos agroindustriais, como água de maceração de milho, melaço, vinhaça, bagaço de cana-de-açúcar, soro do queijo, tortas oleaginosas (amendoim, algodão, mamona), em processos fermentativos, por estarem disponíveis em grandes quantidades e com baixo valor comercial. Estes subprodutos podem ser utilizados como meio de cultura, uma vez que apresentam uma composição rica em nutrientes, principalmente fontes de carbono, nitrogênio e minerais os quais podem atuar para o crescimento dos micro-organismos (HAMANO; KILIKIAN, 2006; LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015; VALDUGA et al., 2007). A aplicação de uma variedade de substratos naturais em processos fermentativos, para estimular e aumentar o rendimento de pigmentos microbianos foram estudados e, indicou os substratos naturais como um elemento nutriente potencial na produção de pigmento microbiano (RAMESH et al., 2022). Além disso, a utilização de subprodutos agroindustriais são capazes de diminuir os custos de produção em processos fermentativos (LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021).

Com o objetivo de obter maior rendimento do composto de interesse é necessário avaliar o processo de produção em biorreatores (VENKATACHALAM et al., 2023). A produção de alguns pigmentos encontra-se em estágios mais avançados de aumento de escala com o uso dos biorreatores de tanque agitado e de coluna de bolhas (BÜHLER et al., 2013; GMOSER et al., 2018; LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021; SHARMA; GHOSHAL, 2020; VENKATACHALAM et al., 2023). Ambos os biorreatores se destacam por fornecer condições mais adequadas de oxigênio dissolvido, transferência de calor e massa, tempo de mistura, taxa de cisalhamento e a velocidade de agitação (ESPINOSA-ORTIZ et al., 2016; ZHONG, 2010). Esses parâmetros operacionais são os principais influenciadores para o sucesso do processo de produção, visando uma futura aplicação industrial (VENKATACHALAM et al., 2023).

Considerando o grande potencial biotecnológico do pigmento melanina, este projeto teve como principais objetivos estabelecer as condições ótimas de cultivo em frasco do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*, utilizando subprodutos agroindustriais como substrato para uma maior produção da melanina e também avaliar o cultivo na condição otimizada em escala de bancada, usando os biorreatores de tanque agitado e coluna de bolhas, visando a sua produção em escala industrial para uma futura aplicação biotecnológica desse pigmento.

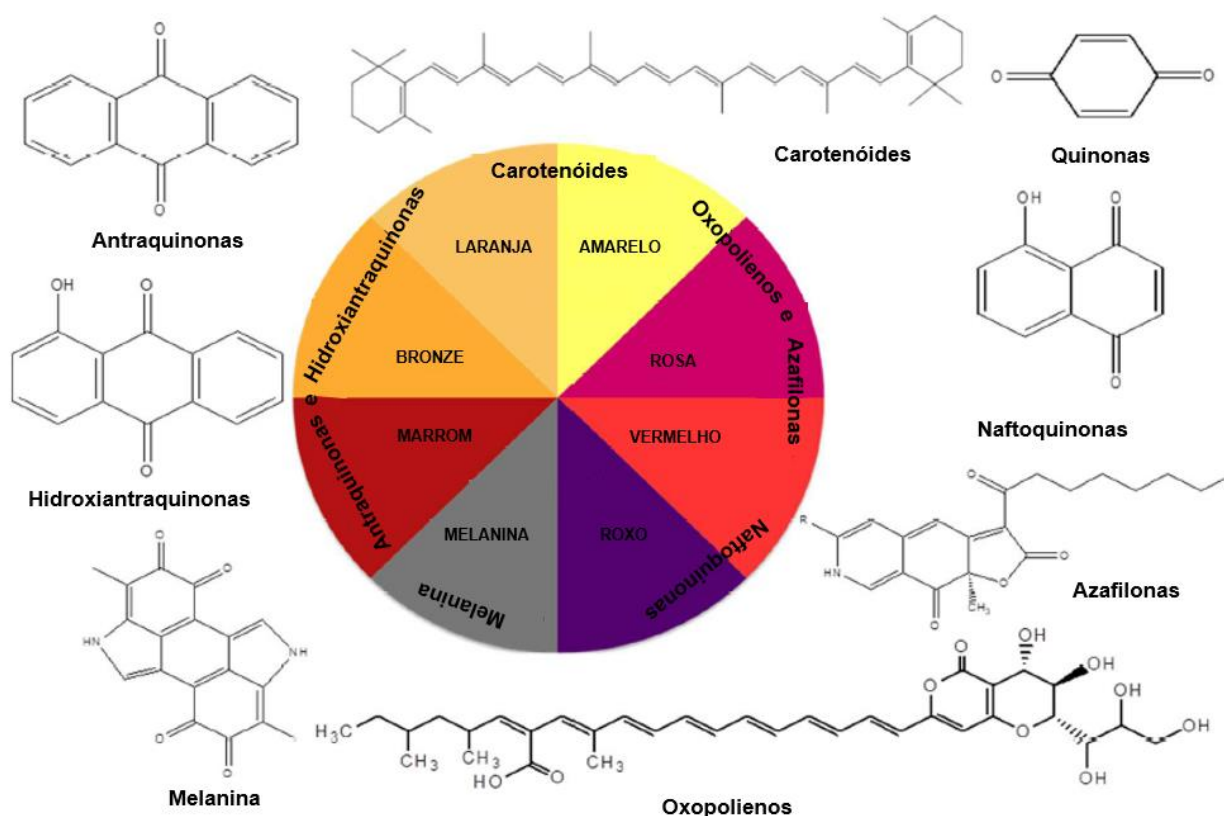
## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. PRODUÇÃO DE PIGMENTO E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

O uso de pigmentos remonta ao início das civilizações antigas, onde inicialmente a natureza era a única fonte de pigmentos, podendo ser obtidos a partir de plantas, insetos e minerais, que serviam para tingir tecidos, pintar o corpo em cerimônias religiosas e colorir os alimentos. Em 1856, o químico inglês William Henry Perkin descobriu o primeiro pigmento sintético, sintetizado a partir do destilado de alcatrão de hulha, o que desencadeou o florescimento comercial de pigmentos sintéticos. Esses pigmentos sintéticos foram amplamente utilizados nas indústrias com impacto nos setores têxtil, cosmético e farmacêutico. Todavia, sérias preocupações contra os pigmentos sintéticos foram levantadas em 2007, destacando riscos graves a saúde como: toxicidade, oncogenicidade, teratogenicidade e hiperalergenicidade. Com isso, agências reguladoras como a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos e a Autoridade Europeia de Normas Alimentares (EFSA) recomendaram uma dosagem segura desses pigmentos em alimentos, medicamentos e cosméticos. No entanto, como muitos pigmentos sintéticos têm sido banidos em muitos países, pesquisas tem sido realizadas para substituir os pigmentos sintéticos por aqueles obtidos de fontes naturais, incluindo plantas, animais e micro-organismos (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020; LYU et al., 2022; TULI et al., 2015). Entretanto, pigmentos naturais de origem vegetal e animal apresentam algumas desvantagens como: extinção de espécies devido ao seu uso extensivo, produção mais onerosa e dependente da estação do ano, variações na tonalidade e intensidade das cores e questões relacionadas a estabilidade e solubilidade dos pigmentos. Com isso, os micro-organismos destacam-se na produção desses pigmentos por apresentar crescimento fácil e rápido em meio de cultura barato e independentemente das condições climáticas, estabilidade dos pigmentos produzidos, disponibilidade por longos períodos, facilidade no processo de separação e purificação do pigmento (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020; KUMAR et al., 2015; LAGASHETTI et al., 2019).

Os fungos têm atraído atenção especial para a produção de pigmentos naturais pelo fato desses compostos apresentarem alta estabilidade química, amplo espectro de cores, bem como maior rendimento do produto, com fornecimento sustentável e de baixo custo (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020). Esses organismos são capazes de produzir uma gama extraordinária de pigmentos, como: carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas, monascinas, violaceína e índigo (Figura 1) (DUFOSSÉ et al., 2014; MERUVU; DOS SANTOS, 2021; RAO; XIAO; LI, 2017; SAJID; AKBAR, 2018; TULI et al., 2015).

**Figura 1.** Diferentes pigmentos produzidos por fungos.



Fonte: adaptado de ( KALRA; CONLAN; GOEL, 2020).

Os fungos sintetizam os pigmentos durante o metabolismo secundário, que ocorre na fase tardia de crescimento (idiofase), uma vez que não são essenciais para o crescimento das culturas, mas desempenham diversas funções para a sobrevivência do microrganismo na natureza (MUKHERJEE; MISHRA; DESHMUKH, 2017; RUIZ et al., 2010). A produção de pigmento pode ser afetada por fatores nutricionais (concentrações de fontes de carbono, nitrogênio e outros), parâmetros microbiológicos (idade dos esporos, quantidade do inóculo) e condições ambientais (pH, temperatura, aeração) (LYU et al., 2022). Além desses fatores, o rendimento de pigmento produzido depende do sistema de fermentação utilizado. Na fermentação em estado sólido (FES), onde é empregado substratos sólidos para ancoragem micelial, aspectos como umidade do meio, propriedades físicas e estruturais dos substratos, temperatura e pH, devem ser avaliadas para a produção de pigmentos. Por outro lado, a fermentação submersa (FS), que se baseia na cultura líquida para a maioria dos micro-organismos, é altamente influenciada pela velocidade de agitação e aeração, bem como temperatura e pH, sendo mais vantajosa que a FES devido ao menor tempo de cultivo e maior qualidade do produto obtido (LYU et al., 2022; MERUVU; DOS SANTOS, 2021; MUKHERJEE; MISHRA; DESHMUKH, 2017).

De acordo com a literatura (Tabela 1), os pigmentos produzidos por fungos apresentam uma ampla utilização em diversas indústrias como: alimentícia, cosmética, têxtil e farmacêutica, uma vez que podem exibir várias atividades biológicas, como antioxidantes, antimicrobiana, anticancerígenas, além de servir como aditivos e intensificadores de cor (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016; MERUVU; DOS SANTOS, 2021; RAO; XIAO; LI, 2017; SAJID; AKBAR, 2018). Isso demonstra que a produção de pigmentos em larga escala por fungos, precisa ser implementada intensivamente com a otimização dos processos fermentativos, a fim de encontrar substitutos para os pigmentos sintéticos e superar os perigos para a saúde humana e ao meio ambiente (RAMESH et al., 2022; SAJID; AKBAR, 2018).

**Tabela 1.** Ocorrência natural de pigmentos fúngicos do solo e sua aplicação sugerida.

Fungos	Cores	Pigmentos	Aplicações	Referências
<i>Aspergillus nidulans</i>	Marrom/ Preto	Melanina	Atividade antioxidante Atividade anti-inflamatória Agente quelante de metal	Goncalves et al. (2015); Gonçalves et al.(2013); Gonçalves; Pombeiro- Sponchiado (2005); Rissoni Toledo et al. (2021)
<i>Aspergillus niger</i>	Preto	Aspergillina	Atividade Antimicrobiana	Ray and Eakin (1975)
<i>Aspergillus niger</i>	Marrom	-	Tingimento têxtil	Atalla et al. (2011); Aishwarya and Aishwarya (2014)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	Amarelo	Ácido Neoaspergílico	Atividade Antibacteriana	Micetich and Macdonald (1965); Texeira et al. (2012)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Amarelo	Asperversina	Atividade Antifúngica	Miao et al. (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Rosa/ Violeta	Antraquinona	Tingimento têxtil	Gessler et al. (2013)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Amarelo	Naftoquinona	Atividade Antibacteriana	Boonyapranai et al. (2008); Kurobane et al. (1986)
<i>Monascus sp.</i>	Amarelo	Monascina Ancaflavina	Corante alimentar Farmacêuticos	Juzlova and Martinkova (1996); Mostafa and Abbady (2014);
	Laranja	Monascorubrina Rubropuntatina Monascorubramina	Atividade antibacteriana Atividade anticancerígena	Babitha et al. (2008); Moharram et al. (2012); Babula et al. (2009); Yang et al. (2014)
	Vermelho	Rubroputamina	Antioxidante	
<i>Penicillium herquei</i>	Amarelo	Atronenetina	Aditivo alimentar Antioxidante	Takahashi and Carvalho (2010)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Vermelho	Antraquinona	Efeito anticancerígeno em alimentos e produtos farmacêuticos Tingimento têxtil	Dufosse (2006); Atalla et al. (2011)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Laranja para amarelo	Purpurogenona	Tingimento de tecidos de algodão	Buchi et al. (1965); King et al. (1970); Martinkova et al. (1995);
	Amarelo para Laranja	Mitorubrin	Alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos	Mapari et al.(2005); Takahashi and Carvalho (2010); Teixeira et al. (2012); Santos-ebinuma et al. (2013b);
	Vermelho	Mitorubrinol		
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	Amarelo para Laranja	Pencolide Esclerotiorina Isocromofilona VI	Atividade antibacteriana Atividade antibacteriana Atividade antifúngica Atividade antibacteriana	Brikinshaw et al. (1963); Chidananda and Sattur (2007); Lucas et al. (2007); Lucas et al. (2010)
<i>Trichoderma viride</i>	Amarelo Verde	Viridina -	Tingimento têxtil	Chitale et al. (2012); Neethu et al. (2012); Gupta et al. (2013)
	Marrom	-	Atividade antifúngica Indústria alimentícia	
<i>Trichoderma virens</i>	Amarelo	Viridol Virona	Tingimento têxtil Atividade antifúngica	Mukherjee and Kenerley (2010); Sharma et al. (2012); Kamala et al. (2015)

Fonte: adaptado de (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016).

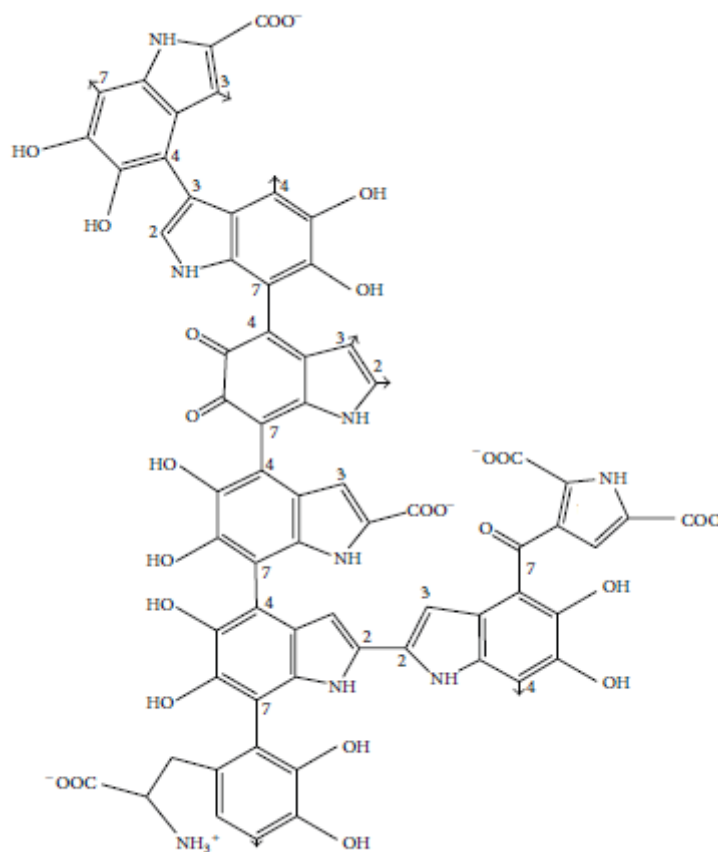
## 2.2 SÍNTESE E EXTRAÇÃO DA MELANINA PRODUZIDA POR FUNGOS

As melaninas são classificadas como um dos pigmentos naturais mais amplamente distribuídos, pois são sintetizados em todos os reinos biológicos, incluindo uma ampla variedade de plantas, animais, fungos, bactérias e protozoários (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). No reino fúngico, muitas espécies produzem melanina, que pode estar localizada na parede celular das hifas e/ou esporos ou, podem ocorrer como polímeros extracelulares formados no meio de cultura ao redor das células fúngicas (BELL; WHEELER, 1986). Entretanto, algumas espécies de fungos são constitutivamente melanizadas, enquanto outras melanizam apenas em fases específicas do seu desenvolvimento (esporulação e crescimento micelial), na presença de precursores da via de síntese da melanina e/ou em resposta as condições ambientais. A melanização pode ser vista nestes organismos como uma forma de proteção aos vários estresses físicos e químicos do meio, por exemplo, servindo como proteção contra a radiação ultravioleta, ação de enzimas líticas, dessecação, extremos de temperatura, toxicidade a metal pesado e drogas antimicrobianas (CHANG; CARY; LEBAR, 2020; CORDERO; CASADEVALL, 2017; POMBEIRO-SPONCHIADO et al., 2017).

Melaninas são macromoléculas biológicas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, geralmente complexados com proteínas e, muitas vezes, também com carboidratos. Como pode ser observado na Figura 2, as melaninas são caracterizadas como moléculas hidrofóbicas e carregadas negativamente, que apresentam propriedades físico-químicas específicas, como insolubilidade em água e solventes orgânicos, resistência a ácidos concentrados, branqueamento quando submetido à ação de oxidantes, que permite diferenciá-las de quaisquer outros pigmentos (BUTLER; DAY, 1998; LANGFELDER et al., 2003; TOLEDO et al., 2017). Com base nessas propriedades químicas, principalmente as suas características de solubilidade, é possível realizar a extração da melanina da parede celular do fungo. O tratamento da biomassa com álcalis quentes (NaOH; KOH ou NH<sub>4</sub>OH) permite romper a associação da melanina com as proteínas e outros componentes da parede, tornando o pigmento solúvel no meio. Para a recuperação desse pigmento, é adicionado ácidos concentrados ao meio, o que promove a precipitação da melanina. A purificação desse pigmento é realizada por hidrólise ácida e lavagens sucessivas em solventes orgânicos para remoção de algumas proteínas,

carboidratos e lipídeos provenientes da parede celular (LEBEAU et al. 2017; PRALEA et al., 2019; SAVA et al., 2001).

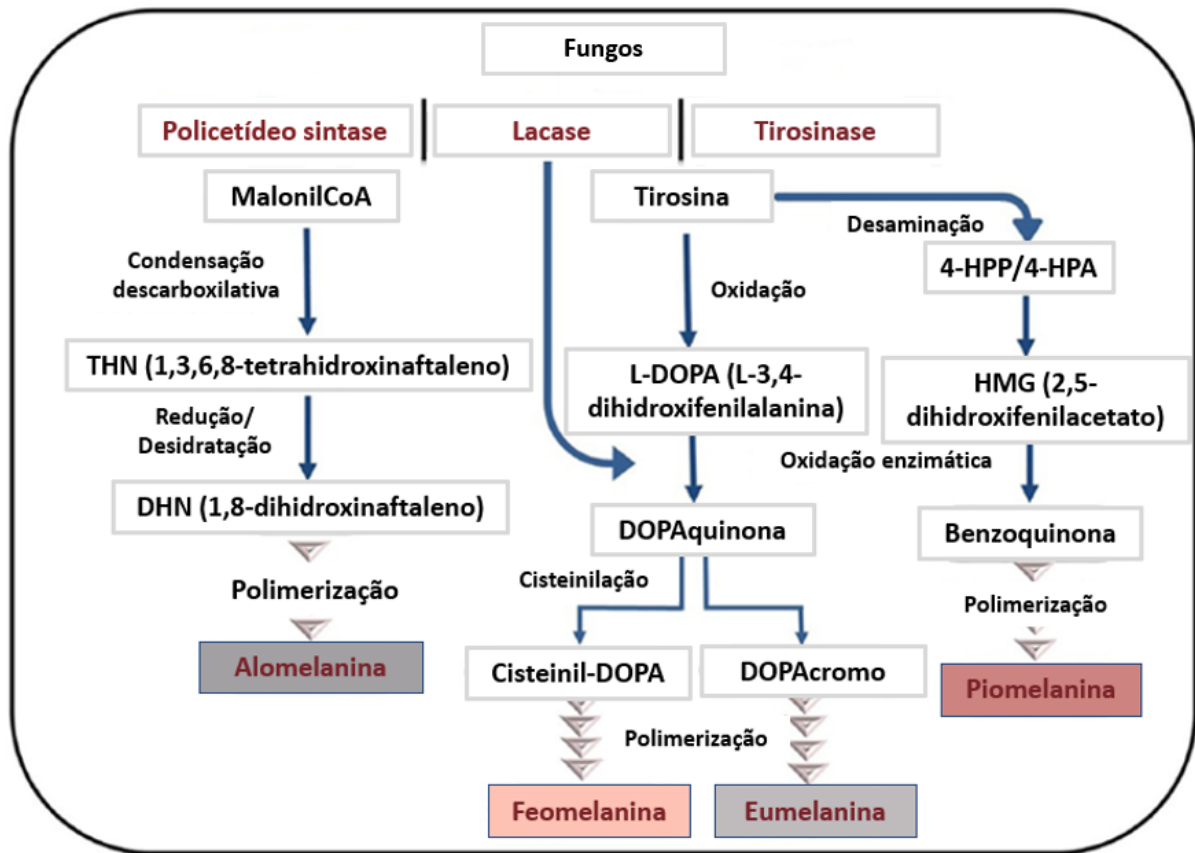
**Figura 2.** Modelo para estrutura da eumelanina.



Fonte: (SOLANO, 2014).

A biossíntese da melanina em fungos envolve várias enzimas, como tirosinase, lacase, policetídeo sintase e catecol oxidase que realizam as oxidações iniciais dos precursores da melanina, dando origem a cinco tipos diferentes: eumelanina, feomelanina, alomelanina e piomelanina (Figura 3) (CORDERO; CASADEVALL, 2017; SINGH et al., 2021).

**Figura 3.** Vias de síntese da melanina em fungos.



Fonte: adaptado de (SINGH et al., 2021).

As eumelaninas são pigmentos pretos ou marrons, sintetizados a partir de L-DOPA (L-3,4-di-hidroxifenilalanina) ou tiosina pela ação das enzimas tiosinase e lacase, sendo conhecidas como DOPA-melaninas. Alguns fungos são capazes de sintetizar eumelaninas, qual apresenta biocompatibilidade com a melanina presente nos mamíferos, uma vez que, a via de síntese deste tipo de melanina fúngica se assemelha àquela descrita em mamíferos. Já as feomelaninas são pigmentos que variam de tons vermelhos a amarelos, derivadas da via L-DOPA, mas incorporando enxofre durante a sua síntese (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; SINGH et al., 2021). As alomelaninas apresentam cores que variam de marrom escuro a totalmente preto e fazem parte de grupo heterogêneo de polímeros que são sintetizados por oxidação ou polimerização do DHN (1,8-dihidroxinaftaleno), dando origem a também conhecida DHN-melaninas. As pimelaninas são pigmentos escuros, capazes de dar suporte aos micro-organismos em condições de estresse ambiental e, são derivados do catabolismo da tiosina, via p-hidroxifenilpiruvato (HPP) formando ácido homogentésico (HGA), o qual sofre posterior auto-oxidação e polimerização. (EOM;

WOO; SHIM, 2016; SINGH et al., 2021). Espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir dois tipos de melaninas, DHN (alomelanina) e L-DOPA (eumelanina) (CHANG; CARY; LEBAR, 2020; EISENMAN; CASADEVALL, 2012). Gonçalves, Lisboa e Pombeiro-Sponchiado (2012) demonstraram que a melanina produzida pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* é a do tipo DOPA-melanina, por apresentar propriedades físico-químicas e perfis espectrofotométrico ultravioleta e infravermelho muito semelhantes ao da DOPA-melanina sintética e também não produzir pigmento na presença do inibidor da biossíntese de DOPA-melanina (tropolone).

Apesar das diferenças em suas estruturas químicas, as melaninas fúngicas tem-se destacado pela diversidade de atividades biológicas com inúmeras aplicações biotecnológicas. Gonçalves, Pombeiro-Sponchiado (2005) demonstraram que a melanina produzida pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* apresentou atividade antioxidante, sendo capaz de neutralizar os radicais gerados pelo ácido hipocloroso (HOCl), apresentando uma magnitude de proteção comparável a melanina sintética. Em outros estudos, o pigmento melanina produzida pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* exibiu atividade anti-inflamatória, agindo como inibidor da produção de NO e TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) bacterianos e, além disso, foi verificado que esse pigmento não apresentou efeito citotóxico em cultura de células McCoy, mesmo após metabolização com as enzimas da fração S9 do fígado, e também não exibiu atividade mutagênica para as linhagens de *Salmonella thyphimurium* usada no teste de Ames (GONCALVES et al., 2015; GONÇALVES et al., 2013). Rissoni Toledo et al. (2021) demonstraram que biomassa altamente pigmentada do mutante MEL1 de *A. nidulans* exibiu eficiência de 70% na recuperação de cobre em solução durante cinco ciclos de bioadsorção/dessorção. Esses estudos confirmaram que a melanina produzida por *A. nidulans* pode ser considerada uma candidata promissora para várias aplicações nas áreas da medicina, ambiental, farmacoscética e nanotecnologia (EL-NAGGAR; SABER, 2022; POMBEIRO-SPONCHIADO et al., 2017; TRAN-LY et al., 2020).

### **2.3 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**

Para uma aplicação prática dos pigmentos fúngicos, incluindo a melanina, torna-se necessário estabelecer rotas mais baratas para a sua produção em larga escala. Uma alternativa é a utilização de meios de cultivo de baixo custo, uma vez que a composição do meio é um fator crítico na determinação de bioprocessos economicamente viáveis (PANESAR et al., 2015).

Os resíduos agroindustriais, advindos das indústrias alimentícias e da produção agrícola, incluindo vários materiais à base de plantas (palhas, caules, folhas, cascas, sementes, polpas, bagaço) e também de origem animal (penas e soro de leite), podem ser considerados substratos para o crescimento dos micro-organismos. Esses resíduos possuem uma composição rica em carboidratos, proteínas, lipídios, minerais e vitaminas, porém também apresentam altos valores de demanda biológica de oxigênio e podem causar problemas de diferentes aspectos, incluindo contaminação do meio ambiente, custo de coleta e tratamento do resíduo e perda de matérias-primas valiosas. Com isso, a transformação eficiente desses resíduos tornou-se uma questão ambiental central nos últimos anos e, assim, a biotecnologia microbiana também surgiu com novas possibilidades de utilização massiva dos resíduos agroindustriais no desenvolvimento de produtos de valor agregado (FREITAS et al., 2021; LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

Processos fermentativos têm utilizado resíduos agroindustriais, para a obtenção de compostos de interesse industrial, incluindo os pigmentos microbianos, o que tem possibilitado reduzir os custos da produção, uma vez que a utilização de substratos e/ou meios de cultura sintéticos costumam ser caros. Outra vantagem da aplicação desses substratos naturais (subprodutos agroindustriais) é atuar como uma potente ferramenta no gerenciamento de resíduos, evitando o seu descarte no meio ambiente (LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021; NIGAM; LUKE, 2016; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015; RAMESH et al., 2022).

No processamento do milho são obtidos mais de 1000 tipos de subprodutos, que são amplamente utilizados em indústrias alimentícias e químicas, fermentação, dentre outros. A água de maceração de milho (AMM), o principal subproduto da produção do amido de milho, é considerada uma fonte rica e barata de carbono, nitrogênio, aminoácidos e minerais, tendo ampla perspectiva de aplicação no desenvolvimento de processo biotecnológico (JIAO et al., 2022). A exemplo disso, a AMM tem sido utilizado como uma importante fonte de nutriente para a produção de pigmento (NIGAM; LUKE, 2016). Hamano e Kilikian (2006), em estudos sobre a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* em meios de cultura contendo AMM, encontraram que em meio contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 7,6 g L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico resultou na maior produção de pigmento vermelho extracelular quando comparado ao meio contendo sais e extrato de levedura. Estudos realizados por Basto et al. (2022) mostraram que a produção de pigmentos por *Penicillium brevicompactum* em um meio de baixo custo, composto por 34,6 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo e 8 g L<sup>-1</sup> de AMM, foi muito semelhante ao meio sintético sob fermentação submersa com micélio livre e imobilizado. Em estudos anteriores, foi avaliado a utilização de água de maceração de milho para o cultivo do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* e, os resultados mostraram que o crescimento do fungo foi favorecido na presença de 2% de água de maceração de milho, enquanto que na concentração de 0,2% houve um aumento na produção de pigmento pela linhagem em estudo (Pretti, 2009).

Nas indústrias sucro-alcooleiras, o melaço de cana de açúcar é um subproduto obtido durante o processo de extração da sacarose, numa proporção de 35 a 45 kg por 1 tonelada de cana processada, sendo produzidos cerca de 20 milhões de toneladas de melaço anualmente (JAMIR et al., 2021). O melaço de cana-de-açúcar tem sido utilizado como um fonte de carbono em processos fermentativos, uma vez que contém aproximadamente 34% de sacarose, 11% de açúcares redutores (glicose e frutose) e vários minerais (SINDHU et al., 2016). Anjos (2013) obtiveram um aumento de 42% na produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* quando a concentração de 4% (v/v) de melaço foi aplicado no meio de cultivo na presença de luz (LED) azul. Cheng e Yang (2016) encontraram que um maior crescimento celular e a síntese de carotenóides por *Rhodotorula mucilaginosa* ocorreu quando melaço estava presente no meio de cultivo como fonte de carbono em comparação ao meio

controle contendo glicose. Estudos realizados por Da Silva, Ienczak e Moritz (2021), usando subprodutos agroindustriais para produção de biopigmento vermelho por *Monascus ruber*, observaram uma alta produtividade desse pigmento quando a mistura de farinha de arroz e melaço (ambos na concentração 10 g L<sup>-1</sup>) foi aplicada como meio de cultivo.

A vinhaça também é um subproduto das indústrias sucro-alcooleiras obtido após a destilação fracionada do caldo fermentado da cana-de-açúcar para a produção de etanol, sendo gerados cerca de 10 a 15 L de vinhaça para cada litro de etanol produzido. Isso mostra que a vinhaça pode ser usada como substrato em processos fermentativos para a obtenção de vários compostos, incluindo pigmentos, pois apresenta uma composição rica em nitrogênio, carbono, sulfato, potássio, fósforo, magnésio, alguns metais (zinco, cobre, bário) e fenóis (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; DEL GOBBO; COLIN, 2018; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; HOARAU et al., 2018; KAHRAMAN; YEILADA, 2001; PINHEIRO et al., 2020; SINDHU et al., 2016). Dorla et al. (2013) demonstraram que a produção de  $\beta$ -caroteno por *Phycomyces blakesleanus* aumentou em 95% quando o fungo foi cultivado em vinhaça na presença de luz.

Com base nos estudos reportados na literatura, os subprodutos agroindustriais podem ser utilizados como substrato para a obtenção de diversos produtos, incluindo os pigmentos microbianos, solucionando tanto as preocupações econômicas quanto as ambientais. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a otimização dos processos em escala industrial.

## 2.4 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM BIORREATORES

Para o escalonamento da produção microbiana de pigmentos, como a melanina, a escolha do tipo de biorreator e a determinação de alguns parâmetros, são importantes para uma eficiente produção em larga escala. Vários tipos de biorreatores vem sendo explorados e desenvolvidos junto com os avanços na compreensão dos sistemas biológicos, pois diversos fatores podem afetar um determinado bioprocessos como: agitação, transferência de oxigênio, mistura, cisalhamento e estabilidade operacional (SPIER et al., 2011; ZHONG, 2010). Com isso, diferentes configurações de biorreatores têm sido utilizados para o cultivo de fungos, são eles: reator de tanque agitado, reator de coluna de bolhas, airlift e leito fluidizado, pois estes reatores são capazes de fornecer adequada transferência de oxigênio, pouco estresse de cisalhamento e uma boa homogeneização do meio (ESPINOSA-ORTIZ et al., 2016; ZHONG, 2010).

Para a produção de pigmentos em fermentação submersa, alguns estudos descrevem o uso dos biorreatores de tanque agitado e de coluna de bolhas (LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021; WANG et al., 2021). O tipo mais comum de biorreator para cultivo submerso é o de agitação mecânica e/ou de tanque agitado. Biorreatores de tanque agitado têm o meio de cultivo agitado mecanicamente por um motor elétrico, que gera uma boa homogeneização, suspensão de sólidos, dispersão gás-líquido, aeração e a transferência de calor e massa. As desvantagens desse tipo de biorreator são o estresse gerado pela agitação, impraticável para certos microrganismos, e a alta demanda de energia elétrica em altas agitações. Entretanto, esse tipo de biorreator é o mais utilizado em estudos laboratoriais de escalonamento (ZHONG, 2010). Investigações realizadas por Sharma e Ghoshal (2020) demonstraram que houve um aumento de aproximadamente 100 µg/g na produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* em reator de tanque agitado quando comparado a produção em frascos. Estudos realizados por Venkatachalam et al., (2023) demonstraram que a utilização do reator de tanque agitado aumentou a produção de pigmento laranja e vermelho por *Talaromyces albobiverticillius* quando comparado ao cultivo em frascos.

Outro reator utilizado para a produção de pigmento é o de colunas de bolhas, os quais são reatores pneumáticos, que foram desenvolvidos para cultura de células sensíveis, como células de fungos filamentosos, pois a intensa agitação (dependendo do tipo de reator e geometria) afeta o grau de compactação e formação dos pellets, afetando a obtenção dos produtos de interesse. No entanto, em reatores pneumáticos a agitação do sistema ocorre através do gás que é aspergido na forma de bolhas em uma fase líquida ou em uma suspensão líquido-sólido (ESPINOSA-ORTIZ et al., 2016; SPIER et al., 2011). Este tipo de reator apresenta excelentes características como, alta taxa de transferência de calor e massa, alta homogeneização, baixo atrito (ou seja, menos estresse ao micro-organismo cultivado), baixos custos operacionais e maior produtividade volumétrica comparado ao de leito fixo e tanques agitados. (ESPINOSA-ORTIZ et al., 2016; ZHONG, 2010). Estudos realizados por Nanou, Roukas e Papadakis (2012), demonstraram que o reator de coluna de bolhas mostrou ser um sistema de fermentação adequado para a produção de carotenos por *Blakeslea trispora* a partir de meio sintético. Gmoser et al. (2018), obtiveram uma maior pigmentação de *Neurospora intermedia* em um reator de coluna de bolhas, quando comparado ao cultivo em frasco. Esses estudos são importantes pois mostram que é possível aumentar a escala de produção de pigmentos microbianos, visando uma futura aplicação industrial. Para isso, a otimização das condições de fermentação, como temperatura, pH, aeração, agitação e componentes do meio, é necessária para maximizar a produção de pigmento associada a uma redução dos custos do bioprocesso (LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021).

### 3. OBJETIVO

O presente estudo teve como principal objetivo estabelecer as condições ótimas de cultivo do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans* para uma maior produção de melanina, usando subprodutos agroindustriais como componentes do meio de cultura, visando uma futura aplicação do processo em escala industrial.

Para alcançar este propósito, este projeto teve como objetivos específicos:

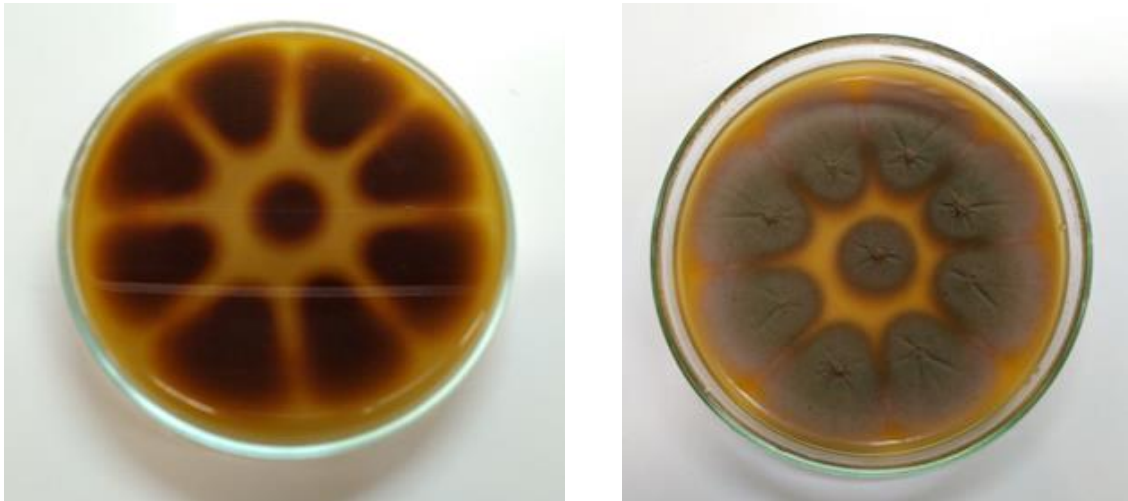
- Avaliar o efeito dos subprodutos (vinhaça, melaço e água de maceração de milho) na produção de melanina pelo mutante MEL1 em frascos, por meio de planejamentos estatísticos (fatorial fracionado) e, otimizar o meio de cultura para a maior produção de melanina por meio de planejamentos estatísticos (delineamento composto central rotacional);
- Avaliar os parâmetros fermentativos (rendimentos e produtividades) na condição otimizada;
- Avaliar a produção de melanina nos biorreatores tanque agitado e coluna de bolhas, com a composição do meio de cultivo otimizado em frascos, visando o aumento da produção de melanina em escala de banca;
- Avaliar a influência dos parâmetros operacionais, velocidade de agitação e vazão de ar, na produção de melanina nos reatores.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fungo

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o mutante MEL1 do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (Figura 4), o qual apresenta auxotrofia para inositol (*inoB1*) e produção aumentada do pigmento DOPA-melanina (*melC1*) (GONÇALVES; LISBOA; POMBEIRO-SPONCHIADO 2012). Esse microrganismo está estocado no laboratório de Fungos Filamentosos do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

**Figura 4.** Morfologia do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans* em meio mínimo suplementado com glicose (1% m/v), nitrato de sódio (0,60% m/v), inositol (20 ppm) e com AMM (1% v/v).



Fonte: Acervo da Autora.

### 4.2 Vinhaça, Água de maceração de milho e Melaço

A vinhaça e o melaço utilizados nos experimentos foram coletados na Usina de Açúcar e Álcool São Martinho localizada em Pradópolis/São Paulo. A água de maceração de milho (AMM) foi cedida pela indústria Corn Products Brazil-Ingredientes Industriais LTDA, localizada na cidade de Balsa Nova/Paraná.

Previamente a cada experimento, estes subprodutos agroindustriais foram filtrados em papel Whatman nº1 para a remoção de sólidos e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. A composição química da vinhaça, melaço e água de maceração de milho está apresentada na Tabela 2. Esses subprodutos foram

caracterizados em termos de carbono e nitrogênio em analisador TOC – LCPN SHIMADZU®.

**Tabela 2.** Composição química do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar, e água de maceração de milho.

	<b>Vinhaça (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Melaço (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Água de Maceração de Milho (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Carbono total	8295 <sup>(c)</sup>	306189,9 <sup>(c)</sup>	28658,7 <sup>(c)</sup>
Nitrogênio total	288,2 <sup>(c)</sup>	5409,9 <sup>(c)</sup>	4250,7 <sup>(c)</sup>
Ca	719 <sup>(a)</sup>	769,5 <sup>(b)</sup>	239,8 <sup>(b)</sup>
Na	50,2 <sup>(a)</sup>	435,3 <sup>(b)</sup>	206,2 <sup>(b)</sup>
K	2056 <sup>(a)</sup>	1803,2 <sup>(b)</sup>	2753,9 <sup>(b)</sup>
P	190 <sup>(a)</sup>	0,78 <sup>(b)</sup>	1,5 <sup>(b)</sup>
Mg	237 <sup>(a)</sup>	246,2 <sup>(b)</sup>	723,8 <sup>(b)</sup>
Mn	-	17,5 <sup>(b)</sup>	55,3 <sup>(b)</sup>
Zn	1,66 <sup>(a)</sup>	0,82 <sup>(b)</sup>	10,7 <sup>(b)</sup>
Cu	0,35 <sup>(a)</sup>	0,43 <sup>(b)</sup>	1,1 <sup>(b)</sup>
Fe	-	12,7 <sup>(b)</sup>	15,6 <sup>(b)</sup>
Fenóis	671,36 <sup>(c)</sup>	-	-

(a)CHRISTOFOLETTI et al., (2013); (b) VALDUGA et al., (2007); (c) Fonte do Autor.

### 4.3 Obtenção dos esporos

Para o crescimento das linhagens foi utilizado o meio mínimo descrito por Cove (1966), com a seguinte composição: 10 mL de solução de sais (descrita abaixo), 1 mL de solução de elementos traços (descrita abaixo) e o volume foi completado até 1000 mL com água destilada.

- Solução de sais (Cove, 1966):

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 até completar 100 mL	

- A solução de elementos traços (Cove, 1966):

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.	

Para a preparação do meio mínimo sólido foi adicionado 1,5% de ágar. Após esterilização do meio de cultivo por autoclavagem a 121,1°C por 20 minutos, foi adicionado de maneira asséptica glicose (1% m/v), nitrato de sódio (0,60% m/v), inositol (20 ppm) e água de maceração de milho 1% (v/v). Após crescimento do fungo por 5 dias a 37°C, os conídios foram coletados em solução salina (0,85%), filtrados em lã de vidro e o seu número foi estimado por contagem em Câmara de Neubauer. Para a padronização do inóculo foi utilizado nos ensaios  $10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4 Cultivo do fungo em frascos**

De acordo com os estudos realizados anteriormente (SOUSA, 2017), para a obtenção de uma maior pigmentação da biomassa do mutante MEL1, o cultivo foi realizado em duas etapas:

- **Pré-cultura:** com o objetivo de estimular o crescimento do fungo, o cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mínimo descrito por Cove (1966), suplementado com glicose (1% m/v), nitrato de sódio (0,60% m/v), inositol (20 ppm) e com AMM (1% v/v), inoculados com  $10^6$  esporos. mL<sup>-1</sup> e mantidos a 29°C por 48 h sob agitação constante de 225 rpm.
- **Cultura:** para promover a maior pigmentação da biomassa, foi realizada a transferência da massa micelial (10% v/v), obtida na etapa da pré-cultura, para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mínimo descrito por Cove (1966), porém, suplementado com glicose, nitrato de sódio, inositol (20 ppm), AMM, melação e vinhaça em diferentes concentrações, de acordo com o apresentado nos planejamentos experimentais. Em seguida os frascos foram incubados a 29°C por 72 h, sob agitação constante de 225 rpm. Ao final desse período de cultivo, a biomassa obtida foi separada do caldo de cultivo por filtração a vácuo e seca em estufa a 55°C até peso constante. A biomassa seca foi triturada e selecionada com um tamanho de partícula entre 0,21 a 0,42 mm, usando um conjunto de peneiras TYLER (MESH 65 e 35), para a posterior extração do pigmento.

#### 4.5 Otimização das condições de cultivo do mutante MEL1 em frascos

Com o intuito de avaliar a influência da glicose, nitrato de sódio, AMM, melão e vinhaça (variáveis independentes) sobre a produção de pigmento (variável dependente), foi elaborado um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ , com 3 repetições no ponto central totalizando 19 ensaios. As concentrações dos subprodutos escolhidas para este planejamento foram determinadas a partir de estudos anteriores (PRETTI, 2009; SOUSA, 2017).

A partir dos resultados da análise estatística do planejamento fatorial fracionado ( $2^{5-1}$ ) visando a produção de pigmento, foi elaborado um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^3$ , com três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se os níveis codificados usados nos planejamentos de experimentos fracionado ( $2^{5-1}$ ) e DCCR ( $2^3$ ). As condições de cultivo foram otimizadas para a etapa de cultura do fungo mutante MEL1, com o objetivo de promover a maior pigmentação da biomassa.

Os resultados obtidos nos planejamentos experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA), pelo programa computacional *Statistica* v10.0 onde foi possível avaliar os efeitos dos fatores estudados na produção de pigmento pelo mutante MEL1.

**Tabela 3.** Concentrações das variáveis independentes em diferentes níveis para o planejamento fracionado  $2^{5-1}$ .

Variáveis		Níveis		
		-1	0	+1
X1	AMM (% v/v)	0	0,50	1,00
X2	Melão (% v/v)	0	1,00	2,00
X3	Vinhaça (% v/v)	0	0,50	1,00
X4	Nitrato de sódio (% m/v)	0	0,30	0,60
X5	Glicose (% m/v)	0	0,50	1,00

**Tabela 4.** Concentrações das variáveis independentes em diferentes níveis para o delineamento composto central rotacional (DCCR).

<b>Variáveis</b>		<b>Níveis</b>				
		<b>-1,68</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>1,68</b>
<b>X1</b>	<b>Melaço (% v/v)</b>	0,01	1,00	2,45	3,90	4,89
<b>X2</b>	<b>Vinhaça (% v/v)</b>	0,01	0,50	1,23	1,95	2,44
<b>X3</b>	<b>Glicose (% m/v)</b>	0,01	0,50	1,23	1,95	2,44

#### **4.6 Cultivo do fungo em biorreatores de bancada**

Para a realização destes ensaios foram utilizados dois reatores de bancada: tanque agitado e o de coluna de bolhas (Figuras 5 e 6). As dimensões dos reatores são:

- Reator de tanque agitado (Figura 5): apresenta uma altura de vaso de 224 mm, diâmetro de 176 mm e volume total de 5 L. Um impelidor naval (Figura 5) foi utilizado nos ensaios, o qual apresenta altura da haste de 785 mm, diâmetro da haste de 10 mm, diâmetro total da hélice de 123 mm e a medida de cada hélice de 70 mm. O volume de trabalho 1,5 L foi utilizado nos ensaios.

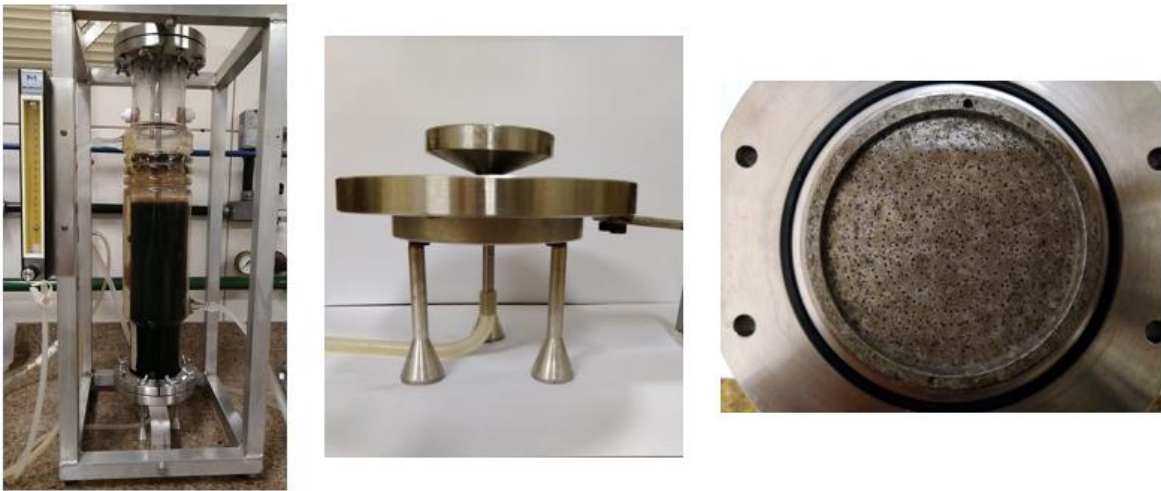
**Figura 5.** Cultivo do mutante MEL1 (etapa da cultura) em reator de tanque agitado com impelidor náutico.



Fonte: Acervo da autora.

- Reator de coluna de bolhas (Figura 6): apresenta uma altura de vaso de 540 mm, diâmetro de 107 mm, encamisamento térmico ao longo da coluna de bolhas e volume total de 2 L. na base da coluna foi acoplado um difusor de ar, que apresenta 67 mm de diâmetro e a saída de ar é de 1 mm de diâmetro. O volume de trabalho 1,5 L foi utilizado nos ensaios.

**Figura 6.** Cultivo do mutante MEL1 (etapa de cultura) em reator de coluna de bolhas com difusor circular de ar.



Fonte: Acervo da autora.

O cultivo do mutante MEL1 nos biorreatores de bancada foi realizado em duas etapas, como mencionado no item 4.4:

- Pré-cultura: com o objetivo de estimular o crescimento do fungo, o cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mínimo descrito por Cove (1966), suplementado com glicose (1% m/v), nitrato de sódio (0,60% m/v), inositol (20 ppm) e com AMM (1% v/v), inoculados com  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  e mantidos a 29°C por 48 h sob agitação constante de 225 rpm.
- Cultura: foi realizada a transferência da massa micelial (10% v/v), obtida na etapa da pré-cultura, para os reatores de tanque agitado e o de coluna de bolhas, os quais apresentaram volume de trabalho de 1,5 L, suplementado de acordo com a condição otimizada obtida nos planejamentos. Em seguida os reatores foram incubados a 29°C conforme descrito na Tabela 5.

**Tabela 5.** Condições operacionais dos biorreatores de tanque agitado e coluna de bolhas.

Tipos de biorreatores	Ensaio	Vazão de Ar (L min <sup>-1</sup> )	Vazão volumétrica específica (vvm)*	Agitação (rpm)	Tempo (horas)
Tanque agitado	1	-	-	150	72
	2	-	-	150	96
	3	-	-	200	72
	4	-	-	200	96
	5	0,8	0,53	200	96
Coluna de bolhas	1	1,5	1	-	72
	2	1,5	1	-	96

\*(volume<sub>ar</sub>/volume<sub>meio</sub>/minuto).

Ao final da etapa de cultura, a biomassa obtida foi separada do caldo de cultivo por filtração a vácuo e seca em estufa a 55°C até peso constante. A biomassa seca foi triturada e selecionada um tamanho de partícula entre 0,21 a 0,42 mm, usando um conjunto de peneiras TYLER (MESH 65 e 35), para a posterior extração do pigmento.

#### **4.7 Extração do pigmento**

Para a extração do pigmento presente na massa micelial foi feita seguindo o método adaptado de Sava et al. (2001), onde a biomassa obtida nos ensaios foi submetida a adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1mol L<sup>-1</sup> na proporção 1:30 (m/v), seguido de autoclavagem a 121°C por 10 minutos e centrifugação a 1935 xg por 20 min a 20°C. Este procedimento foi repetido até a completa descoloração da massa micelial.

Com o sobrenadante, resultante do processo de centrifugação, o qual contém o pigmento, foi acidificado com ácido clorídrico concentrado (HCl) até pH 2, deixado em repouso por 5 dias. Após este processo, foi feita a lavagem do sedimento com água destilada, seguido de centrifugação por 20 minutos a 48384 xg a 10°C. Este procedimento foi repetido por cinco vezes. O pigmento obtido foi seco em estufa a 55-60°C, pesado e a quantidade de pigmento obtido foi expresso em mg g<sup>-1</sup> de biomassa.

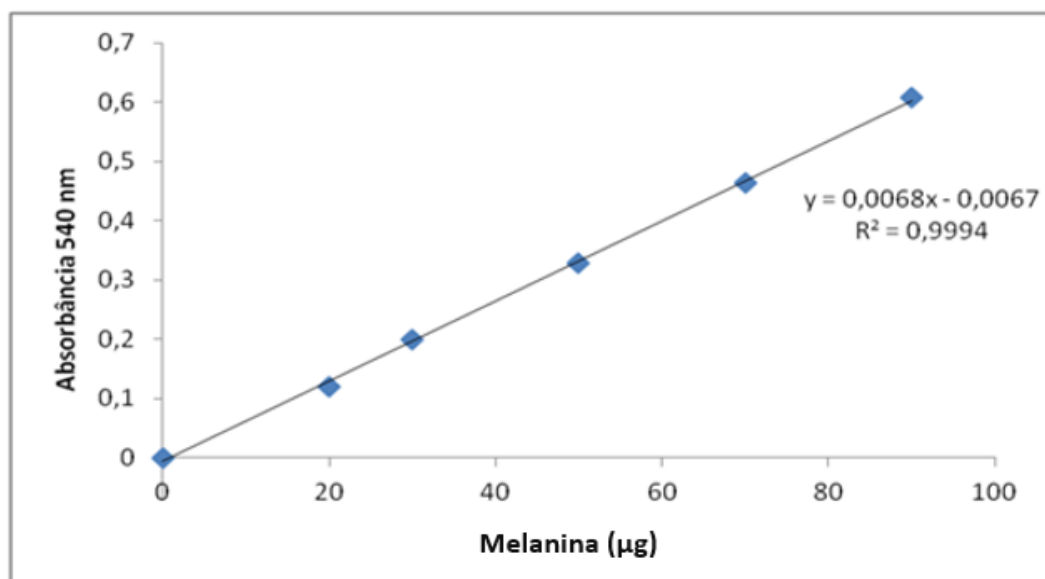
#### 4.8 Purificação da melanina

A purificação do pigmento foi realizada conforme método adaptado de Sava et al. (2001), onde o pigmento extraído foi hidrolisado com ácido clorídrico (HCl) 7mol L<sup>-1</sup> a 100°C por 2 horas e submetido a centrifugação a 12096 xg por 15 minutos a 10°C. O sedimento foi lavado com água destilada e solventes orgânicos (clorofórmio, acetato de etila e etanol) seguido de centrifugação a 1935 xg por 15 min a 20°C. O sedimento foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L<sup>-1</sup>, precipitado com ácido clorídrico (HCl) 3mol L<sup>-1</sup> e centrifugado a 12096 xg por 15 minutos a 10°C. Após estes procedimentos, a melanina purificada foi lavada com água destilada, seca em estufa a 55-60°C, pesada e a quantidade de pigmento obtido foi expresso em mg g<sup>-1</sup> de biomassa.

#### 4.9 Quantificação da melanina

A quantificação da melanina, foi feita conforme o descrito por Bull (1970). As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg de pigmento por mL de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro com o comprimento de onda de 540 nm. A quantidade de melanina em µg foi determinada a partir do coeficiente de absorvidade obtido da curva analítica da DOPA-melanina sintética (Figura 7). A quantidade total de melanina foi expressa em mg g<sup>-1</sup> de biomassa.

Figura 7. Curva de referência de DOPA-melanina sintética.



Fonte: (SOUSA, 2017).

#### **4.10 Determinação da atividade enzimática tirosinase e lacase pelo mutante MEL 1**

##### **4.10.1 Preparação do extrato enzimático livre de células**

Para a preparação do extrato enzimático livre de células foi realizado o cultivo do fungo em frascos, nas condições antes e após a otimização do meio de cultivo e com 72h de cultivo. Em seguida, a biomassa foi separada do caldo de cultivo por filtração a vácuo, triturada no almofariz utilizando nitrogênio líquido e solubilizada em tampão de extração (Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>; EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, PMFS 1 mmol L<sup>-1</sup>) na proporção de 0,5:2 (m/v), agitado por 1 minuto no vórtex e centrifugado a 8626 xg por 10 minutos (BRIDGE; KOKUBUN; SIMMONDS, 2004). O precipitado contendo os detritos celulares foi descartado e o sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado para os ensaios das atividades de tirosinase e lacase.

##### **4.10.2 Atividade da tirosinase**

Para a determinação da atividade de tirosinase foi feita seguindo o método adaptado de Amaral e Ribeiro (2013). O meio reacional apresentou 1,5mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>) pH 6,5 com L-tirosina (1mmol L<sup>-1</sup>) e 1,5mL de extrato enzimático.

A atividade da tirosinase foi avaliada pela formação o-quinona em função da variação da absorvância em 280 nm na porção linear da curva durante o período de 10 a 12 minutos, 25°C e pH 6,5. A atividade de tirosinase (U) foi determinada através da equação 1.

$$U. mL^{-1} = \frac{\Delta A_{280}}{\min * 1000} \cdot V_e \quad (1)$$

Onde:

**ΔA<sub>280</sub>**: variação da absorvância em um aumento linear por minuto;

**V<sub>e</sub>**: volume de extrato enzimático utilizado (1,5 mL).

#### **4.10.3 Atividade da lacase**

Para determinação da atividade da lacase foi feita seguindo o método adaptado descrito por Szklarz et al. (1989). O meio reacional foi composto por 0,3 mL de extrato enzimático, 1,3 mL de tampão citrato-fosfato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 5,0 e 0,4 mL de solução contendo siringaldazina. A solução de siringaldazina foi preparada adicionando 0,05 g de siringaldazina em 50 mL de etanol. Como controle negativo foi utilizado extrato enzimático fervido por 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$ .

A atividade da lacase foi avaliada pela oxidação da siringaldazina, a qual foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância a 525 nm após 10 minutos de reação a  $30^\circ\text{C}$ . A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar  $1 \mu\text{mol}$  de siringaldazina  $\text{min}^{-1}$ , usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) igual a  $6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (SZKLARZ et al., 1989).

#### **4.11 Determinação do teor de glicose**

A determinação do teor de glicose foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) SHIMADZU®. As amostras analisadas foram previamente filtradas em filtro SepPak C18. Para a análise de glicose foi utilizada a coluna analítica BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm). O método utilizado manteve a velocidade de fluxo de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , com volume de injeção fixo de  $20 \mu\text{L}$  e, além disso, a fase móvel utilizada foi composta por  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

## 4.12 Determinação dos parâmetros cinéticos de pigmentação

### 4.12.1 Velocidades instantâneas de transformação

As velocidades instantâneas de crescimento ( $r_x$ ), consumo de glicose ( $r_s$ ) e formação de melanina ( $r_p$ ), foram determinados pelas respectivas equações:

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (3)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (4)$$

### 4.12.2 Fatores de conversão

A determinação dos fatores de conversão (ou rendimentos) foi obtida correlacionando-se a massa de biomassa produzida (X), com a massa de glicose consumida (S) e a massa de melanina produzido (P), em gramas, em um determinado tempo de cultivo, conforme as equações:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (5)$$

Onde:

**Y<sub>x/s</sub>**: fator de conversão de glicose em biomassa (g/g);

**X**: concentração final de biomassa (g/L);

**X<sub>0</sub>**: concentração inicial de biomassa (g/L);

**S<sub>0</sub>**: concentração inicial de glicose (g/L);

**S**: concentração final de glicose (g/L).

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

Onde:

**Y<sub>p/s</sub>**: fator de conversão de glicose em melanina não purificada (g/g);

**P**: quantidade de melanina não purificada final (g);

**P<sub>0</sub>**: quantidade de melanina não purificada inicial (g);

**S<sub>0</sub>**: concentração inicial de glicose (g);

**S**: concentração final de glicose (g).

#### **4.12.3 Velocidades específicas de transformação**

As velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ), consumo de glicose ( $\mu_s$ ) e formação de melanina ( $\mu_p$ ), foram determinação respectivamente conforme as equações (GADEN, 1955):

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (8)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (9)$$

#### 4.12.4 Modelo cinético de Monod

O modelo cinético de Monod foi utilizado neste trabalho, conforme descrito pela equação:

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (10)$$

Onde:

$\mu_x$ : velocidade máxima específica de crescimento ( $h^{-1}$ );

$\mu_m$ : máxima velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ );

$K_s$ : constante de saturação;

$S$ : Concentração de glicose (g/L).

#### 4.12.5 Produtividade de pigmento ( $Q_p$ )

A produtividade de melanina, a qual expressa a produção de pigmento produzido ( $g\ g^{-1}$  de biomassa) por tempo (h), foi calculada de acordo com equação 12.

$$Q_p = \frac{P_m - P_o}{t_{fp}} \quad (11)$$

Onde:

$Q_p$ : produtividade de pigmento (mg/g/h);

$P_m$ : concentração máxima de pigmento (mg/g);

$P_o$ : concentração inicial de pigmento (mg/g);

$T_{fp}$ : tempo final da fermentação (h).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **5.1 Efeito da glicose, nitrato de sódio, melação, vinhaça e AMM na produção de melanina pelo mutante MEL1.**

Com o intuito de avaliar a influência da glicose, nitrato de sódio e dos subprodutos agroindustriais, AMM, melação e vinhaça, sobre a produção de melanina, primeiramente foi realizado um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  (Tabela 6 - com valores codificados e reais). Esta estratégia foi aplicada somente na etapa de cultura do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*, a qual corresponde a etapa de maior pigmentação.

**Tabela 6.** Matriz dos ensaios do planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  para a produção de biomassa e melanina pelo mutante MEL1. Os valores reais estão entre parênteses.

<b>Ensaio</b>	<b>AMM (v/v)</b>	<b>Melaço (v/v)</b>	<b>Vinhaça (v/v)</b>	<b>Nitrato de Sódio (m/v)</b>	<b>Glicose (m/v)</b>	<b>Melanina não purificada (mg g<sup>-1</sup> de biomassa)</b>	<b>Biomassa (g L<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0%)	1 (1%)	173,26	2,66
<b>2</b>	1 (1%)	-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0%)	22,86	1,75
<b>3</b>	-1 (0%)	1 (2%)	-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0%)	133,33	4,20
<b>4</b>	1 (1%)	1 (2%)	-1 (0%)	-1 (0%)	1 (1%)	151,04	7,68
<b>5</b>	-1 (0%)	-1 (0%)	1 (1%)	-1 (0%)	-1 (0%)	32,97	0,91
<b>6</b>	1 (1%)	-1 (0%)	1 (1%)	-1 (0%)	1 (1%)	46,46	4,95
<b>7</b>	-1 (0%)	1 (2%)	1 (1%)	-1 (0%)	1 (1%)	192,64	4,08
<b>8</b>	1 (1%)	1 (2%)	1 (1%)	-1 (0%)	-1 (0%)	74,98	6,94
<b>9</b>	-1 (0%)	-1 (0%)	-1 (0%)	1 (0,6%)	-1 (0%)	25,97	0,77
<b>10</b>	1 (1%)	-1 (0%)	-1 (0%)	1 (0,6%)	1 (1%)	53,43	4,96
<b>11</b>	-1 (0%)	1 (2%)	-1 (0%)	1 (0,6%)	1 (1%)	158,21	6,61
<b>12</b>	1 (1%)	1 (2%)	-1 (0%)	1 (0,6%)	-1 (0%)	57,08	6,92
<b>13</b>	-1 (0%)	-1 (0%)	1 (1%)	1 (0,6%)	1 (1%)	181,22	3,04
<b>14</b>	1 (1%)	-1 (0%)	1 (1%)	1 (0,6%)	-1 (0%)	12,23	1,64
<b>15</b>	-1 (0%)	1 (2%)	1 (1%)	1 (0,6%)	-1 (0%)	174,39	4,53
<b>16</b>	1 (1%)	1 (2%)	1 (1%)	1 (0,6%)	1 (1%)	99,75	7,97
<b>17</b>	0 (0,5%)	0 (1%)	0 (0,5%)	0 (0,3%)	0 (0,5%)	96,52	4,46
<b>18</b>	0 (0,5%)	0 (1%)	0 (0,5%)	0 (0,3%)	0 (0,5%)	94,90	4,90
<b>19</b>	0 (0,5%)	0 (1%)	0 (0,5%)	0 (0,3%)	0 (0,5%)	90,52	4,64

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, a suplementação do meio de cultivo com os subprodutos agroindustriais e soluções quimicamente conhecidas, como glicose e nitrato de sódio, influenciaram a produção de melanina pelo mutante MEL1, pois houve uma grande variação na quantidade de melanina não purificada produzida, variando de 12,23 a 192,64 mg g<sup>-1</sup> de biomassa (Ensaio 14 e 7, respectivamente - Tabela 6). Essa variação na produção de melanina, segundo Papagianni (2004), pode estar relacionada com os parâmetros do processo de cultivo que podem afetar a produtividade dos fungos, são eles: inoculo, composição do meio de cultivo, tipo e concentração das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, metais e outros íons, tensão de oxigênio dissolvido, tensão de dióxido de carbono dissolvido, pH do meio de cultura, temperatura e forças mecânicas. Além disso, o estudo destaca que a composição do meio de cultivo, usados nas fermentações industriais submersas, deve favorecer o crescimento e a formação do produto com altos rendimentos, mas para isso os fungos requerem água, uma fonte de carbono e de energia, uma fonte de nitrogênio e vários outros elementos.

Com os resultados apresentados nos ensaios 1 e 9 (Tabela 6), houve uma grande variação nos resultados sobre a produção de melanina não purificada, sendo que os valores obtidos foram de 173,26 mg g<sup>-1</sup> de biomassa na presença somente de glicose (Ensaio 1) e de 25,97 mg g<sup>-1</sup> de biomassa na presença somente de nitrato de sódio (Ensaio 9). Além disso, para o ensaio 9, o qual apresenta somente nitrato de sódio em sua composição, houve uma redução na produção de melanina não purificada de 147,29 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 6,67 vezes menor quando comparado com a produção de melanina não purificada em meio contendo somente glicose em sua composição (Ensaio 1). Esses resultados indicam que as fontes de carbono e nitrogênio influenciam a produção de melanina. Estudos realizados por Sun et al., (2016), o qual avaliou o efeito de nutrientes em meio de cultivo para a produção de melanina em *Auricularia auricula*, relatou que a presença de fontes de carbono no meio de cultivo, afeta tanto o crescimento micelial quanto a síntese de melanina, pois o carbono não é somente utilizado para as necessidades energéticas de manutenção das atividades celulares, como também para a biossíntese de melanina em *Auricularia auricula*. Por outro lado, a menor produção de melanina obtida na presença de fontes de nitrogênio também foram reportadas por Jiang et al. (2016), os quais reportaram um aumento na produção de melanina pela

linhagem da levedura XJ5-1 de *Aureobasidium melanogenum* na ausência de fontes de nitrogênio, tanto nas culturas em placas como em meio líquido. Estudos apresentados por Gmoser et al. (2017), sobre os fatores que influenciam na produção de pigmento por fungos filamentosos, sugerem que a limitação de nitrogênio em meios de cultivo pode aumentar a concentração de pigmentos totais na maioria das cepas de fungos filamentosos, uma vez que, a limitação de nitrogênio pode influenciar na taxa de metabolismo de aminoácidos. Com isso, Sanchez et al. (2013), em revisão sobre a produção de microbiana de carotenoides, sugere que com uma síntese lenta de proteínas e o crescimento lento do micro-organismo, causados pela limitação de nitrogênio, é capaz e favorecer a carotenogênese. Assim, estes estudos vão ao encontro dos resultados obtidos no ensaio 1 (Tabela 6), onde a ausência de nitrogênio e a presença de fonte de carbono, como a glicose, durante a etapa da cultura, favoreceu a produção de melanina pelo mutante MEL1 do *Aspergillus nidulans*.

Com o resultado apresentado no ensaio 7 (Tabela 6), o qual apresenta melaço, vinhaça e glicose em sua composição, houve uma maior produção de melanina não purificada com  $192,64 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, onde a adição de melaço, vinhaça e glicose ao meio de cultivo favoreceu a maior produção de melanina. Com isso, esses resultados vão ao encontro ao apresentado na literatura, pois estudos tem demonstrado que os micro-organismos apresentam uma preferência pelas fontes de carbono para obter energia para o crescimento e a formação do produto (THAIRA et al., 2019). Entretanto, esse aumento na produção de melanina não purificada, apresentado no ensaio 7 (Tabela 6) pode também estar relacionado com a ausência de fontes de nitrogênio, como o nitrato de sódio e AMM, uma vez que, estudos tem demonstrado que a limitação de nitrogênio pode favorecer a produção de pigmentos em fungos filamentosos (GMOSER et al., 2017; SANCHEZ et al., 2013). Além disso, a presença de melaço e vinhaça, no ensaio 7 (Tabela 5), pode ser visto como uma suplementação do meio de cultivo, pois em comparação com o ensaio 1 (Tabela 6), onde há apenas glicose em meio de cultivo, houve um aumento na produção de melanina não purificada de  $19,68 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, valor este equivalente a 1,11 vezes maior apenas com a adição de melaço e vinhaça. Com isso, Panesar, Kaur e Panesar (2015) afirmam que os meios sintéticos que apresentam uma suplementação com resíduos agroindustriais podem favorecer a produção microbiana de pigmento. Além disso, de acordo com o apresentado na Tabela 2, sobre a composição química

do melão e vinhaça, podemos notar que além de compostos como carbono e nitrogênio, também encontramos outros compostos que são capazes de favorecer a produção de melanina, como o cobre e fenóis. Essa análise vai de encontro aos estudos apresentados por Lopes e Ligabue-Braun (2021) e Walker e White (2005), que afirmam que os subprodutos agroindustriais apresentam nutrientes adicionais como: carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas que são capazes de favorecer o desenvolvimento fúngico e a obtenção de bioprodutos.

Outros dados encontrados na Tabela 6, demonstram que a presença somente dos subprodutos agroindustriais (AMM, melão e vinhaça), conforme o apresentado no ensaio 8, não exibiram uma elevada produção de melanina, contando com uma produção de melanina não purificada de 74,98 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, o equivalente a uma produção de melanina não purificada de 117,66 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este 2,57 vezes menor quando comparado ao ensaio 7, o qual apresenta melão, vinhaça e glicose em sua composição e onde houve a maior produção de melanina não purificada. A obtenção deste resultado pode ser devido a presença de AMM, pois este subproduto agroindustrial, segundo dados apresentados na Tabela 2, exibe uma elevada concentração de nitrogênio que pode afetar a produção de melanina. Segundo Tudzynski (2014), em estudos sobre a regulação do nitrogênio no metabolismo secundário de fungos, afirmam que qualidade e a quantidade da fonte de nitrogênio usada no meio de crescimento tem um efeito especial não apenas no crescimento e diferenciação, mas também na biossíntese de muitos metabolitos secundários fúngicos. Além disso, conforme apresentado em discussões anteriores, estudos tem demonstrado que a presença de fontes de nitrogênio prontamente metabolizáveis ou que favoreçam o crescimento microbiano podem reprimir ou inibir a produção de metabolitos secundários, como os pigmentos (GMOSER et al., 2017; SANCHEZ et al., 2013).

Analisando os resultados apresentados no ensaio 16 (Tabela 6), em meio contendo AMM, melão, vinhaça, nitrato de sódio e glicose, houve uma produção de melanina não purificada de 99,75 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor que corresponde a uma produção de melanina não purificada de 92,89 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente à 1,93 vezes menor ao encontrado no ensaio 7 (meio contendo melão, vinhaça e glicose) (Tabela 6), onde encontramos a maior produção de melanina não purificada (192,64 mg g<sup>-1</sup> de biomassa). Essa diminuição na produção de melanina

pode estar relacionada com a composição do meio de cultivo, onde a presença da AMM e do nitrato de sódio resultou em uma redução mais acentuada na quantidade de melanina produzida.

No ensaio 10 (Tabela 6), onde a composição do meio de cultivo também apresenta AMM, nitrato de sódio e glicose, foi obtida uma produção de melanina não purificada igual a 53,43 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor que equivale a uma redução de 139,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa (3,6 vezes menor) em relação ao ensaio 7, o qual contém melaço, vinhaça e glicose e a produção de melanina não purificada foi de 192,64 mg g<sup>-1</sup> de biomassa. Com isso, a presença de duas fontes de nitrogênio, AMM e nitrato de sódio, foram as variáveis que afetaram a produção de melanina. Isso pode ser confirmado comparando o ensaio 10 (meio contendo AMM, nitrato de sódio e glicose) com o ensaio 1 (meio cultivo somente com glicose) (Tabela 6), onde a composição do meio de cultivo não apresentou AMM e nitrato de sódio e a produção de melanina não purificada foi igual a 173,26 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, o que equivale a um aumento de 119,83 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, ou seja, 3,2 vezes maior do que no ensaio 10. Esses resultados mostraram que as fontes de nitrogênio, AMM e nitrato de sódio, utilizadas nos experimentos afetaram negativamente a produção de melanina pelo mutante MEL1. Como já abordado em discussões anteriores, estudos tem demonstrado que limitação de nitrogênio em meios de cultivo parece ser uma condição necessária para aumentar a concentração de pigmentos totais na maioria das cepas de fungos filamentosos (GMOSER et al., 2017).

Quando melaço e glicose estão presentes no mesmo meio, como no ensaio 7 (meio contendo melaço, glicose e vinhaça), a produção de melanina não purificada chegou a 192,64 mg g<sup>-1</sup> de biomassa o que equivale a um aumento de 59,31 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, ou seja, 1,4 vezes maior quando comparado ao ensaio 3, onde o meio de cultivo apresenta somente melaço, e a produção de melanina não purificada foi de 133,33 mg g<sup>-1</sup> de biomassa (Tabela 6). Esse resultado demonstra que a presença de duas fontes de carbono, melaço e glicose, pode ter favorecido o aumento da produção de melanina pelo mutante MEL1. Conforme discutido anteriormente, a presença de fontes de carbono no meio de cultivo é necessária tanto para o crescimento micelial quanto para a síntese de pigmento, pois o carbono não é somente utilizado para as necessidades energéticas de manutenção das atividades celulares, mas também para a biossíntese de biomoléculas (SUN et al., 2016).

Analisando os dados referentes a produção de biomassa, apresentados na Tabela 6, é possível verificar que a presença dos subprodutos agroindustriais também afetou o crescimento do mutante MEL1, com uma variação de 0,77 a 7,97 g L<sup>-1</sup> (Ensaio 9 e 16, respectivamente - Tabela 6). No ensaio 16 (meio contendo AMM, melaço, vinhaça, nitrato de sódio e glicose) foi obtida a maior produção de biomassa com 7,97 g L<sup>-1</sup>, porém a produção de melanina não purificada foi de 99,75 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, equivalente a uma redução de 92,89 mg g<sup>-1</sup> de biomassa (1,93 vezes menor) quando comparado ao ensaio 7 (meio contendo melaço, vinhaça e glicose), onde houve a maior produção de melanina não purificada igual a 192,64 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, porém a produção de biomassa foi de 4,08 g L<sup>-1</sup> (Tabela 6).

De acordo com os resultados obtidos, o meio de cultivo com condição de limitação de nutrientes, principalmente fonte de nitrogênio, como no caso do ensaio 7 (Tabela 6), houve uma baixa produção de biomassa e um aumento na produção de melanina enquanto que o meio rico em nutrientes, como no caso do ensaio 16, observa-se um aumento na produção de biomassa, porém a quantidade de melanina não purificada produzido foi menor (Tabela 6). Esses resultados confirmam que os componentes nutricionais presentes no meio de cultivo, afetam significativamente não apenas a taxa de crescimento micelial, mas também de outros metabólitos, como o pigmento melanina. Segundo Sanchez et al., (2013), a produção microbiana de carotenoides ocorre em condições que normalmente causam estresse ou inibem o crescimento celular, como a limitação de nutrientes. Além disso, eles afirmaram que para a maioria dos micro-organismos as condições ideais de crescimento geralmente não representam as condições ideais para maior produção de carotenoides.

Analisando os ensaios 7 (meio de cultivo contendo melaço, vinhaça e glicose) e 16 (meio de cultivo contendo AMM, melaço, vinhaça, nitrato de sódio e glicose) (Tabela 6), os quais apresentaram uma produção de biomassa de 4,08 e 7,97 g L<sup>-1</sup>, e uma produção de melanina não purificada de 192,64 e 99,75 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, respectivamente. Dessa forma o meio de cultivo com condição de limitação de nutrientes, principalmente com nitrogênio limitante, como no caso do ensaio 7 (Tabela 6), houve uma baixa produção de biomassa e um aumento na produção de melanina não purificada de 92,89 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,93 vezes maior, quando comparado ao ensaio 16 (Tabela 6). Já em meio contendo uma ampla gama de nutrientes disponíveis, como no caso do ensaio 16 (Tabela 6), podemos notar

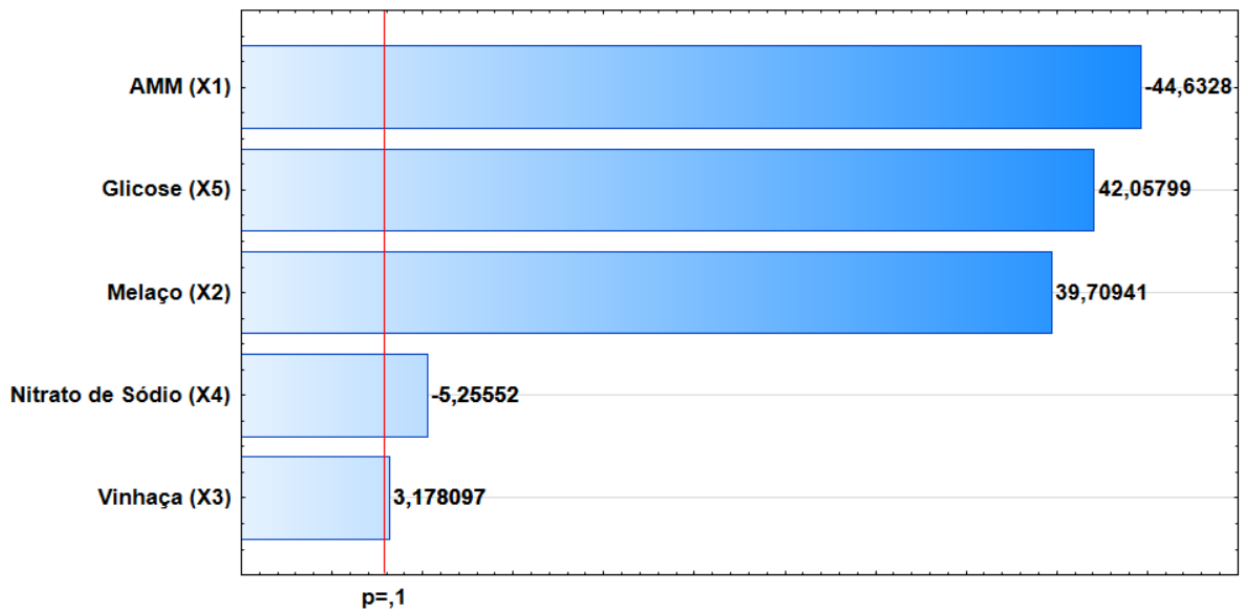
que há um aumento de  $3,89 \text{ g L}^{-1}$  na produção de biomassa, porém a produção de melanina não purificada diminuiu  $92,89 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, valor este equivalente a 1,93 vezes menor, quando comparado ao ensaio 7 (Tabela 6) onde houve a maior produção de melanina não purificada ( $192,64 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa). Esses resultados vão de encontro com a revisão apresentada por Sanchez et al. (2013) sobre a produção microbiana de carotenoides, o qual afirma que o meio de cultivo capaz de promover maior crescimento, como os dados obtidos no ensaio 16 (Tabela 6), não é o meio de cultivo correto para promover maior pigmentação, como os dados obtidos no ensaio 7 (Tabela 6).

Analisando a presença de uma única fonte de carbono ou de nitrogênio (Tabela 6), observa-se que no ensaio 1, cujo meio contém somente glicose, as produções de biomassa e de melanina não purificada foram maiores ( $2,66 \text{ g L}^{-1}$  e  $173,26 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, respectivamente) que no ensaio 9, onde o meio é composto somente por nitrato de sódio ( $0,77 \text{ g L}^{-1}$  e  $25,97 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, respectivamente). Esses resultados concordam com os relatos de Sun et al. (2016), os quais observaram que a fonte de carbono no meio é essencial para o crescimento e a síntese de melanina pelo fungo *Auricularia auricula*, uma vez que a sua presença não apenas supre a necessidade de energia celular, mas também fornece a estrutura de carbono para melanina durante a sua biossíntese pelo fungo.

Avaliando os principais efeitos das variáveis independentes sobre a produção de melanina não purificada, mostrado na Figura 8, verifica-se que todas as variáveis testadas são significativas estatisticamente ( $p < 0,10$ ). Entretanto, as variáveis AMM e nitrato de sódio demonstraram um efeito negativo ( $p < 0,10$ ) sobre a produção de melanina não purificada, podendo acarretar em uma diminuição na produção de melanina quando aplicados ao meio de cultivo. Além disso, estes dados sugerem que a aplicação destas duas variáveis independentes deve ser feita em seu nível inferior (-1), onde suas concentrações encontraram-se iguais a 0% (v/v), indicando que exclusão destas do meio de cultivo pode aumentar a produção de pigmento. Por outro lado, as variáveis melaço, vinhaça e glicose apresentaram efeitos positivos ( $p < 0,10$ ) na produção de melanina não purificada, sugerindo que a aplicação destas variáveis deve ser feita em seu nível superior (+1), onde as concentrações são: 2%(v/v), 1%(v/v) e 1% (m/v) respectivamente, indicando que um aumento destas concentrações pode acarretar em um aumento na produção de melanina. Com isso, essas análises

confirmaram os resultados do ensaio 7 (Tabela 6), onde a maior produção de melanina não purificada (192,64 mg g<sup>-1</sup> de biomassa) foi obtida no meio de cultivo contendo melaço, vinhaça e glicose.

**Figura 8.** Gráfico de Pareto sobre a análise dos principais efeitos das variáveis independentes sobre a produção de melanina pelo mutante MEL1 em função do planejamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup>.



Diante dos resultados apresentados, outros ensaios deveriam ser elaborados para otimizar as concentrações das variáveis significativas glicose, vinhaça e melaço, com o intuito de alcançar uma maior produção de melanina. Com isso, foi elaborado um planejamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> conforme o apresentado na Tabela 7 (com valores codificados e reais).

Neste segundo planejamento experimental (Tabela 7) a produção de melanina não purificada apresentou uma variação de 129,85 a 218,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa (Ensaio 2 e 9 respectivamente). Essa variação nos resultados mostra que a seleção das variáveis independentes e suas concentrações foram corretamente aplicadas e destacam suas importâncias para a produção e obtenção de melanina pelo mutante MEL1.

**Tabela 7.** Matriz dos ensaios do DCCR 2<sup>3</sup> para a produção de biomassa e melanina pelo mutante MEL1. Os valores reais estão entre parênteses.

<b>Ensaio</b>	<b>Melaço (v/v)</b>	<b>Vinhaça (v/v)</b>	<b>Glicose (m/v)</b>	<b>Melanina não purificada (mg g<sup>-1</sup> de biomassa)</b>	<b>Biomassa (g L<sup>-1</sup>)</b>
1	-1 (1,00%)	-1 (0,50%)	-1 (0,50%)	197,92	3,36
2	1 (3,90%)	-1 (0,50%)	-1 (0,50%)	129,85	6,32
3	-1 (1,00%)	1 (1,95%)	-1 (0,50%)	164,59	4,01
4	1 (3,90%)	1 (1,95%)	-1 (0,50%)	135,58	5,20
5	-1 (1,00%)	-1 (0,50%)	1 (1,95%)	198,81	3,37
6	1 (3,90%)	-1 (0,50%)	1 (1,95%)	174,80	5,12
7	-1 (1,00%)	1(1,95%)	1(1,95%)	177,29	4,32
8	1 (3,90%)	1 (1,95%)	1 (1,95%)	165,11	5,36
9	-1,68 (0,00%)	0 (1,23%)	0 (1,23%)	218,21	3,46
10	1,68 (4,89%)	0 (1,23%)	0 (1,23%)	203,56	5,33
11	0 (2,45%)	-1,68 (0,00%)	0 (1,23%)	202,85	4,91
12	0 (2,45%)	1,68 (2,40%)	0 (1,23%)	166,52	5,62
13	0 (2,45%)	0 (1,23%)	-1,68 (0,00%)	148,83	3,83
14	0 (2,45%)	0 (1,23%)	1,68 (2,44%)	180,14	4,33
15	0 (2,45%)	0 (1,23%)	0 (1,23%)	189,74	5,00
16	0 (2,45%)	0 (1,23%)	0 (1,23%)	191,29	5,50
17	0 (2,45%)	0 (1,23%)	0 (1,23%)	199,00	5,28

Com análise dos ensaios 9 (meio de cultivo com 1,23% de vinhaça e 1,23 % de glicose) e 10 (meio de cultivo com 4,89% de melaço, 1,23% de vinhaça e 1,23 % de glicose) (Tabela 7), os quais apresentaram uma produção de melanina não purificada de 218,21 e 203,56 mg g<sup>-1</sup> de biomassa respectivamente, podemos observar que houve uma diminuição na produção de pigmento de 14,65 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,07 vezes menor para o ensaio 10 (Tabela 7). Essa diminuição na produção de melanina não purificada pode ser devido a presença de melaço, juntamente com glicose, no meio de cultivo (Ensaio 10 – Tabela 7), pois

quando ausente (Ensaio 9 – Tabela 7) proporciona um aumento na produção de melanina não purificada. Este resultado pode ser devido à presença destas duas fontes de carbono favorecer o crescimento do fungo em comparação a produção de melanina. Isso foi confirmado pelo aumento de 1,54 vezes (equivalente a  $1,87 \text{ g L}^{-1}$ ) na produção de biomassa no ensaio 10, quando melaço e glicose estavam presentes no meio, comparado ao ensaio 9, que contém somente glicose (Tabela 7). Resultados similares foram obtidos por Da Silva, Ienczak e Moritz (2021), os quais observaram que na presença de melaço ocorreu um aumento na produção de biomassa, mas uma baixa produção de pigmento indicando que esta fonte de carbono é adequada para o crescimento de *Monascus ruber*. De acordo com a literatura, a produção de metabólitos secundários, como o pigmento melanina, frequentemente ocorre após uma redução na taxa de crescimento devido à limitação de nutriente, ou seja, não ocorre uma ativação das vias do metabolismo secundário enquanto houver disponibilidade de nutrientes para o crescimento do fungo (GRIFFIN; GIMENO, 1995). Gmoser et al., (2018), em estudos a produção de  $\beta$ -caroteno por *Neurospora intermédia*, relataram que o crescimento microbiano pode não estar associado a produção de pigmento, uma vez que sob condições favoráveis os nutrientes são efetivamente convertidos em biomassa ao invés de formação de pigmento.

Os resultados apresentados nos ensaios 11 (meio de cultivo com 2,45% de melaço e 1,23% de glicose) e 12 (meio de cultivo com 2,45% de melaço, 2,40% de vinhaça e 1,23% de glicose) (Tabela 7), com uma produção de melanina não purificada de 202,85 e 166,52  $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa respectivamente, podemos notar uma diminuição na produção de melanina não purificada de 36,33  $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa, valor este equivalente 1,22 vezes menor no ensaio 12 (Tabela 7) quando comparado ao ensaio 11 (Tabela 7). Esse declínio na produção de melanina pode estar relacionado com a presença de vinhaça ao meio de cultivo, uma vez que, na presença de alta concentração de vinhaça (2,40% v/v) no ensaio 12 (Tabela 7) ocorreu uma menor produção de melanina não purificada. Por outro lado, a presença de vinhaça em baixa concentração parece ser necessária para uma maior produção de melanina, como o apresentado no ensaio 9 (meio de cultivo com 1,23% de vinhaça e 1,23 % de glicose), onde ocorreu a maior produção de melanina não purificada (218,21  $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa) e a concentração de vinhaça era 1,23% (v/v), comparado com o ensaio 12, cuja concentração de vinhaça era 2,40% (v/v) e a produção de melanina não

purificada foi de 166,52 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, indicando que a diminuição da concentração de vinhaça pode aumentar a produção de melanina não purificada em 51,72 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,31 vezes maior como no caso do ensaio 9 (Tabela 7). Estes resultados podem ser explicados pela presença de alguns componentes presentes na vinhaça, como fenóis e cobre, os quais desempenham um papel importante como precursores para a síntese de pigmento melanina em fungos (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; POMBEIRO-SPONCHIADO. et al., 2017; TRAN-LY et al., 2020a). Kim et al. (2004), avaliando o efeito do fenol na produção de carotenóides totais no cultivo de *Rhodotorula glutinis*, reportaram que o fenol é um fator determinante na produção de  $\beta$ -caroteno por *Rhodotorula glutinis* K-501, pois ocorreu um aumento 35% quando 500 ppm de fenol foi adicionado ao meio de cultura. Estudos apresentados por Guo et al., (2014), sobre a produção elevada de melanina por um novo isolado de *Streptomyces kathirae*, observaram que em meio de cultivo otimizado, contendo sulfato de cobre apresentou uma concentração máxima de melanina de 13 g L<sup>-1</sup>, valor este equivalente a 8,6 vezes maior do que o obtido em meio de cultivo subótimo. Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, o qual avaliou o efeito de indutores na melanização do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*, observaram que a presença de sulfato de cobre no meio de cultivo promoveu um aumento de 7,37 vezes na produção de melanina, equivalente a um acréscimo de 125,42 mg g<sup>-1</sup> de biomassa quando comparado ao valor obtido nas condições antes da otimização (MEDEIROS, 2020).

Em análise dos ensaios 13 (meio de cultivo com 2,45% de melaço e 1,23% de vinhaça) e 14 (meio de cultivo com 2,45% de melaço, 1,23% de vinhaça e 2,44% de glicose) (Tabela 7), podemos notar uma produção de melanina não purificada de 148,83 e 180,14 mg g<sup>-1</sup> de biomassa respectivamente, demonstrando um aumento na produção de melanina não purificada de 31,31 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,21 vezes maior para ensaio 14 (Tabela 7). Esse aumento na produção de melanina parece estar relacionado a adição de glicose ao meio de cultivo, pois comparando a composição dos meios de cultivos dos ensaios 13 (meio de cultivo com 2,45% de melaço e 1,23% de vinhaça) e 14 (meio de cultivo com 2,45% de melaço, 1,23% de vinhaça e 2,44% de glicose) (Tabela 7), podemos notar que na ausência de glicose (ensaio 13) a produção de melanina não purificada apresentou-se inferior quando comparado ao ensaio 14, o qual apresentou a glicose em sua composição.

Também se observa no ensaio 13 que a presença de melaço como única fonte de carbono, mesmo quando em alta concentração (2,45%), não favoreceu a produção de melanina não purificada. Vários estudos têm demonstrado que a glicose é uma fonte de carbono facilmente metabolizável pela maioria dos microrganismos para obter energia para o crescimento e também para a formação de produtos (BÜHLER et al., 2013; DA COSTA SOUZA et al., 2016; GMOSER et al., 2018; THAIRA et al., 2019; SUN et al., 2016). Outros estudos como Rani et al. (2013), que avaliaram a produção de melanina em levedura negra *Hortaea werneckii*, obtiveram a maior produção de melanina na presença de glicose como fonte de carbono. Neste sentido, os resultados obtidos nestes ensaios indicam que a glicose pode estar sendo requerida para a produção específica de melanina.

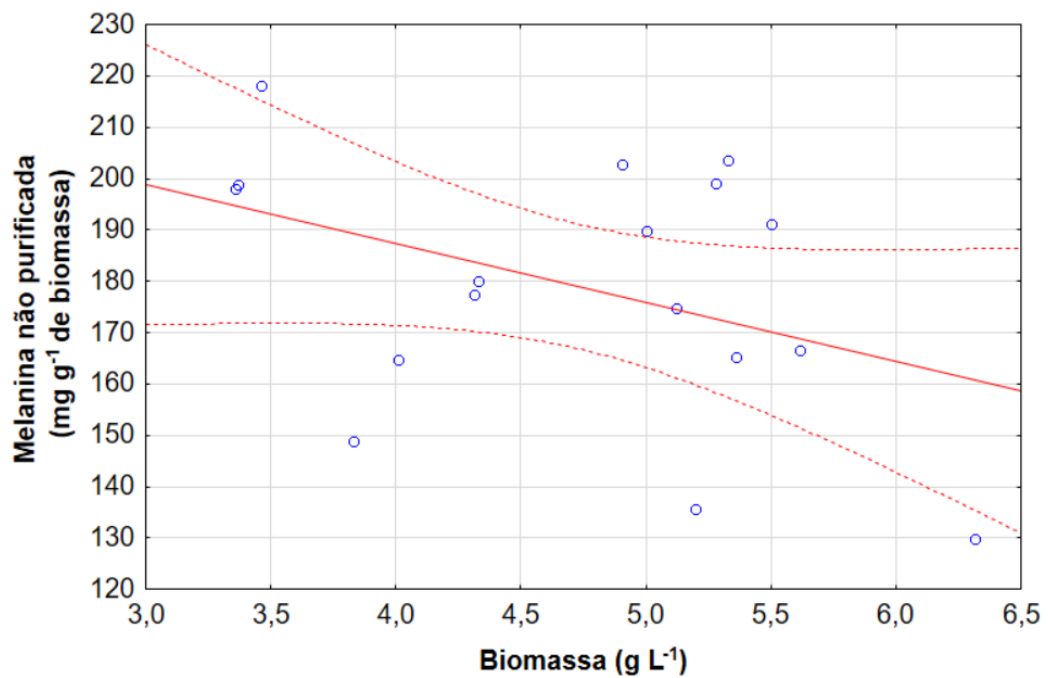
Na Tabela 7 a produção de biomassa apresentou uma variação na produção de 3,36 a 6,32 g L<sup>-1</sup> (Ensaio 1 e 2, respectivamente). Como mencionado anteriormente, essa variação na produção de biomassa está diretamente relacionada com a composição do meio de cultivo do micro-organismo. Como observado no ensaio 1 (Tabela 7), meio composto por melaço (1% v/v), vinhaça (0,50% v/v) e glicose (0,50% m/v), a produção de biomassa foi de 3,36 g L<sup>-1</sup>, valor este equivalente a 1,88 vezes menor do que o encontrado no ensaio 2 (Tabela 7), onde o meio contém melaço (3,90% v/v), vinhaça (0,50% v/v) e glicose (0,50% m/v) e a produção de biomassa foi de 6,32 g L<sup>-1</sup>. Por outro lado, uma diminuição na produção de melanina não purificada é observada quando comparamos o ensaio 1 (meio de cultivo com 1% de melaço, 0,50% de vinhaça e 0,50% de glicose) e 2 (meio de cultivo com 3,90% de melaço, 0,50% de vinhaça e 0,50% de glicose) (Tabela 7), onde a produção foi de 197,92 e 129,85 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, respectivamente. Dessa maneira, há um aumento na produção de biomassa de 2,96 g L<sup>-1</sup> quando elevamos a concentração de melaço de 1% para 3,90% (v/v), porém, ocorre uma redução de 68,07 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,52 vezes menor na produção de melanina não purificada, com o aumento da concentração de melaço. Estudos apresentados por Da Silva, Ienczak e Moritz (2021), os quais testaram melaço e farinha de arroz para a produção de pigmento vermelho por *Monascus ruber*, mostraram que a aplicação somente de melaço no meio de cultivo aumentou a produção de biomassa. Eles explicam que o aumento da produção de biomassa pode estar relacionado com a composição do melaço, o qual contém nitrogênio, potássio, cloro, magnésio, fósforo e carbono, que

são responsáveis pelo maior crescimento do fungo obtida nesta cultura, mas esses nutrientes não promoveram um aumento na produção de pigmento. Assim, a determinação da concentração ideal de melação em meio de cultivo é fundamental para a obtenção de pigmento pelo mutante MEL1.

Para os resultados obtidos nos ensaios 2 (meio de cultivo com 3,90% de melação, 0,50% de vinhaça e 0,50% de glicose) e 9 (meio de cultivo com 1,23% de vinhaça e 1,23 % de glicose) (Tabela 7) confirmam que a composição do meio de cultivo ideal para uma maior produção de melanina, não é a mesma para uma maior produção de biomassa. No ensaio 9, o qual apresentou a maior produção de melanina não purificada (218,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa), sendo 88,36 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,68 vezes maior que a produção de melanina não purificada no ensaio 2 (129,85 mg g<sup>-1</sup> de biomassa), a produção de biomassa foi de 3,46 g L<sup>-1</sup>, sendo 2,86 g L<sup>-1</sup> inferior àquela obtida no ensaio 2 (6,32 g L<sup>-1</sup>). Esses resultados indicam que os meios de cultivo que contenham elevadas concentrações de fontes de carbono não são adequados para promover a maior pigmentação. Assim, esses resultados concordam com aqueles apresentados por Sanchez et al., (2013), os quais afirmam que para a maioria dos micro-organismos as condições ideais de crescimento geralmente não representam as mesmas condições ideais de maior produção de pigmento.

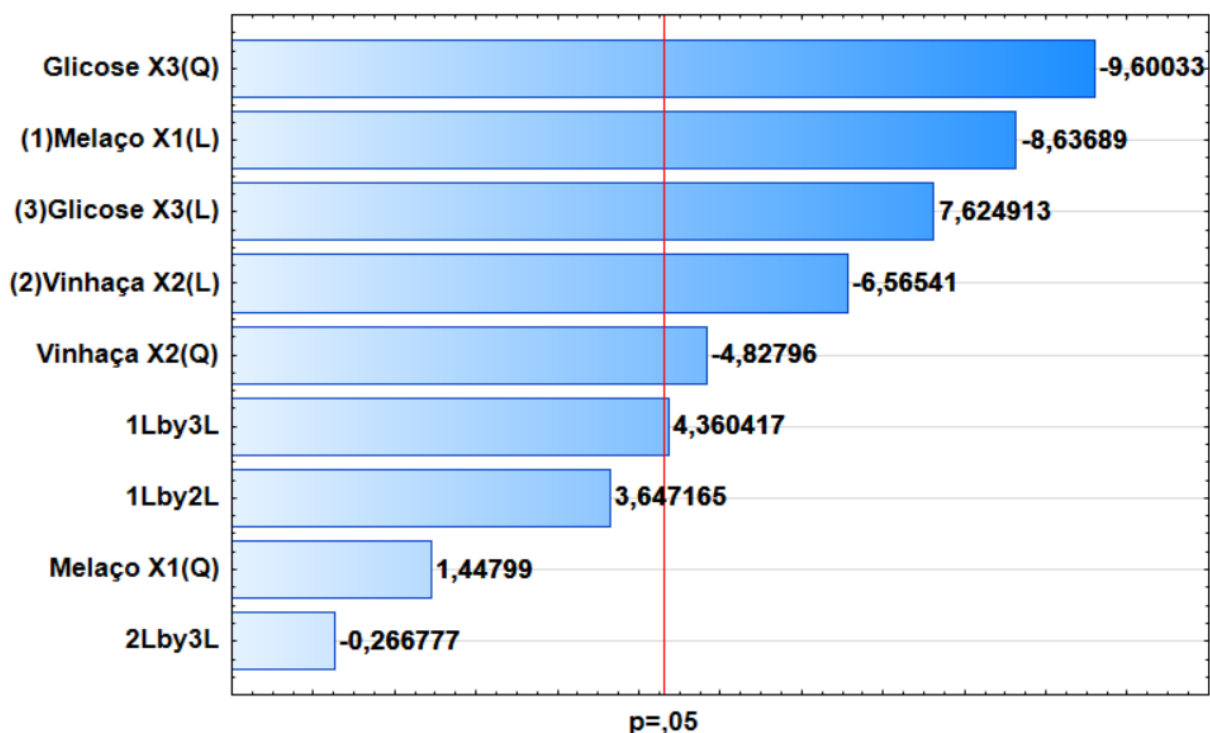
Para melhor compressão dos resultados apresentados na Tabela 7 em relação a produção de melanina não purificada e de biomassa nas diferentes condições, foi realizada a análise de correlação de ordem de Spearman (Figura 9). Os resultados obtidos mostraram que não existe correlação ( $p > 0,05$ ), indicando que um aumento na produção de biomassa não acarretou um aumento na produção de melanina não purificada. Com essa análise foi demonstrado que a otimização das variáveis independentes está especificamente relacionada com uma maior produção de melanina pelo mutante MEL1 ao invés da produção de biomassa.

**Figura 9.** Gráfico da Correlação de ordem de Spearman com os dados da produção de biomassa e melanina não purificada obtidos no DCCR 2<sup>3</sup>.



Na análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de melanina não purificada (Figura 10), as variáveis melaço (linear), vinhaça (linear e quadrática), glicose (linear e quadrática) e a interação entre melaço e glicose (ambos lineares) são significativos ( $p < 0,05$ ) para a produção de pigmento. Entretanto, melaço (linear) e vinhaça (linear e quadrática) apresentaram efeitos negativos para a produção de melanina não purificada, indicando que a presença destas variáveis ao meio de cultivo deve ser feita apenas em baixas concentrações para que haja um aumento na produção de melanina. Com isso, esses resultados vão de encontro com o apresentado na Tabela 7 nos ensaios de 9 (meio de cultivo com 1,23% de vinhaça e 1,23% de glicose) a 12 (meio de cultivo com 2,45% de melaço, 2,40% de vinhaça e 1,23% de glicose), onde podemos observar os efeitos das variáveis vinhaça e melaço, uma vez que, ao inclui-las em suas maiores concentrações (nível axial superior +1,68) ocorre uma diminuição na quantidade de melanina não purificada produzida.

**Figura 10.** Gráfico de Pareto sobre análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de melanina pelo mutante MEL1 em função do planejamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>.



Em análise da Figura 10, a variável glicose apresenta-se significativa ( $p < 0,05$ ) e com dois efeitos, positivo no linear e negativo no quadrático. Essa diferença sobre a análise dos efeitos mostra que esta variável deve ser aplicada ao meio de cultivo em seu nível zero (1,23% m/v) para aumentar a produção de melanina. Dessa forma, esses resultados concordam com o que foi obtido no ensaio 9 (Tabela 7) onde encontramos a maior produção de melanina não purificada (218,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa) em meio contendo glicose com a concentração de 1,23% (m/v) comparado ao ensaio 14 (Tabela 7), cuja produção de melanina não purificada foi menor (180,14 mg g<sup>-1</sup> de biomassa) quando a concentração de glicose estava em 2,44% (m/v).

Na análise dos efeitos (Figura 10), pode-se notar que a interação entre melaço (linear) e glicose (linear), se mostrou significativa ( $p < 0,05$ ). Essa interação pode ser observada no ensaio 11, onde o meio de cultivo contendo 2,45% (v/v) de melaço e 1,23% (m/v) de glicose mostrou uma produção de melanina não purificada de 202,85 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, o que representa um aumento de 54,02 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente 1,36 vezes maior que no ensaio 13, cujo meio de cultivo contém 2,45% (v/v) de melaço e 1,23% (m/v) de vinhaça e a quantidade de melanina não

purificada produzida foi de 148,83 mg g<sup>-1</sup> de biomassa (Tabela 7). No entanto, o resultado obtido no ensaio 9 (Tabela 7) mostrou que uma maior produção de melanina não purificada (218,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa) foi obtida quando o meio de cultivo contém apenas vinhaça e glicose, ou seja, o melaço não está presente em sua composição. Como pode ser observado no ensaio 10 (Tabela 7), a presença de melaço (4,89%, v/v), juntamente com vinhaça (1,23%, v/v) e glicose (1,23%, m/v), possibilitou uma produção de melanina não purificada de 203,56 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, equivalendo a uma redução na quantidade de melanina não purificada produzida de 14,65 mg g<sup>-1</sup> de biomassa quando comparado ao ensaio 9, cuja meio contém vinhaça (1,23%, v/v) e glicose (1,23%, v/v), sem a presença de melaço (Tabela 7). Com isso, esses resultados indicam que o melaço não é a uma fonte de carbono adequada para promover a pigmentação pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans* e que a sua exclusão do meio de cultivo pode favorecer a produção de melanina.

Na análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 8, encontramos que o modelo proposto para a produção de melanina (equação 12) é significativo, uma vez que, o F calculado foi significativo (p<0,05) e, além disso, pela análise de distribuição F foi possível notar que o modelo não apresentou falta de ajuste (p>0,05).

**Tabela 8.** Análise de variância para a produção de melanina pelo mutante MEL1 em função do planejamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc.	F crit.	p-valor
Regressão	8157,928	8	1019,741	4,639118	3,44	0,021948
Resíduos	1758,508	8	219,8136			
Falta de ajuste	1709,302	6	284,8836	11,57904	19,33	0,081619
Erro Puro	49,20678	2	24,60339			
<b>Total</b>	<b>9916,437</b>	<b>16</b>				

Todos os valores numéricos são fatores significativos (nível de 95% de confiança). R<sup>2</sup> = 0,822491.

$$Y = 194,47 - 23,16 x_1 - 17,62 x_2 - 14,26 x_2^2 + 20,46 x_3 - 28,35 x_3^2 + 15,29 x_1x_3$$

### Equação 12

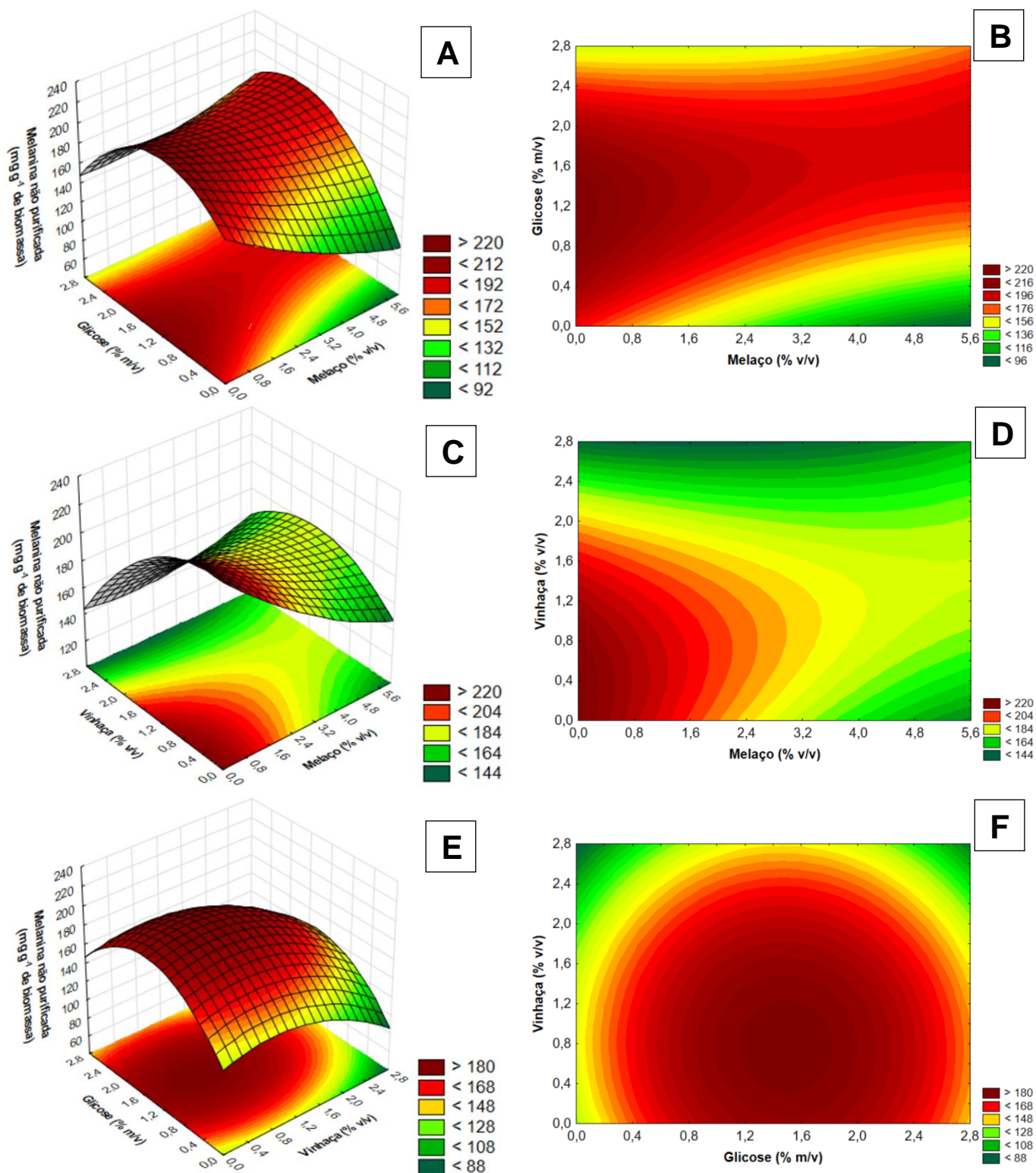
onde y é a variável resposta (produção de melanina não purificada) e x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> são melaço, vinhaça e glicose, respectivamente.

De acordo com o modelo matemático proposto (equação 12), foi possível obter os gráficos de superfície de resposta (Figura 11), os quais expressam a produção de melanina não purificada ( $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa) em relação a concentração das variáveis independentes estudadas.

Na análise das superfícies de respostas (Figura 11), a maior produção de melanina não purificada ocorre sempre na presença de glicose, sugerindo que esta variável é essencial para produção de melanina pelo mutante MEL1. Estudos realizados por Huang et al. (2017) demonstraram que ocorre um aumento nos rendimentos de pigmentos amarelos extracelulares e intracelulares com *Monascus ruber* CGMCC 10910 quando a concentração de glicose inicial é aumentada no meio de cultivo. Além disso, eles elucidam que a elevada concentração da glicose foi capaz de regular positivamente a expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de pigmentos, em especial a biossíntese de pigmentos amarelos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos afirmar que a aplicação de glicose em meio de cultivo deve ser feita visando o aumento na produção de melanina.

Na análise das interações apresentadas na Figura 11, a interação entre glicose e melaço (Figura 11A e 11B), expressa uma produção de melanina não purificada, confirmando o obtido pela análise dos efeitos (Figura 10). Entretanto, para uma maior produção de melanina não purificada a concentração de melaço sugerida pela superfície de resposta (Figura 11A e 11B) deve ser 0% (v/v) enquanto a concentração de glicose deve ser 1,63% (m/v). Esse resultado está de acordo com o apresentado na Tabela 7 no ensaio 9, onde o meio de cultivo contendo 1,23% (v/v) de vinhaça e 1,23% (m/v) de glicose, sem a presença de melaço, apresentou a maior produção de melanina não purificada ( $218,21 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa). Uma provável explicação para a ausência e/ou exclusão do melaço do meio de cultivo, conforme discutido anteriormente, é devido a sua capacidade para promover um aumento na produção de biomassa e uma baixa produção de melanina.

**Figura 11.** Superfície de resposta para a produção de melanina não purificada ( $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa) pelo mutante MEL1 e a interação entre as variáveis independentes.



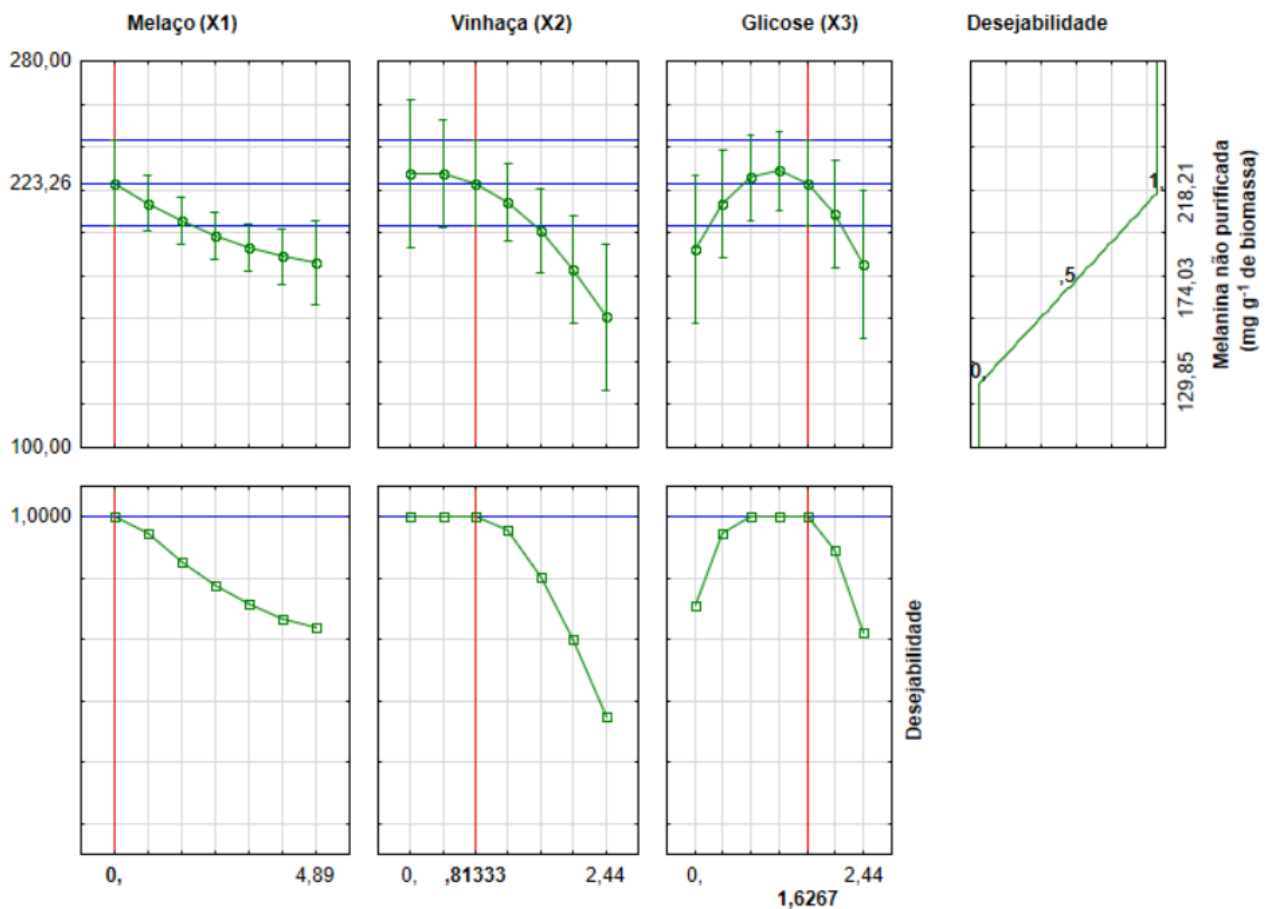
Para a análise da interação entre vinhaça e melaço nas Figuras 11C e 11D, a presença de ambos os subprodutos agroindustriais em meio de cultivo pode acarretar em uma baixa produção de melanina não purificada. Essa baixa produção de melanina pode estar relacionada com as concentrações das variáveis aplicadas nos ensaios. Por outro lado, em análise da Figura 11D, nos sugere que para um aumento na produção de melanina as concentrações ideais de vinhaça e melaço devem ser de 0,81% (v/v) e 0% (v/v) respectivamente, confirmando o discutido nas Figuras 11A e 11B. Ainda, esses resultados confirmam a análise dos efeitos apresentada na Figura 9, onde é possível observar que a interação entre melaço e vinhaça não apresentam efeitos significativos para a produção de melanina não purificada. Além disso, os dados obtidos na Tabela 7 no ensaio 13, onde o meio de cultivo apresentava apenas vinhaça e melaço, a produção de melanina não purificada foi de 148,83 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, o equivalente a uma produção de melanina não purificada com 69,38 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este equivalente a 1,47 vezes menor que a condição de maior produção de melanina não purificada (ensaio 9 – Tabela 7), indicando que não é possível otimizar as concentrações destas duas variáveis para que haja um aumento na produção de melanina.

Na análise da interação entre vinhaça e glicose (Figura 11E e 11F), houve uma elevada produção de melanina não purificada na presença de ambos compostos nas concentrações 0,81% (v/v) e 1,63% (m/v) respectivamente. Além disso, está análise confirma o resultado apresentado no ensaio 9 (Tabela 7), onde foi possível obter a maior produção de melanina não purificada, com 218,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa em meio de cultivo contendo somente vinhaça e glicose. No entanto, os resultados apresentados nas Figuras 11E e 11F reforçam o encontrado na literatura, pois estudos tem demonstrado que o uso de fontes de carbono, como glicose, pode favorecer não somente o crescimento micelial dos fungos, como também favorece a produção de pigmento (SUN et al., 2016; THAIRA et al., 2019). Por outro lado, a utilização da vinhaça no meio de cultivo pode estar relacionada com a sua composição, pois segundo a dados apresentados na Tabela 2, podemos notar que a vinhaça apresenta um elevado conteúdo de teor orgânico capaz servir como fonte de carbono para favorecer o desenvolvimento microbiano (SAGLAM et al., 2018). Além disso, a presença de outros compostos presentes na vinhaça, como o cobre e fenóis, pode favorecer a produção de melanina. Nosanchuk, Stark e Casadevall (2015)

demonstraram que a síntese de melanina por *Cryptococcus neoformans* requer a adição de substratos fenólicos exógenos para formar o pigmento via lacase. Estudos realizados por Baldrian (2006) e, Ramsden e Riley (2014), descrevem que íons de cobre podem atuar como indutores das enzimas lacase e tirosinase, responsáveis pela melanização, uma vez que o cobre é capaz de atuar como um cofator no sítio catalítico destas enzimas. Dessa forma, esses relatos da literatura, confirmam que a presença de glicose e vinhaça na composição do meio de cultivo é capaz de favorecer a produção de melanina no mutante MEL1.

Para garantir a validação experimental do modelo obtido no planejamento composto central rotacional, foi utilizado a função de desejabilidade (Figura 12), a qual apresenta os valores máximos para a variável resposta em função da combinação das variáveis independentes em seus níveis ótimos.

**Figura 12.** Função de desejabilidade (com os valores reais) para a produção de melanina não purificada ( $\text{mg g}^{-1}$  de biomassa) em função da combinação das variáveis independentes em seus níveis ótimos.



Na análise apresentada pela Figura 12 o valor predito pelo modelo para a produção de melanina não purificada é de 223,26 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, entretanto, esta produção somente será alcançada quando as variáveis independentes apresentarem as concentrações preditas pela função de desejabilidade. Assim, a formulação do meio de cultivo e para uma maior produção de melanina, predita pela função de desejabilidade, deve conter: 0,81% (v/v) de vinhaça, 1,62% (m/v) de glicose e 0% (v/v) de melaço. Estes resultados confirmam aquele apresentado na Tabela 7 (Ensaio 9), onde a maior produção de melanina não purificada (218,21 mg g<sup>-1</sup> de biomassa) foi obtida no meio de cultivo composto por 0% (v/v) de melaço, 1,23% (v/v) de vinhaça e 1,23% (m/v) de glicose, ou seja, condições próximas àquela estimada pela função de desejabilidade. Outros dados encontrados nas Figuras 11E e 11F, sobre a superfície de resposta, também confirmaram o predito pela função desejabilidade, onde encontramos o ponto da máxima produção de melanina não purificada quando vinhaça e glicose estão presentes no meio de cultivo. A explicação para estes resultados, conforme discussões anteriores, está relacionada com o fato da glicose ser uma fonte de carbono prontamente assimilável capaz de promover o desenvolvimento microbiano e, conseqüentemente favorecer a produção de metabolitos secundários de valor agregado (SUN et al., 2016; THAIRA et al., 2019). A ausência de melaço pode ser justificada pelo fato que a sua presença fornece nutrientes que promovem maior crescimento do fungo, porém uma menor produção de pigmento (DA SILVA; IENCZAK; MORITZ, 2021). Por outro lado, a vinhaça se destaca pela sua composição, pois pode apresentar-se como fonte de carbono, capaz de favorecer o crescimento de micro-organismos e, pela presença de compostos específicos como o cobre que é capaz de promover a pigmentação em fungos (KAHRAMAN; YEILADA, 2001; SAGLAM et al., 2018; WALKER; WHITE, 2005). Outros compostos presentes na vinhaça, como os fenóis, também podem ter favorecido a produção de melanina pelo mutante MEL1, pois este pigmento é sintetizado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos (GONÇALVES.; LISBOA; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2012; TRAN-LY et al., 2020).

Com base nos resultados apresentados pela função de desejabilidade, foram realizados ensaios para a validação das condições de cultivo do mutante MEL1, no qual foi obtido uma produção de melanina não purificada de  $291,74 \pm 4,59 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa. Com isso, estes ensaios comprovam que foi possível otimizar a produção de melanina mediante a aplicação das concentrações das variáveis independentes previstas pela função de desejabilidade.

Comparando a produção de melanina não purificada, antes e após a otimização (Tabela 9), é possível notar que na condição estabelecida em estudos anteriores a quantidade de pigmento obtido foi de  $155,15 \pm 19,91 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, enquanto que a condição otimizada no presente trabalho alcançou o valor de  $291,74 \pm 4,59 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, representando um aumento de  $136,59 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, valor este equivalente a 1,88 vezes maior quando comparado a condição anterior. Em relação a quantidade de melanina purificada, obteve-se um aumento de  $125,07 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa na condição otimizada, valor este equivalente a 2,25 vezes maior quando comparado com a condição anterior. Com isso, é possível afirmar que este aumento na produção de melanina pelo mutante MEL1 está diretamente relacionado a composição do meio de cultivo. Além disso, considerando a quantidade de biomassa produzida na condição otimizada (Tabela 9), a produção total de melanina purificada atingiu  $1 \text{ g L}^{-1}$ , o que indica que foi possível otimizar a produção de melanina pelo mutante MEL1 utilizando vinhaça como substrato de baixo custo juntamente com a glicose como fonte de carbono.

**Tabela 9.** Produção de melanina não purificada e purificada pelo mutante MEL1 nas condições antes e após otimização.

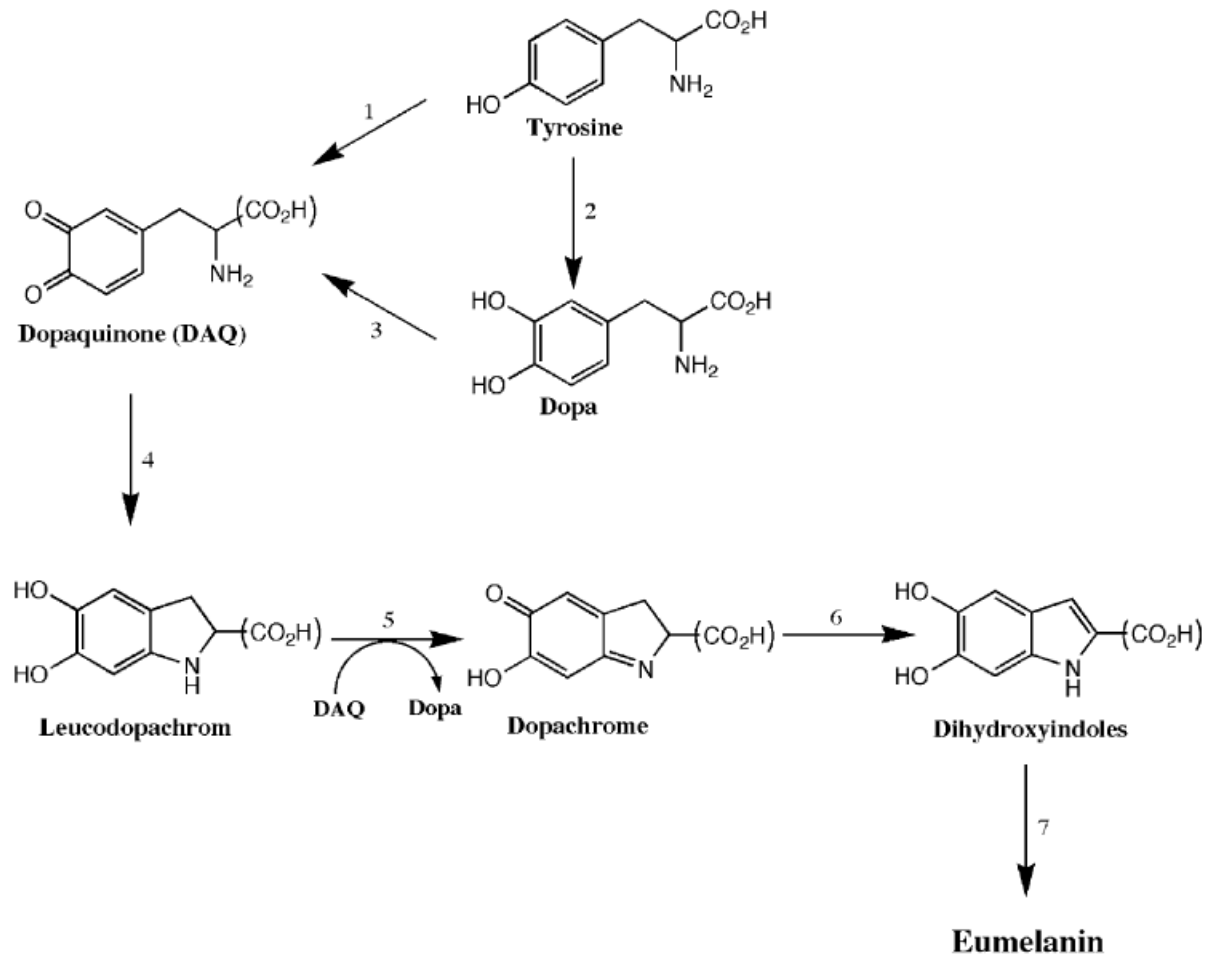
<b>Condições</b>	<b>Biomassa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Melanina não purificada (mg g<sup>-1</sup> de biomassa)</b>	<b>Melanina purificada (mg g<sup>-1</sup> de biomassa)</b>
<b>Antes da otimização</b>	$3,92 \pm 0,06$	$155,15 \pm 19,91$	$100,32 \pm 28,13$
<b>Após Otimização</b>	$4,57 \pm 0,16$	$291,74 \pm 4,59$	$225,39 \pm 4,52$

Com a otimização do meio de cultivo também foi possível reduzir os custos para a produção de melanina. Considerando a composição do meio de cultura antes da otimização, o custo desse meio era de aproximadamente R\$ 8,27 por litro. No entanto, com a otimização do meio de cultura estabelecida nesse trabalho, o custo desse meio foi de aproximadamente R\$ 3,20 por litro. Esses valores indicam que houve uma redução de R\$ 5,07 por litro, valor este equivalente a uma redução de 2,58 vezes (61,3%), no custo do meio de cultivo após a otimização do meio. Com isso, este estudo demonstra que a otimização do meio de cultivo não somente foi capaz de promover um aumento da produção de melanina, com também possibilitou uma redução nos custos do meio de cultivo para a sua produção.

### ***5.2 Avaliação da atividade das enzimas lacase e tirosinase no mutante MEL1***

Considerando os resultados da produção de melanina purificada (Tabela 9), o aumento observado após a otimização do meio de cultivo pode estar relacionado com o aumento na atividade das enzimas envolvidas no processo de biossíntese da melanina. Como pode ser observado na Figura 13, a melanina é formada pela oxidação de fenóis ou indóis por ação das enzimas tirosinases e lacases, sendo que a origem dos precursores da melanina pode ser endógena ou exógena (SINGH et al., 2021).

**Figura 13.** Representação esquemática da biossíntese da DOPA-Melanina em fungos. Reações 1 e 2 são catalisadas por tirosinase e reação 3 pode ser catalisada por tirosinase ou lacase.



Fonte: (LANGFELDER et al., 2003).

Analisando os resultados sobre a atividade lacase (Tabela 10), pode-se observar que houve um pequeno aumento (em torno de 14%) na atividade lacase após a otimização. No entanto, para a análise estatística do teste Tukey ( $p < 0,05$ ) realizado sobre os dados da atividade da lacase, antes e após a otimização, demonstraram que não houve diferenças significativas sobre a atividade da lacase, antes e após a otimização, indicando que a mudança na composição do meio de cultivo não interfere na atividade desta enzima. Esse resultado parece indicar que a lacase não estaria envolvida diretamente na via de síntese de melanina no mutante MEL1. Estudos realizados em *Aspergillus nidulans* identificaram uma enzima lacase, codificada pelo gene *yA*, como responsável pela conversão de um pigmento amarelo na coloração verde dos conídios deste fungo. A expressão desse gene é regulada pelo desenvolvimento do fungo, ocorrendo antes do início da conidiação durante a

fase exponencial de crescimento (CLUTTERBUCK, 1972). Também foi identificado um outro gene (*tilA*) em *A. nidulans*, que codifica uma lacase cuja expressão acontece durante a fase exponencial de crescimento e mantêm-se praticamente inalterada durante todo o crescimento assexual (SCHERER; FISCHER, 2001). Com base nestas informações, a explicação para os resultados obtidos pode estar relacionada a atividade lacase ter sido determinada durante a fase estacionária do crescimento do fungo em cultura submersa, onde há o predomínio do crescimento micelial em forma de “pellets” e não está ocorrendo a produção e pigmentação dos conídios. Assim, a atividade da lacase seria mantida em níveis baixos praticamente constante, independente das condições de cultivo (antes e após a otimização).

**Tabela 10.** Atividade das enzimas tirosinase e lacase após cultivo do mutante MEL1 nas condições antes e após otimização.

<b>Condições</b>	<b>Tirosinase (U/mL)</b>	<b>Lacase (U/mL)</b>
<b>Antes da otimização</b>	5,60 ± 0,46 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>Após Otimização</b>	8,99 ± 1,30 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,16 <sup>a</sup>

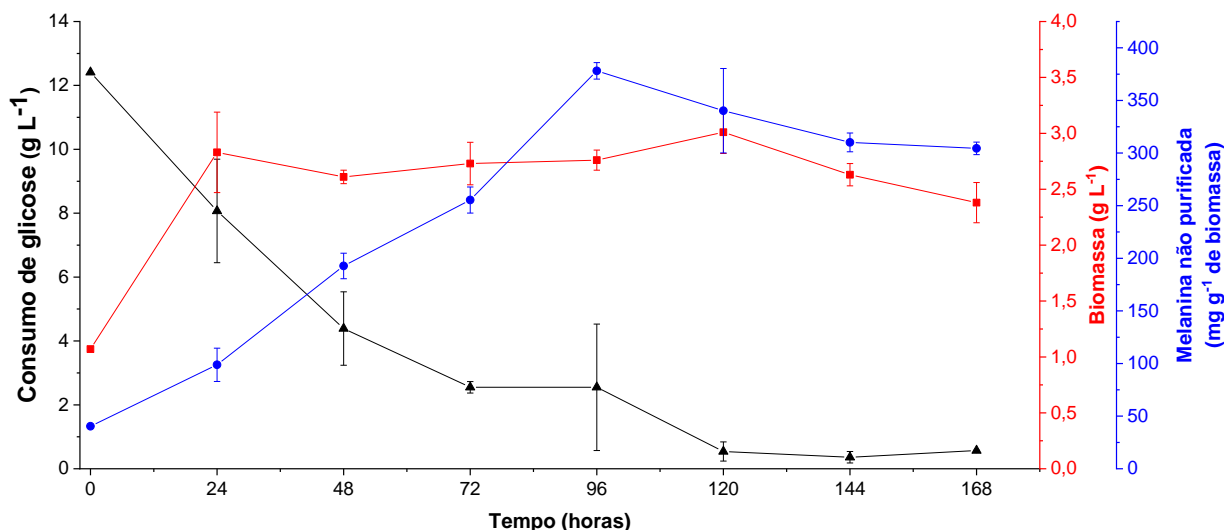
Como mostrado na Tabela 10, é possível notar que houve um aumento da atividade tirosinase, equivalente a 60% após a otimização, quando comparado com a condição antes da otimização. A análise estatística realizada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), mostrou que há diferenças significativas entre os valores da atividade da tirosinase antes e após a otimização, indicando que a mudança na composição do meio de cultivo afetou a atividade desta enzima. De acordo com a literatura, a síntese de determinadas enzimas pode ser estimulada por componentes presentes no meio, os quais agem como substrato ou ativadores de vias metabólicas específicas (ODENIYI; OGUNSANYA; UNUOFIN, 2019). Neste trabalho, a presença de vinhaça no meio de cultivo otimizado pode ter favorecido o aumento da atividade tirosinase, uma vez que esse subproduto apresenta fenóis em sua composição (Tabela 2), os quais podem atuar como substrato para enzimas fenol oxidases, como a tirosinase (RAMSDEN; RILEY, 2014). Além disso, a maior atividade tirosinase exibida pelo

mutante MEL1 na condição otimizada também pode ser explicada pela presença de cobre na vinhaça (Tabela 2), o qual atua como um cofator no sítio catalítico desta enzima, aumentando a sua atividade (RAMSDEN; RILEY, 2014; SINGH et al., 2021). Estudos têm mostrado que a adição de cobre no meio de cultivo promoveu um aumento na síntese de melanina. Galhaup e Haltrich (2001) constataram que o micélio de *Trametes pubescens* apresentou maior melanização na presença de íons cobre, sendo que a concentração de melanina na parede celular aumentou em resposta da concentração de cobre. Estudos realizados por Medeiros (2020) mostraram que a suplementação do meio de cultivo com sulfato de cobre, em baixas concentração ( $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), contribuiu para uma maior melanização do mutante MEL1. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a presença de fenóis e cobre na vinhaça promoveram uma ativação da enzima tirosinase, que participa da via de biossíntese da melanina no mutante MEL1, o que promoveu um aumento na produção deste pigmento.

### **5.3 Estudo dos parâmetros fermentativos de pigmentação em frascos**

Ensaio foram realizados para avaliar o crescimento, a produção de melanina não purificada e o consumo de glicose pelo mutante MEL1 durante a etapa da cultura na condição otimizada (meio de cultivo contendo 0,81% (v/v) de vinhaça, 1,62% (m/v) de glicose) e os resultados estão apresentados na Figura 14.

**Figura 14.** Cinética de crescimento, produção de melanina e consumo de glicose pelo mutante MEL1 durante o cultivo na condição otimizada.



Em relação a produção de melanina não purificada (Figura 14), observa-se que a maior produção ocorreu no período de 96 horas de cultivo, com uma produção de 378,12 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, valor este que representa um aumento de 122,74 mg g<sup>-1</sup> de biomassa, equivalente a 1,48 vezes maior quando comparado ao tempo de 72 horas, onde a produção de melanina não purificada foi de 255,38 mg g<sup>-1</sup> de biomassa. Além disso, observa-se que no período de maior produção de melanina não purificada (96 horas de cultivo), o fungo encontra-se na fase estacionária de crescimento, uma vez que produção de biomassa se manteve praticamente constante. Também é possível observar que durante o período de maior produção de melanina não purificada (96 horas de cultivo) houve o maior consumo da glicose disponível no meio (Figura 14), o que possibilitou o fornecimento de substrato e energia necessários para o metabolismo do fungo. Esses resultados estão em concordância com vários estudos descritos na literatura. Walker e White (2005), demonstraram que durante a fase estacionária de crescimento, os fungos realizam o metabolismo secundário, iniciando vias metabólicas específicas que não são essenciais para o crescimento das células, mas estão envolvidas na sobrevivência do organismo. Estudos realizados por Gmoser et al. (2018) afirmaram que o aumento da produção de pigmento em *Neurospora intermedia* pode estar relacionado ao maior consumo de carbono, pois um esgotamento mais rápido da fonte

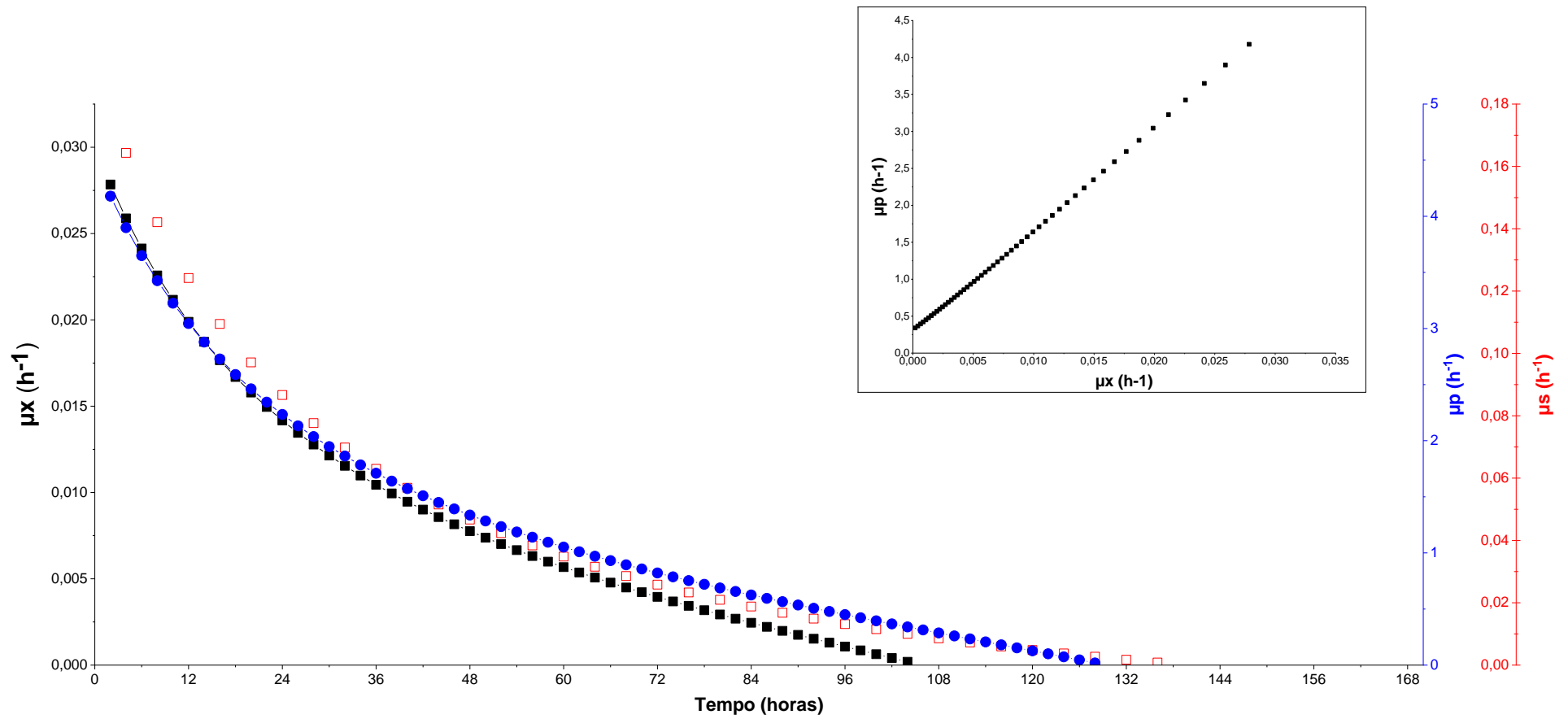
de carbono dá uma resposta de estresse mais precoce às células. Chai et al. (2020), em estudo sobre efeitos da biossíntese de pigmento e citrinina no metabolismo e morfologia de *Monascus purpureus* em fermentação submersa, reportaram que uma maior produção de pigmento e citrinina pela linhagem selvagem de *Monascus purpureus* ocorreu, após o consumo total da glicose, quando o fungo alcançou a fase estacionária de crescimento. Outros estudos, como o apresentado por Tkáčová, Klemková e Čertík (2018), também demonstraram uma maior produção de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* durante a fase estacionária de crescimento do fungo, acoplado ao consumo total de glicose, quando na concentração 20 g L<sup>-1</sup>. Da Silva, Iencza e Moritz (2021), observaram que o aumento na produção de pigmento vermelho por *Monascus ruber* também está relacionada a maior densidade de células obtidas na fase estacionária de crescimento do fungo e ao consumo total de glicose, quando o fungo foi cultivado em meio contendo farinha de arroz e melão.

Em análise da produção de biomassa (Figura 14), é possível observar que o mutante MEL1 apresentou duas fases de desenvolvimento: uma fase exponencial curta (0 a 24 horas de cultivo) e uma fase estacionária (24 a 120 horas de cultivo). A existência de apenas estas duas fases, sem a necessidade de um tempo de adaptação (fase lag), pode ser explicado pelo fato de o cultivo iniciar com um inóculo obtido após 48 h na etapa da pré-cultura, estava na fase exponencial de crescimento. Assim, a velocidade específica de crescimento do mutante MEL1, no período de 0 a 24 h da etapa de cultura, já era máxima, apresentando um valor da velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) igual a 0,0336 h<sup>-1</sup>. Além disso, durante a fase exponencial de crescimento (0 a 24 horas de cultivo), também foi possível determinar a velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e a velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ), as quais apresentaram valores iguais a 0,182 mg g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 6,48 mg g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os valores de  $\mu_x$ ,  $\mu_s$  e  $\mu_p$  foram plotados em função ao tempo de cultivo (Figura 15) para verificar a dependência da produção de melanina não purificada em relação ao crescimento do mutante MEL1. De acordo com os gráficos apresentados na Figura 15, a produção de melanina pode ser classificada com parcialmente associada ao crescimento do mutante MEL1 e a equação (13) correlaciona a velocidade específica de produção de melanina com a velocidade específica de obtenção de biomassa.

$$y = 138,83x + 0,2768 \quad (13)$$

**Figura 15.** Velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ), velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e a velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ) em relação ao tempo de cultivo do mutante MEL1.



Também foram analisados outros parâmetros relativos aos fatores de conversão de substrato para biomassa ( $Y_{x/s}$ ), de substrato para melanina não purificada ( $Y_{p/s}$ ), de biomassa em melanina não purificada ( $Y_{x/p}$ ) e produtividade máxima de melanina não purificada ( $Q_p$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Avaliação dos parâmetros relativos aos fatores de conversão de substrato em biomassa, de substrato em produto e produtividade máxima de melanina não purificada em relação a produção de biomassa e de melanina não purificada com o consumo de glicose durante o cultivo do mutante MEL1 na condição otimizada.

Tempo (horas)	Parâmetros					
	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Melanina não purificada (mg g <sup>-1</sup> de biomassa)	Consumo de glicose (g L <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_p$ (mg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0	1,07	40,36	12,41			
24	2,83 ± 0,36	98,78 ± 15,83	8,07 ± 1,62	0,41	0,05	2,43
48	2,61 ± 0,06	192,73 ± 12,11	4,39 ± 1,15	0,19	0,06	3,17
72	2,73 ± 0,19	255,38 ± 12,43	2,55 ± 0,18	0,17	0,07	2,99
96	2,76 ± 0,09	378,12 ± 7,82	2,55 ± 1,98	0,17	0,10	3,52
120	3,01 ± 0,19	340,28 ± 40,12	0,54 ± 0,30	0,16	0,08	2,50
144	2,63 ± 0,10	310,12 ± 8,93	0,36 ± 0,18	0,13	0,06	1,87
168	2,38 ± 0,18	304,46 ± 5,99	0,57 ± 0,01	0,11	0,06	1,57

Fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ); fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade máxima de melanina não purificada ( $Q_p$ ).

Na Tabela 11 observa-se que valores referentes ao fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) foram iguais para os tempos de cultivo de 72 e 96 horas (0,17 g g<sup>-1</sup>), indicando que não houve um aumento na produção de biomassa e o consumo de glicose foi o mesmo durante esse período. Isso pode ser comprovado pelos dados sobre a produção de biomassa e consumo de glicose, onde os valores apresentam uma pequena diferença de aproximadamente 0,03 g L<sup>-1</sup> para a produção de biomassa e nenhuma diferença nos valores do consumo de glicose.

Analisando o fator de conversão de substrato em melanina não purificada ( $Y_{p/s}$ ) (Tabela 12) pode-se observar que o tempo de cultivo de 96 horas apresentou o maior valor (0,10 g g<sup>-1</sup>), quando comparado aos demais tempos de cultivo (Tabela 11). Esses resultados estão de acordo com os dados apresentados sobre a produção de melanina não purificada e consumo de glicose (Tabela 11), onde a maior quantidade

de melanina não purificada foi produzida em 96 horas de cultivo, chegando a  $378,12 \pm 7,82 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa, quando comparado aos demais tempos de cultivo e o consumo de glicose também foi maior, com um consumo de  $2,55 \text{ g L}^{-1}$ .

Em relação à produtividade máxima de melanina não purificada ( $Q_p$ ) (Tabela 11) nota-se que em 96 horas de cultivo tem-se o maior valor de produtividade ( $3,52 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Esse resultado concorda com os valores apresentados sobre a produção de melanina não purificada, onde a maior produção de melanina não purificada foi encontrada em 96 horas de cultivo chegando a  $378,12 \pm 7,82 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa. Com isso, esses resultados apontam que o tempo de cultivo do mutante MEL1, na condição otimizada, deve ser feito até 96 horas.

Analisando a produção de melanina não purificada e a quantidade de biomassa produzida com a otimização do meio de cultura foi possível obter uma produção total de melanina não purificada de  $1,04 \text{ g L}^{-1}$  após 96 h de cultivo.

#### **5.4 Avaliação do processo de produção de melanina pelo mutante MEL1 em biorreatores de bancada**

Considerando os resultados obtidos no planejamento experimental, com a otimização do meio de cultivo contendo glicose e vinhaça, buscou-se avaliar em escala de bancada a produção de melanina não purificada pelo mutante MEL1 em dois reatores, tanque agitado e coluna de bolhas, nos tempos de 72 e 96 horas de cultivo.

Com os resultados obtidos no reator de tanque agitado (Tabela 12), verifica-se que os maiores valores de produção de biomassa, melanina não purificada e na produção total de melanina não purificada foram obtidos na condição de maior velocidade de agitação, na presença de aeração e por um período mais longo de cultivo, como nos ensaios 4 (condições operacionais: 200rpm e 96 horas de cultivo) e 5 (condições operacionais: 0,53 vvm, 200 rpm e 96 horas de cultivo), quando comparado aos ensaios 1 (condições operacionais: 150rpm e 72 horas de cultivo), 2 (condições operacionais: 150 rpm e 96 horas de cultivo) e 3 (condições operacionais: 200 rpm e 72 horas de cultivo). Esses resultados indicam que as condições operacionais do reator de tanque agitado, como velocidade de agitação, aeração e tempo de cultivo interferiram no crescimento e na produção de melanina pelo mutante MEL1. Segundo Venkatachalam et al. (2023), vários parâmetros operacionais, como velocidade de agitação, tempo de mistura, transferência de calor e massa e também a taxa de cisalhamento, são os principais influenciadores nos processos fermentativos. Estudos realizados por Zhoug, Tian e Zhong (2019) também mostraram que houve um aumento na produção de pigmentos amarelos por *Monascus anka*, quando a velocidade de agitação foi aumentada para 400 rpm no reator de tanque agitado e o tempo de cultivo foi estendido para aproximadamente 90 horas de cultivo.

**Tabela 12.** Avaliação da produção de biomassa, melanina não purificada e produção total de melanina não purificada obtida após o cultivo do mutante MEL1 por 72 e 96 horas em reator de tanque agitado e coluna de bolhas na condição otimizada.

Tipos de biorreatores	Condições operacionais					Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Melanina não purificada (mg g <sup>-1</sup> biomassa)	Produção total de melanina não purificada (g L <sup>-1</sup> )
	Ensaio	Vazão de Ar (L min <sup>-1</sup> )	Vazão volumétrica específica (vvm)*	Agitação (rpm)	Tempo (horas)			
Tanque agitado	1	-	-	150	72	2,76 ± 0,61	110,67 ± 26,63	0,31
	2	-	-	150	96	3,31 ± 0,12	109,33 ± 7,06	0,36
	3	-	-	200	72	3,23 ± 0,13	188,00 ± 10,91	0,61
	4	-	-	200	96	4,09 ± 0,13	226,22 ± 13,68	0,93
	5	0,8	0,53	200	96	4,18 ± 0,15	231,11 ± 21,09	0,97
Coluna de bolhas	1	1,5	1	-	72	4,70 ± 0,03	271,56 ± 9,37	1,28
	2	1,5	1	-	96	4,10 ± 0,34	211,33 ± 23,57	0,51

\*(volume<sub>ar</sub>/volume<sub>meio</sub>/minuto).

Analisando os resultados obtidos no ensaio 5, na condição com vazão de ar de  $0,8 \text{ L min}^{-1}$ , vazão volumétrica específica de  $0,53 \text{ vvm}$ ,  $200\text{rpm}$  e 96 horas de cultivo, nota-se que houve um aumento de 1,02 e de 1,04 vezes, respectivamente para a produção de biomassa e produção total de melanina não purificada, respectivamente, em comparação ao ensaio 4, cuja condição operacional foi  $200\text{rpm}$  e 96 horas de cultivo, mas sem fluxo de ar. Este pequeno aumento sobre os resultados produção de biomassa, melanina não purificada e produção total de melanina não purificada pode estar relacionado a presença do sistema de aeração ao meio de cultivo. Estudos descrevem que a aeração desempenha um papel principal na taxa de crescimento e produção de carotenoides em microrganismos aeróbicos, uma vez que a aeração, associada a agitação do caldo de fermentação, normalmente satisfaz a demanda de oxigênio de um processo de fermentação (BORBA et al., 2018; MANTZOURIDOU; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 2002).

Com o resultado de maior produção de melanina não purificada no ensaio 5 (condições operacionais:  $0,53 \text{ vvm}$ ,  $200\text{rpm}$  e 96 horas de cultivo) (Tabela 12), foram realizados outros ensaios em reator de tanque agitado, mantendo a velocidade de agitação de  $200\text{rpm}$ , mas com vazão volumétrica específica de  $4,66\text{vvm}$  com objetivo de aumentar a produção de melanina não purificada. No entanto, os resultados (dados não apresentados) mostraram que houve uma diminuição na produção de melanina não purificada de  $41,78 \text{ mg g}^{-1}$  biomassa, valor equivalente a 1,22 vezes menor quando comparado ao ensaio 5 (Tabela 12). Além disso, também foi observado no ensaio em reator de tanque agitado, mantendo a velocidade de agitação de  $200\text{rpm}$ , 96 horas de cultivo e com vazão volumétrica específica de  $4,66\text{vvm}$ , que houve o cisalhamento dos pellets, o que pode ter causado a menor produção de melanina não purificada. Segundo Espinosa-Ortiz et al. (2016), aeração e/ou agitação intensas pode danificar a estrutura dos pellets celulares ou causar erosão do pellet. Os autores ainda destacam que presença de pellets íntegros contribui para melhorar a reologia da cultura fúngica, diminuindo a viscosidade do meio e aumentando a transferência de oxigênio e massa para os pellets, o que pode favorecer a produção e obtenção de pigmentos. Com isso, os resultados obtidos indicam que, para obter uma maior produção de melanina não purificada, o cultivo do mutante MEL1 em reator de tanque agitado deve ser feito sob baixa aeração do sistema como aquele usado no ensaio 5 (Tabela 12).

Como mostrado na Tabela 12, a maior produção de melanina não purificada no reator de coluna de bolhas ocorreu no ensaio 1 (condições operacionais: 1vvm e 72 horas de cultivo), sendo que houve um aumento de 1,15 e de 2,51 vezes, respectivamente na produção de biomassa e produção total de melanina não purificada quando comparado ao ensaio 2 (condições operacionais: 1vvm e 96 horas de cultivo). A menor produção de melanina não purificada obtida no ensaio 2 (condições operacionais: 1vvm e 96 horas de cultivo), podem ser explicada uma vez que houve a autólise dos pellets devido ao tempo prolongado de cultivo, como consequência, uma menor quantidade de melanina não purificada permanece na biomassa. Segundo Espinosa-ortiz et al. (2016) um dos principais problemas de reatores que utilizam pellets fúngicos consiste em manter os pellets fúngicos durante as operações do reator a longo prazo. Após um determinado período de tempo, geralmente é observado crescimento disperso no reator, principalmente se não forem aplicadas estratégias de manutenção. Resultados similares foram obtidos por Goksungur et al. (2004), os quais demonstraram que houve uma diminuição na produção de  $\beta$ -caroteno por *Blakeslea trispora* em reator de coluna de bolhas com vazão de ar 2vvm, quando o tempo de cultivo foi estendido para 192 horas, sendo que a maior produção de  $\beta$ -caroteno ocorreu com um menor tempo de cultivo de 144 horas.

Comparando os resultados dos dois biorreatores (Tabela 12), é possível verificar que a maior produção de biomassa, melanina não purificada e produção total de melanina não purificada foi obtida no reator de coluna de bolhas com as condições de 1vvm e 72 horas de cultivo (ensaio 1). Nessa condição, houve um aumento de 0,52 g L<sup>-1</sup>, 40,45 mg g<sup>-1</sup> biomassa e um aumento de 1,32 vezes, respectivamente na produção de biomassa, melanina não purificada e produção total de melanina não purificada, em comparação ao ensaio 5 no reator de tanque agitado (Tabela 12). Esses resultados revelam que o sistema de agitação aplicado durante o cultivo do mutante MEL 1 em reator, interfere na produção de melanina. Esses resultados estão de acordo com os estudos realizados por Goksungur et al. (2004), sobre a produção de  $\beta$ -caroteno por *Blakeslea trispora* em reator de tanque agitado e coluna de bolhas, os quais verificaram que os melhores resultados foram obtidos em reator de coluna de bolhas, com um aumento de 70,5 mg L<sup>-1</sup> de caroteno, quando comparado ao reator de tanque agitado.

Para a melhor compreensão dos resultados apresentados na Tabela 12, foram determinados os seguintes parâmetros fermentativos: fatores de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ), fatores de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade máxima de melanina não purificada ( $Q_p$ ) em relação ao cultivo do mutante MEL1 nos dois tipos de reatores (Tabela 13).

**Tabela 13.** Avaliação dos parâmetros fermentativos produção de biomassa, melanina não purificada, consumo de glicose, fator de conversão de substrato em biomassa, fator de conversão de substrato em melanina não purificada e produtividade máxima de melanina não purificada no cultivo do mutante MEL1 em biorreatores por 72 e 96 horas.

Tipos de biorreatores	Condições operacionais					Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Melanina não purificada (mg g <sup>-1</sup> biomassa)	Consumo de Glicose (%) **	Y <sub>x/s</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> (mg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
	Ensaio	Vazão de Ar (L min <sup>-1</sup> )	Vazão volumétrica específica (vvm)*	Agitação (rpm)	Tempo (horas)						
Tanque agitado	1	-	-	150	72	2,76 ± 0,61	110,67 ± 26,63	50,09	0,29	0,06	0,98
	2	-	-	150	96	3,31 ± 0,12	109,33 ± 7,06	64,09	0,22	0,04	0,72
	3	-	-	200	72	3,23 ± 0,13	188,00 ± 10,91	70,28	0,19	0,06	2,05
	4	-	-	200	96	4,09 ± 0,13	226,22 ± 13,68	86,90	0,22	0,07	1,94
	5	0,8	0,73	200	96	4,18 ± 0,15	231,11 ± 21,09	90,20	0,25	0,08	1,99
Coluna de bolhas	1	1,5	2	-	72	4,70 ± 0,03	271,56 ± 9,37	100,00	0,32	0,12	3,21
	2	1,5	2	-	96	4,10 ± 0,34	211,33 ± 23,57	99,49	0,20	0,06	1,78

\*(volume<sub>ar</sub>/volume<sub>meio</sub>/minuto).

Fator de conversão de substrato em biomassa (Y<sub>x/s</sub>); fator de conversão de substrato em produto (Y<sub>p/s</sub>) e Produtividade máxima de melanina não purificada (Q<sub>p</sub>).

\*\* Cálculo realizado sobre os valores das medias de glicose (g L<sup>-1</sup>).

De acordo com os dados referentes ao cultivo no biorreator de tanque agitado (Tabela 13), nota-se que o ensaio 1 (condições operacionais: 150rpm e 72 horas de cultivo) apresenta os maiores valores de  $Y_{x/s}$  ( $0,29 \text{ g g}^{-1}$ ),  $Y_{p/s}$  ( $0,06 \text{ g g}^{-1}$ ) e  $Q_p$  ( $0,98 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), com um aumento de 31,81%, 50% e 1,36 vezes, respectivamente, quando comparado ao ensaio 2 (condições operacionais: 150 rpm e 96 horas de cultivo). Esses resultados mostram que o cultivo do mutante MEL1 em biorreator de tanque agitado com velocidade de agitação de 150 rpm deve ser realizado com o tempo de 72 horas para que haja o maior aproveitamento do substrato para a obtenção de biomassa e de melanina não purificada, como consequência maior produtividade de melanina não purificada.

Na análise dos ensaios em biorreator de tanque agitado (Tabela 13), nota-se que o ensaio 4 (condições operacionais: 200 rpm e 96 horas de cultivo) apresenta os maiores valores de  $Y_{x/s}$  ( $0,22 \text{ g g}^{-1}$ ) e  $Y_{p/s}$  ( $0,07 \text{ g g}^{-1}$ ), com um aumento de 15,79% e 16,66% respectivamente, quando comparado ao ensaio 3 (condições operacionais: 200 rpm e 72 horas de cultivo). Além disso, observa-se que os valores sobre a produtividade ( $Q_p$ ) para os ensaios 3 e 4, cujo valores foram 2,05 e 1,94  $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivamente, não apresentam diferenças expressivas. Esses resultados sugerem que o uso do biorreator de tanque agitado com velocidade de agitação de 200 rpm pode ser feito tanto com o tempo de cultivo de 72 horas (ensaio 3) como 96 horas (ensaio 4).

Comparando os resultados dos ensaios 4 (condições operacionais: 200 rpm e 96 horas de cultivo) e 5 (condições operacionais: 200 rpm, 96 horas de cultivo e 0,53 vvm) em biorreator de tanque agitado, nota-se que os maiores valores de  $Y_{x/s}$  ( $0,25 \text{ g g}^{-1}$ ),  $Y_{p/s}$  ( $0,08 \text{ g g}^{-1}$ ) e  $Q_p$  ( $1,99 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram obtidos no ensaio 5, representando um aumento de 13,64%, 14,28% e 1,03 vezes, respectivamente, quando comparado ao ensaio 4. Dessa forma, esses resultados apontam que a utilização do sistema de aeração, juntamente com o sistema de agitação (ensaio 5) é capaz de promover o maior aproveitamento do substrato para a obtenção de biomassa e de melanina não purificada, o que resulta em maior produtividade de melanina não purificada.

Analisando o cultivo no biorreator de coluna de bolhas (Tabela 13) nota-se que os maiores valores de  $Y_{x/s}$  ( $0,32 \text{ g g}^{-1}$ ),  $Y_{p/s}$  ( $0,12 \text{ g g}^{-1}$ ) e  $Q_p$  ( $3,21 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram obtidos no ensaio 1 (condições operacionais: 1 vmm e 72 horas de cultivo), o que indica um aumento de 60%, 100% e 1,80 vezes, respectivamente, quando comparado ao ensaio 2 (condições operacionais: 1 vvm e 96 horas de cultivo). Os menores valores observados no ensaio 2 para  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Q_p$  (Tabela 14), podem ser explicados, uma vez que foi observado a ocorrência do processo de autólise da biomassa do fungo, o que resultou em uma diminuição na produção de biomassa, melanina não purificada e nas produtividades da melanina não purificada. Com isso, esses resultados mostram que o tempo de cultivo do mutante MEL1 em biorreator de coluna de bolhas deve ser feito em 72 horas para que haja uma maior produção de melanina.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 13, no biorreator de coluna de bolhas, nota-se que no ensaio 1 (condições operacionais: 1 vmm e 72 horas de cultivo) obteve-se os maiores valores de  $Y_{x/s}$  ( $0,32 \text{ g g}^{-1}$ ),  $Y_{p/s}$  ( $0,12 \text{ g g}^{-1}$ ) e  $Q_p$  ( $3,21 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), com um aumento de 28%, 50% e 1,61 vezes, respectivamente, quando comparado ao ensaio 5 (condições operacionais: 200 rpm, 96 horas de cultivo e 0,53 vvm) no biorreator de tanque agitado. Esses resultados mostram que o cultivo no biorreator de coluna de bolhas resultou em uma maior produção de biomassa e melanina. Resultados semelhantes foram apresentados por Goksungur et al. (2004), os quais reportaram que o biorreator de coluna de bolhas foi melhor para a produção de  $\beta$ -caroteno por *Blakeslea trispora* quando comparado do biorreator de tanque agitado.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos nos biorreatores, o cultivo do mutante MEL1 no biorreator de coluna de bolhas com o meio de cultivo otimizado, contendo vinhaça (0,81%, v/v) e glicose 1,62% (m/v) por 72 horas, é o mais indicado para promover uma maior produção de melanina, uma vez que a quantidade de melanina purificada foi de  $247,83 \pm 29,77 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa (dados não apresentados), atingindo uma produção total de melanina de  $1,2 \text{ g L}^{-1}$ . Este valor equivale a um aumento de 20% em relação a produção total de melanina na condição otimizada em frasco ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ).

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados no presente trabalho, conclui-se que:

- A quantidade de melanina não purificada produzido pelo mutante MEL1 variou em função da presença dos subprodutos melaço, vinhaça e água de maceração de milho, juntamente com glicose e nitrato, no meio de cultivo.
- A presença de AMM e nitrato de sódio não favorece a produção de melanina pelo mutante MEL.
- A presença de melaço promoveu um maior crescimento do mutante MEL1, mas com uma menor produção de melanina não purificada.
- A presença de vinhaça, em baixa concentração no meio de cultivo, favoreceu a produção do pigmento melanina, provavelmente devido a presença de íons cobre que ativaram a enzima tirosinase, responsável pela via de biossíntese da melanina no mutante MEL1.
- A presença de glicose, em elevadas concentrações favoreceu a produção de melanina pelo mutante MEL1, pois forneceu carbono não só para as necessidades energéticas das atividades celulares como também para biossíntese do pigmento.
- A composição ótima do meio de cultura foi estabelecida com 0,81% (v/v) de vinhaça e 1,62% (m/v) de glicose, uma vez que promoveu uma maior produção de melanina, chegando a uma produção total de melanina igual  $1\text{ g L}^{-1}$  quando o mutante MEL1 foi cultivado em frasco.
- O cultivo do mutante MEL1 na condição otimizada em biorreatores mostrou que a maior produtividade de melanina não purificada ( $Q_p = 3,21\text{ mg g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) ocorreu no biorreator de coluna de bolhas, após 72 horas de cultivo, quando comparado aos resultados obtidos em 96h no mesmo biorreator e também nas diferentes condições testadas no biorreator de tanque agitado.
- A produção total de melanina pelo mutante MEL1 no biorreator de coluna de bolhas (aeração de 1 vvm por 72h) foi de  $1,2\text{ g L}^{-1}$ , correspondendo a um aumento de 20% em relação ao valor obtido após o cultivo em frasco ( $1\text{ g L}^{-1}$ ).

- Com esse estudo foi possível estabelecer uma composição do meio de cultivo de baixo custo, contendo os nutrientes (vinhaça e glicose) necessários para promover uma elevada produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Realizar estudos em biorreator de coluna de bolhas para avaliar vários parâmetros, como diferentes taxas de aeração, maior volume de trabalho, dentre outros, visando estabelecer as condições ótimas para escalonar a produção de melanina pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*.

## 8. REFERENCIAS

- AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1631–1643, 2016.
- AMARAL, Priscilla FF; RIBEIRO, Bernardo D. Assays of phenoloxidase activity. **Methods to Determine Enzymatic Activity, Bentham eBooks**, p. 195-207, 2013.
- ANJOS, M. N. V. Produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo sob a influencia de luz azul. 2013.
- ARIMI, Milton M. et al. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 34-43, 2014.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS microbiol rev.** v. 30, n. 2, p 215-242, 2006.
- BASTO, B. et al. Production of Natural Pigments by *Penicillium brevicompactum* Using Agro-Industrial Byproducts. **Fermentation**, v. 8, n. 10, p. 1–16, 2022.
- BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 411–451, 1986.
- BORBA, C. M. et al. Carotenoid production by *Sporidiobolus pararoseus* in agroindustrial medium: Optimization of culture conditions in shake flasks and scale-up in a stirred tank fermenter. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 509–519, 2018.
- BRIDGE P.D., KOKUBUN T., SIMMONDS M.S.J. Protein Extraction From Fungi. *In*: CUTLER P. (ed.) **Protein Purification Protocols**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2004. Chap. 5, p. 37-46. (Methods in molecular biology, v. 244).
- BÜHLER, R. M. M. et al. *Monascus* pigment production in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. **Food Science and Technology**, v. 33, n. SUPPL.1, p. 9–13, 2013.
- BULL, A. T. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. **Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 75-94, 1970.
- BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: A review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 1115–1136, 1998.
- CARTER, B. L. et al. Relationship between energy substrate utilization and specific growth rate in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v. 108, n. 1, p. 309–313, 1971.
- CHAI, X. et al. Effects of pigment and citrinin biosynthesis on the metabolism and morphology of *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 927–937, 2020.

CHANG, P. K.; CARY, J. W.; LEBAR, M. D. Biosynthesis of conidial and sclerotial pigments in *Aspergillus* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 6, p. 2277–2286, 2020.

CHENG, Y. T.; YANG, C. F. **Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016.

CHRISTOFOLETTI, Cintya Aparecida et al. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.

CLUTTERBUCK, A. J. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of general microbiology**, v. 70, n. 3, p. 423–435, 1972.

CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 2, p. 99–112, 2017.

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.

DA COSTA SOUZA, P. N. et al. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 162, n. 1, p. 12–22, 2016.

DA SILVA, V. L.; IENCZAK, J. L.; MORITZ, D. Agro-industrial residues for the production of red biopigment by *Monascus ruber*: rice flour and sugarcane molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 587–596, 2021.

DEL GOBBO, L. M.; COLIN, V. L. Fungal Technology Applied to Distillery Effluent Treatment. **Nanotechnology in the Life Sciences**, p. 185–197, 2018.

DORLA, E. et al. Valorisation of Vinasse, a Rum Distillery Effluent, By the Production of Carotenoid Pigments Using Filamentous Fungi. **7th International Congress of Pigments in Food—New technologies towards health, through colors**, n. June 2014, p. 240–244, 2013.

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.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, 2012.

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, n. 10, p. 1379-1386, 1974.

EL-NAGGAR, N. E. A.; SABER, W. I. A. Natural Melanin: Current Trends, and Future Approaches, with Especial Reference to Microbial Source. **Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1–28, 2022.

EOM, T.; WOO, K.; SHIM, B. S. Melanin: A naturally existing multifunctional material. **Applied Chemistry for Engineering**, v. 27, n. 2, p. 115–122, 2016.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

ESPINOSA-ORTIZ, E. J. et al. Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. **CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL**, v. 283, p. 553–571, 2016.

FREITAS, L. C. et al. From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? **Resources, Conservation and Recycling**, v. 169, n. February, 2021.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1–2, p. 225–232, 2001.

GMOSER, R. et al. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–25, 2017.

GMOSER, R. et al. Pigment production by the edible filamentous fungus *Neurospora intermedia*. **Fermentation**, v. 4, n. 1, 2018.

GOKSUNGUR, Y. et al. Production of  $\beta$ -Carotene from Beet Molasses by *Blakeslea trispora* in Stirred-Tank and Bubble Column Reactors: Development of a Mathematical Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 112, n. 1, p. 37–54, 2004.

GÓMEZ, Beatriz L.; NOSANCHUK, Joshua D. Melanin and fungi. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 91-96, 2003

GONÇALVES, R. 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.

GONÇALVES, R. D. et al. Inhibition of nitric oxide and tumour necrosis factor- $\alpha$  production in peritoneal macrophages by *Aspergillus nidulans* melanin. **Biological & pharmaceutical bulletin**, n. 27, 2013.

GONCALVES, R. DE C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant Activity of the Melanin Pigment Extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1129–1131, 2005.

GONCALVES, R. et al. Effect of biotransformation by liver S9 enzymes on the mutagenicity and cytotoxicity of melanin extracted from *Aspergillus nidulans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1014–1021, 2015.

GRIFFIN, D. H.; GIMENO, C. J. Fungal Physiology (2nd edn). **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 179, 1995.

GUO, J. et al. High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 357, n. 1, p. 85–91, 2014.

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.

HOARAU, J. et al. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 24, n. May, p. 11–25, 2018.

- HUANG, Tao et al. Metabolism and secretion of yellow pigment under high glucose stress with *Monascus ruber*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- JIANG, H. et al. Melanin production by a yeast strain XJ5-1 of *Aureobasidium melanogenum* isolated from the Taklimakan desert and its role in the yeast survival in stress environments. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 567–577, 2016.
- JIAO, Yan et al. Development and Utilization of Corn Processing by-Products: A Review. **Foods**, v. 11, n. 22, p. 3709, 2022.
- KAHRAMAN, S.; YEILADA, O. Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 2, p. 133–136, 2001.
- KALRA, R.; CONLAN, X. A.; GOEL, M. Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. May, p. 1–23, 2020.
- KIM, B. K. et al. Effect of phenol on  $\beta$ -carotene content in total carotenoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 3, p. 689-692, 2004.
- KUMAR, A. et al. Microbial Pigments: Production and Their Applications in Various Industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 203–212, 2015.
- LAGASHETTI, A. C. et al. Fungal pigments and their prospects in different industries. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 1–36, 2019.
- LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143–158, 2003.
- LOPES, F. C.; LIGABUE-BRAUN, R. Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, n. March, 2021.
- LYU, X. et al. Biotechnological advances for improving natural pigment production: a state-of-the-art review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, 2022.
- MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on  $\beta$ -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: Mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 2, p. 123–135, 2002.
- MARTINELLI, S. D. *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. In: MARTINELLI, S. D.; KINGHORN, J. R. (Ed). ***Aspergillus nidulans*: 50 years on**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p. 33-58. (Progress in industrial microbiology, v.29).
- MEDEIROS, W. B. DE. Estudo do efeito de indutores na melanização do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*. p. 70, 2020.
- MERUVU, H.; DOS SANTOS, J. C. Colors of life: a review on fungal pigments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1153–1177, 2021.
- MONOD, Jacques. The growth of bacterial cultures. **Annual review of microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

MORAIS, D. V. Produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. 2018.

MUKHERJEE, G.; MISHRA, T.; DESHMUKH, S. K. Fungal Pigments: An Overview. p. 525–541, 2017.

NANOU, K.; ROUKAS, T.; PAPADAKIS, E. Improved production of carotenes from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in a bubble column reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 203–207, 2012.

NIGAM, P. S.; LUKE, J. S. Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93–100, 2016.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: What do we know about structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–7, 2015.

ODENIYI, O. A.; OGUNSANYA, A.; UNUOFIN, J. O. Optimization and characterization of tyrosinases from multi-enzyme producing *Fusarium solani* and *Fumago* sp. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 63, n. 4, p. 582–590, 2019.

OLBRICH, H. The molasses. **Biotechnologie-Kempe GmbH**, v. 128, 1963.

PALACIO-CASTAÑEDA, V. et al. Antibacterial pigment production by *Serratia marcescens* using different casein types obtained from milk. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 21, n. 1, p. 82–90, 2019.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: A review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 70–76, 2015.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PRALEA, I. E. et al. From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

PINHEIRO, V. E. et al. *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 3, p. 507–514, 2020.

POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. et al. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications. **Melanin**, p. 47–75, 2017.

PRETTI, Taís Simone. Otimização das condições de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais. 2009.

RAMESH, C. et al. Natural Substrates and Culture Conditions to Produce Pigments from Potential Microbes in Submerged Fermentation. **Fermentation**, v. 8, n. 9, p. 1–23, 2022.

RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388–2395, 2014.

RANI, M. H. S. et al. Production and Characterization of Melanin Pigment from Halophilic Black Yeast *Hortaea werneckii*. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 2, n. 8, p. 9–17, 2013.

RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.

RISSONI TOLEDO, A. G. et al. Innovative method for encapsulating highly pigmented biomass from *Aspergillus nidulans* mutant for copper ions removal and recovery. **PLoS one**, v. 16, n. 11, p. e0259315, 2021.

ROWLEY, B. I.; PIRT, S. J. Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures. **Journal of general microbiology**, v. 72, n. 3, p. 553–563, 1972.

RUIZ, B. et al. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146–167, 2010.

SAGLAM, N. et al. Bioremediation applications with fungi. **Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 2**, p. 1-37, 2018.

SAJID, S.; AKBAR, N. Applications of fungal pigments in biotechnology. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 922–930, 2018.

SANCHEZ, S. et al. **Microbial production of carotenoids**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2013.

SANTOS, M. S. V. et al. Prospecção tecnológica em bases de patentes com foco em corantes e pigmentos alimentícios obtidos de fontes naturais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e53810313603-e53810313603, 2021.

SANTOS, P. S. et al. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118005, 2019.

SAVA, V. M. et al. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immune-stimulating activity. **Food Research International**, v. 34, p. 337-343, 2001.

SCHERER, M.; FISCHER, R. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, n. 2, p. 207–213, 2001.

SHARMA, R.; GHOSHAL, G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00407, 2020.

SINDHU, R. et al. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products e An overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203–215, 2016.

SINGH, S. et al. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 53, n. May, p. 107773, 2021.

SOLANO, F. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1-28, 2014.

SOUSA, G. S. **Otimização da produção de melanina pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* usando planejamento fatorial**. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

SPIER, Michele Rigon et al. Application of different types of bioreactors in bioprocesses. **Bioreactors: design, properties and applications**, p. 53-87, 2011.

SUN, S. et al. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. **Food Chemistry**, v. 190, p. 801–807, 2016.

SZKLARZ, G.; et al. Production of phenoloxidases and peroxidases by woot-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

THAIRA, H. et al. Melanin nano-pigments for heavy metal remediation from water. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 54, n. 2, p. 265–274, 2019.

TKÁČOVÁ, J.; KLEMPOVÁ, T.; ČERTÍK, M. Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in  $\beta$ -carotene producing *rhodotorula glutinis*. **Chemical Papers**, v. 72, n. 5, p. 1193–1203, 2018.

TOLEDO, A. V. et al. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 99, p. 2–6, 2017.

TRAN-LY, A. N. et al. Microbial production of melanin and its various applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1–9, 2020.

TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 1–15, 2014.

TULI, H. S. et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.

VALDUGA, E. et al. Pré-tratamentos de melação de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Quimica Nova**, v. 30, n. 8, p. 1860–1866, 2007.

VENIL, C. K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. **Electronic Journal of Biology**, v. 5, n. 3, p. 49-61, 2009.

VENKATACHALAM, M. et al. Scale-Up of Pigment Production by the Marine-Derived Filamentous Fungus, *Talaromyces albobiverticillius* 30548, from Shake Flask to Stirred Bioreactor. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 77, 2023.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. **Fungi: Biology and Applications**, p. 1–34, 2005.

WANG, L. et al. Biotechnology advances in  $\beta$ -carotene production by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, n. February, p. 322–332, 2021.

ZHONG, J. J. Recent advances in bioreactor engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 4, p. 1035–1041, 2010.

ZHOU, B.; TIAN, Y.; ZHONG, H. Application of a two-stage agitation speed control strategy to enhance yellow pigments production by *Monascus Anka Mutant*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1260–1264, 2019.

ZHOU, K. et al. Corn steep liquor: green biological resources for bioindustry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 7, p. 3280-3295, 2022.