



ISSN: 1984-3151

APROVEITAMENTO DA ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR *ASPERGILLUS NIGER* (UCP/WFCC 1261)

USE OF CORN STEEP LIQUOR FOR BIOACTIVES COMPOUNDS PRODUCTION BY *ASPERGILLUS NIGER* (UCP/WFCC 1261)

Raphael de Araújo Luz Nascimento¹; Maria Helena Menezes Estevam Alves²; José Henrique Edmilson Souza Freitas³; Layla Carvalho Manhke⁴; Marcos Antônio Cavalcanti Luna⁵; Keissy Vanderley de Santana⁶; Aline Elesbão do Nascimento⁷; Carlos Alberto Alves da Silva⁸

- 1 Mestrando em Desenvolvimento de Processos Ambientais. UNICAP. Recife, PE. rapha.aln@gmail.com.
- 2 Doutoranda em Biologia Aplicada à Saúde. UFPE. Recife, PE. maria@helena.bio.br.
- 3 Mestrando em Bioquímica e Fisiologia. UFPE. Recife, PE. henrikky17@gmail.com.
- 4 Mestranda em Ciências Biológicas. UFPE. Recife, PE. laylamahnke@hotmail.com.
- 5 Doutorando em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO. UFRPE. Recife, PE. macluna@bol.com.br.
- 6 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais. UNICAP. Recife, PE. vkeissy@gmail.com.
- 7 Doutora em Microbiologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), UNICAP. Recife, PE. elesbao@unicap.br.
- 8 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), UNICAP. Recife, PE. calves@unicap.br.

Recebido em: 28/01/2015 - Aprovado em: 22/05/2015 - Disponibilizado em: 30/05/2015

RESUMO: O objetivo da presente proposta foi avaliar a produção de glicosamina, ácido cítrico, enzimas ligninolíticas, protease e polifosfato por um isolado de *Aspergillus niger* obtido do solo da caatinga, em resposta à presença da água de maceração do milho, "corn steep liquor", um subproduto da cadeia produtiva do milho, que atua como fonte de nitrogênio para crescimento microbiano. Os efeitos da presença do metanol no meio de cultura foram também avaliados. O fungo foi cultivado em meio glicose-peptona, como controle, e em meio contendo água de maceração em substituição à peptona, a 150 rpm, a 30 °C durante 168 horas. Amostras foram coletadas a intervalos de 24 horas. O sobrenadante da cultura foi separado por centrifugação a 10.000 x g a 4 °C. A biomassa foi utilizada para determinação da biomassa por peso seco, glucosamina, polifosfato e estudo morfológico sob a microscopia de luz. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de ácido cítrico, celulase, celobiase (β -glicosidase), exoglucanase, xilanase e protease. Os ensaios foram realizados em cinco réplicas, e os resultados apresentados como média dos dados obtidos. Os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$) determinadas pelo teste de Tukey, com

auxílio do software STATISTIC 7.0. Os resultados obtidos revelaram os efeitos significativos do subproduto sobre a produção dos bioativos avaliados. Um conteúdo de glicosamina de $4,68 \text{ g g}^{-1}$ de biomassa seca foi obtido para o crescimento em CSL mais metanol, comparado a $2,36 \text{ g g}^{-1}$ para as culturas controle crescidas em glicose e peptona mais metanol. Um rendimento de ácido cítrico de $2,32 \text{ g L}^{-1}$ foi determinado para células cultivadas na presença de CSL/metanol, comparado a $1,54 \text{ g L}^{-1}$ para células cultivadas em meio contendo glicose, peptona e metanol. A presença do metanol 1,5 % no meio de cultura aumentou o conteúdo dos compostos de forma significativa. Atividades correspondentes a $0,996 \text{ U mL}^{-1}$, $0,488 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,52 \text{ U mL}^{-1}$ foram determinadas para celulase, celobiase e exoglucanase, respectivamente, para as células cultivadas em meio CSL, comparado a $0,758 \text{ U mL}^{-1}$, $0,342 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,40 \text{ U mL}^{-1}$ para as células crescidas em glicose peptona. Para a xilanase, atividades de $45,27 \text{ U mL}^{-1}$ e $39,99 \text{ U mL}^{-1}$ foram determinadas para CSL e glicose peptona, respectivamente. Os dados revelaram que o crescimento celular em metanol resultou na redução da atividade das enzimas ligninolíticas. Atividades de $3,86 \text{ U mL}^{-1}$ e $2,53 \text{ U mL}^{-1}$ foram obtidas para as proteases nos cultivos em CSL e glicose e peptona mais metanol, respectivamente. Foi observado um aumento no conteúdo do polifosfato durante 96 horas de cultivo. Após esse período, o conteúdo do polímero diminuiu, indicando sua degradação nas condições testadas. Esse estudo também revelou que as células cultivadas na presença de CSL e metanol apresentaram alterações morfológicas. O isolado mostra-se útil para estudos contínuos na busca pela otimização da produção dos compostos bioativos avaliados. Os resultados podem ser valiosos para subsidiar o entendimento do comportamento celular frente a modificações e conseqüentemente no desenvolvimento de processos de produção mais eficientes e na redução de custos.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger*. Água de maceração do milho. Compostos bioativos.

ABSTRACT: The objective of present proposal was to evaluate the glucosamine, citric acid, ligninolytic enzymes, proteases and polyphosphate of an *Aspergillus niger* isolate from caatinga soil in response to the growth in presence of corn steep liquor (CSL), a residue of corn production chain, that act as nitrogen source for microbial growth. The effects of methanol presence in culture medium were also evaluated. The fungus was cultivated in glucose-peptone medium, as control, and in medium containing corn steep liquor in substitution the peptone, at 150 rpm, 30 °C, during 168 hours. Samples had been collected at intervals 24-hour. The culture supernatant was separated by centrifugation at $10,000 \times g$ 4 °C. The biomass was used for determination of the dry biomass, glucosamine, polyphosphate, and morphologic study under the light microscopy. The supernatant was used for citric acid determination, cellulase, cellobiase, exoglucanase, xylanase and protease. The assays had been carried through in five replicates, and the presented results represent its media. The results had been evaluated using the variance analysis and the significant differences between the averages ($p \leq 0,05$) were determined by the test of Tukey, with software STATISTIC 7.0. The results obtained revealed a significant effect of the residue on the production of the bioactives evaluated in this study. A glucosamine content of 4.68 g g^{-1} of cell dry weight was obtained for grown on CSL plus methanol compared to 2.36 g g^{-1} for controls cultures grown in glucose and peptone plus methanol. Citric acid yields of 2.32 g L^{-1} were determined for cells grown in CSL plus methanol compared to 1.54 g L^{-1} for cells grown in glucose peptone methanol medium. The presence of methanol in culture medium improved the compounds contents. Activities of 0.996 U mL^{-1} , 0.488 U mL^{-1} and 0.52 U mL^{-1} were determined for cellulase, cellobiase and exoglucanase, respectively, for cells grown in CSL medium compared to 0.758 U mL^{-1} , 0.342 U mL^{-1} and 0.40 U mL^{-1} for cells grown in glucose peptone. For xylanase, activities of 45.27 U mL^{-1} and 39.99 U mL^{-1} were determined for CSL and glucose peptone respectively. The data revealed that cell growth in methanol resulted in a reduction of ligninolytic enzymes activities. Proteases activities of 3.86 U mL^{-1} and 2.53 U mL^{-1} were obtained for cultures in CSL and glucose peptone plus methanol, respectively. It was observed an enhancement of polyphosphate content at 96 hours of growth. After that period the polymer content was reduced, indicating its degradation in the conditions tested. This study also revealed that cells grown in CSL and methanol presented morphological alterations. The isolate proved to be valuable for continuous studies in search of the optimization production of bioactive compounds. These results could be useful to subsidies the understanding of the cellular behavior front to such modifications and consequently in the development of more efficient processes of production and cost reduction.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*. Corn steep liquor. Bioactive compounds.

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do milho exhibe grande relevância para o desenvolvimento econômico e agroindústria brasileira. Dentre os subprodutos da cadeia produtiva do grão, a água de maceração do milho, milhocina, ou “corn steep liquor” (CSL), representa uma fonte alternativa para obtenção de produtos, como antibióticos (MOYER; COGHILL, 1946), ração animal (MENEGETTI; DOMINGUEZ, 2008), alcoóis (OKUDA *et al.*, 2008), biomassa (MACHADO *et al.*, 2009), enzimas (MANERA, *et al.*, 2011), iscas para insetos (ERNANDES; BIANCHI; MORAES, 2013), biossurfactantes (ANTUNES *et al.*, 2013) e quitina/quitosana (BERGER *et al.*, 2014).

O reaproveitamento de subprodutos oriundos das cadeias produtivas representa uma forma de sustentabilidade, permitindo um equilíbrio entre produção e qualidade ambiental, além de sua conversão em produtos de valor agregado (EZEJIOFOR *et al.*, 2014). Os micro-organismos são as ferramentas de maior aplicação para o desenvolvimento biotecnológico, revelando uma nova economia, resultando na obtenção de bens de consumo com valor agregado (TSIAMIS *et al.*, 2014).

A caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, reconhecido como Reserva da Biosfera. O potencial da biodiversidade de sistemas ambientais naturais é uma perspectiva sustentável para o desenvolvimento de alternativas de uso e aproveitamento (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012).

A Glucosamina (GlcN, 2-amino-2-deoxy -D-glicose) é um monossacarídeo encontrado em todos os organismos (ZAMANI *et al.*, 2008). O polímero, sob a forma de hidrócloro, tem sido utilizado em processos inflamatórios e na analgesia de patologias articulares (IGARASHI; SAKAMOTO; NAGAOKA, 2011). Adicionalmente, é utilizado como suplemento alimentar, sendo permitida a sua inclusão em diversos

produtos alimentares (CHANG; SITANGGANG; WU, 2011). Atualmente, a GlcN é obtida a partir da hidrólise ácida da quitina de conchas e carapaças de caranguejos e camarões (HAYES *et al.*, 2008). Com a potencialidade dos bioprocessos, a obtenção da glicosamina tem sido avaliada a partir de fontes microbianas, uma vez que a matéria-prima é mais estável, apresentando menor poluição ambiental e ausência de fatores alergênicos (CHMIELOWSKI; WU; WANG, 2007).

O aumento do teor de glicosamina em micro-organismos tem sido associado à produção de ácidos orgânicos, enzimas, alcoóis e outros metabólitos secundários em resposta às condições de cultivo. Dentre os micro-organismos, fungos das classes Ascomycetes e Zygomycetes apresentam altos teores de quitina em suas paredes, representando uma fonte promissora para a obtenção do monossacarídeo em larga escala (LIU *et al.*, 2013).

O ascomiceto *Aspergillus niger* é um dos fungos filamentosos mais utilizados em processos fermentativos, uma vez que é considerado “geralmente seguro” (GRAS – “generally regarded as safe”) pelo FDA (“United States Food and Drug Administration”) (SCHUSTER *et al.*, 2002). Muitas das enzimas produzidas por este organismo têm aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, bebidas, têxtil, agricultura, polpa e papel (ADRIO; DEMAIN, 2014). O fungo é também usado na manufatura de etanol (GE; ZHANG, 2005), ácidos orgânicos (GOSH, 2013) e proteínas heterólogas (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Assim, considerando a relevância dos estudos acerca do reaproveitamento de subprodutos de cadeias produtivas, do papel das comunidades microbianas nativas para a descoberta de novas fontes para a produção de biomoléculas de interesse industrial e da sua importância para a caracterização da biodiversidade, o presente trabalho tem como objetivo

avaliar as respostas de um isolado de *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1260, obtido do solo da caatinga pernambucana, frente ao cultivo na presença da água de maceração de milho em relação à produção de glicosamina, ácido cítrico, enzimas do complexo ligninocelulolítico: celulase, celobiase (β -glicosidase), exoglucanase, e xilanase, protease e polifosfatos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O micro-organismo *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1260, isolado do solo da Caatinga, mantido no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, foi mantido em Batata Dextrose Agar (BDA) a 5 °C. Para a produção do pré-inóculo o isolado *Aspergillus niger* foi replicado em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubado a 28° C por 5 dias, após o que esporos foram coletados e utilizados para preparo da solução esporíca. Como controle experimental para produção dos bioativos, foi utilizado o meio de cultura GP - glicose-peptona, que consiste (g L^{-1}) em: glicose 25, peptona 20, KH_2PO_4 0,5, MgSO_4 0,5 e CaCl_2 0,1 (CHANG; SITANGGANG; WU, 2011). A peptona foi substituída pela água de maceração do milho no meio GP, originando o meio MG. O efeito da adição do metanol 1,5 % v/v foi avaliado, onde o álcool foi adicionado aos meios com glicose e peptona e água de maceração, meios denominados GPM e MGM, respectivamente. Frascos de Erlenmeyers com capacidade para 500 mL, contendo 150 mL de meio acrescidos do pré-inóculo, $10^7 - 10^8$ esporos/mL, foram incubados sob agitação orbital, 150 rpm, a 30 °C durante 168 horas. Amostras foram coletadas a intervalos de 24 horas. O sobrenadante da cultura foi separado por centrifugação a 10.000 x g a 4 °C. A biomassa foi utilizada para determinação da biomassa por peso seco, glucosamina, polifosfato e estudo

morfológico. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de ácido cítrico, enzimas do complexo ligninocelulolítico: celulase; celobiase (β -glicosidase); exoglucanase; e xilanase e da protease. Os ensaios foram realizados em cinco réplicas, e os resultados estão apresentados como média dos dados obtidos.

2.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

Amostras foram coletadas nos intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas e submetidas à centrifugação a 4500 x g durante 15 minutos, a 4 °C. O micélio coletado foi lavado duas vezes com água destilada deionizada gelada e submetido ao processo de liofilização, sendo posteriormente mantido em dessecador a vácuo até peso constante. Os resultados são apresentados como grama de biomassa por litro de meio de cultura.

2.3 DETERMINAÇÃO DA GLUCOSAMINA

Em 1 g de micélio, foram adicionados 5 mL de HCl 6 M, e a mistura foi autoclavada a 121 °C por 8 minutos. Após o resfriamento e filtração, 1 mL da amostra foi submetido à extração com a adição de uma gota de solução alcoólica de fenoltaleína 0,5 % m/v, neutralizada com solução de NaOH 3 N e titulada com KHSO_4 1 % m/v. Após a etapa de extração, 1 mL da solução foi transferido para tubo de ensaio, ao qual foi acrescentado 1 mL de solução acetil-acetona em Na_2CO_3 0,5 N, colocando-se a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após o esfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e 1 mL do reagente de Erlich (2,67 g DAB – *p*-dimetilaminobenzaldeído - dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL ácido clorídrico), e as amostras foram incubadas durante 10 minutos a 65 °C em estufa com circulação de ar. Para determinação da glucosamina, foram avaliadas as unidades de absorvância em

espectrofotômetro a 530 nm com curva padrão de glucosamina (0,01 a 0,5 g L⁻¹) em água (AIDOO; HENDRY; WOOD, 1981).

2.4 DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO CÍTRICO

A determinação de ácido cítrico foi realizada seguindo-se o método de Saffran e Denstedt (1948). Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram colocadas em tubos e acrescidas de 8 mL de anidrido acético, os quais foram colocados em banho-maria a 60 °C por 10 minutos. Após esse período, foi acrescentado 1 mL de piridina em cada tubo. Os tubos foram novamente para o banho-maria na mesma temperatura durante 40 minutos, após o que os tubos foram resfriados em banho de gelo por 5 minutos e submetidas à espectrofotometria a 420 nm. A curva padrão foi construída utilizando-se 1 mL de solução de ácido cítrico (4 g de ácido cítrico em 100 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 15 %), com concentração variando de 0,04 – 0,4 mg mL⁻¹.

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

A atividade da celulase total foi determinada a partir da incubação, a 50 °C, de 0,5 mL dos sobrenadantes e 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 2 % em tampão citrato. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2,0 mL de uma solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), procedendo-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A absorbância das amostras foi medida e comparada a uma curva de calibração constituída com padrões de D-glicose. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por mL, por minuto de reação (GHOSE, 1987). A atividade da celobiase (β-glicosidase) foi determinada com o

uso do Avicel 1 % como substrato. No ensaio, 250 µL de amostra foram homogeneizados com 500 µL da solução de Avicel 1 %. A solução foi mantida a 50 °C, por 1 hora, sob agitação constante, e a reação foi interrompida em banho de água fria. Em seguida, a solução foi submetida à centrifugação a 4.000 xg durante 10 minutos. Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados, 250 µL do sobrenadante foi homogeneizada com 700 µL de DNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por mL, por minuto de reação. A atividade de exoglucanase foi determinada a partir da mistura de 0,25 mL dos sobrenadantes com 0,5 mL de uma solução tampão citrato, que foi incubada a 42 °C. Posteriormente foi adicionado 0,25 mL de uma solução 4,0 mmol L⁻¹ de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo em tampão citrato. A mistura foi incubada durante 10 minutos, após o que foi adicionado 1,0 mL de uma solução 1,0 mol L⁻¹ de carbonato de sódio, para interromper a reação. A concentração de glicose produzida foi determinada indiretamente pela medida da concentração de p-nitrofenol no meio reacional, por leitura em espectrofotômetro a 410 nm. A curva de calibração foi construída com soluções padrão de p-nitrofenol. Uma unidade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um nmol de p-nitrofenol por mL, por minuto de reação. A atividade xilanolítica foi determinada de acordo com Bailey, Biely e Poutanen (1992), onde 1,8 mL de uma solução de xilana a 1 % m/v em tampão citrato foram incubados a 50 °C. Após a estabilização da temperatura, 0,2 mL do sobrenadante foram adicionados à solução. Após 5 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de DNS. A absorbância das amostras foi medida e comparada a uma curva de calibração baseada em padrões de D-xilose, lida a 540 nm. Uma unidade foi

definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de um μmol de xilose por minuto, por mL de reação.

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA

A atividade da protease foi determinada pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15 %. O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2 % m/v em tampão TRIS/HCl (pH 6,5). Amostras correspondentes a 0,5 mL de sobrenadante de cultura foram acrescidas de 1,0 mL de substrato e incubadas em banho-maria a 50 °C durante 10 minutos. A reação foi bloqueada com a adição de 0,5 mL de TCA, após o que as amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de uma solução de NaOH 1N. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

2.7 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DO POLIFOSFATO TOTAL

O polifosfato intracelular total foi extraído e dosado segundo o método descrito por Mcgrath e Quinn (2000). Amostras correspondentes a 1 g de micélio foram lavadas em solução de NaCl 1,5 M contendo EDTA 0,01 M e NaF 1 mM, sonicadas em gelo e centrifugadas. O extrato resultante foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4 °C. Para determinar o conteúdo do polifosfato celular total, 100 μl de HCl concentrado foi adicionado a 0,5 mL do extrato celular e aquecido a 100 °C por 45 minutos. O fosfato liberado foi dosado pelo método colorimétrico Fiske-

Subbarow (1925), com leitura espectrofotométrica a 600 nm. A concentração do polifosfato nas amostras foi expressa em miligramas de fósforo por decilitro. Uma amostra não hidrolisada foi utilizada como um controle para determinar o nível de fosfato livre da célula.

2.8 ESTUDO MORFOLÓGICO

Amostras de micélio coletados nos intervalos de 168 horas, nos diferentes meios de cultivo, foram submetidas à fixação em paraformaldeído 4 %, coradas com azul de metileno, observadas e fotografadas em microscópio de luz.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para as atividades enzimáticas, produção de ácido cítrico, glicosamina e polifosfato, nas diferentes condições de cultivo, estão expressos como média das cinco réplicas. Os dados foram avaliados estatisticamente empregando-se a análise de variância, e as diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$), determinadas pelo teste de Tukey, com auxílio do software STATISTIC 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo em meio contendo água de maceração do milho e glicose (meio MG) resultou, em relação ao meio glicose-peptona (GP), em um incremento de 13,9 % na produção de biomassa. Por outro lado, a presença de metanol induziu uma redução de 9,6 % no meio contendo água de maceração do milho (meio MGM). Quando adicionado ao meio glicose-peptona (GPM), o metanol gerou uma diminuição de 4,3 % na biomassa obtida (TAB. 1).

Tabela 1

Perfil de Crescimento de *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261 em diferentes meios de cultura: glicose e peptona (GP); glicose, peptona e metanol (GPM); milhocina e glicose (MG); milhocina, glicose e metanol (MGM)

Tempo (h)	GP gL ⁻¹	GPM gL ⁻¹	MG gL ⁻¹	MGM gL ⁻¹
24	3,26	3,01	4,79	4,28
48	7,89	7,58	8,79	8,48
72	9,58	9,36	11,8	10,1
96	12,9	12,3	16,9	13,9
120	23,9	22,8	28,6	25,4
144	27,5	26,9	32,6	31,1
168	32,3	30,9	37,5	33,9

#os dados representam a média das cinco réplicas.

Em relação à produção de glicosamina, um aumento crescente foi observado durante o período experimental. A maior produção foi determinada no meio MGM com um valor de 468 mg g⁻¹ de biomassa seca, o que correspondeu a aumentos de 51,4 % (236 mg g⁻¹), 37 % (306 mg g⁻¹) e 11 % (428 mg g⁻¹) em relação aos meios GP, GPM e MG, respectivamente (FIG. 1).

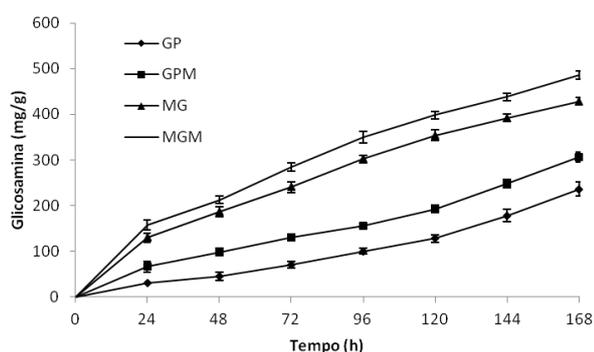


Figura 1 - Perfil de Glucosamina por *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261 em diferentes meio de cultura: glicose e peptona (GP); glicose, peptona e metanol (GPM); milhocina e glicose (MG); milhocina, glicose e metanol (MGM).

O perfil da produção de glicosamina por *A. niger* nos diferentes tipos de meios revelou um aumento significativo do aminoaçúcar em resposta às condições de cultivo. Foi observado aumento da glicosamina comparado com o controle da cultura ($P < 0,05$), além de ter sido determinado um aumento progressivo do composto ao longo do tempo experimental.

A produção de GlcN depende da concentração de biomassa, que está relacionada às condições de cultivo. Assim, não existem dados na literatura determinando a otimização dos componentes do meio. Vários estudos têm demonstrado que, em função das condições de cultivo, o conteúdo do aminoaçúcar varia (SITANGGANG *et al.*, 2010; LIN; WU, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

Carter, Nokes e Crofcheck (2004) avaliaram o conteúdo de glicosamina em *Aspergillus sp*, obtendo 24 mg g⁻¹. Hsieh, Wu e Wei (2007) relataram uma produção de glicosamina por *Aspergillus sp* acima de 185 mg g⁻¹. Utilizando o mesmo isolado que Hsieh, Wu e Wei (2007), Sitaggang *et al.* (2010) demonstraram que a adição do metanol (1,5 % v/v) favoreceu o aumento na concentração de glicosamina obtida. Embora reduza a produção de biomassa, nos estágios iniciais do crescimento celular (SITANGGANG, SOPHIA; WU, 2012), o metanol apresenta efeito positivo sobre o conteúdo do aminoaçúcar.

Chang e colaboradores (2011), utilizando açúcar granulado e peptona, obtiveram 250 mg g⁻¹ biomassa seca de glicosamina para um dos isolados de *Aspergillus sp* avaliado nos estudos de Hsieh, Wu e Wei (2007) e Sitaggang *et al.* (2010). Com base nesses estudos, é possível afirmar que um mesmo isolado apresenta comportamento diverso em resposta às condições de cultivo.

Os dados obtidos neste estudo revelam que a presença da água de maceração do milho, em substituição à peptona, favoreceu a obtenção de conteúdos significativamente elevados de glicosamina no isolado de *Aspergillus niger* obtido do solo da caatinga.

Os resultados obtidos para a produção de ácido cítrico revelaram uma variação da produção ao longo do crescimento celular, atingindo valores máximos com 96 horas de cultivo. Conteúdos do composto correspondentes a 2,32 g L⁻¹, 2,14 g L⁻¹, 1,87 g L⁻¹ e 1,54 g L⁻¹ foram determinados para os cultivos nos meios MGM, MG, GPM e GP, respectivamente. Tais dados implicam em aumentos de 7,8 %, 19,4 % e 33,6 % no conteúdo do ácido cítrico em resposta à presença da água de maceração do milho e do metanol no meio de cultivo em relação ao meio controle (glicose-peptona) (FIG. 2).

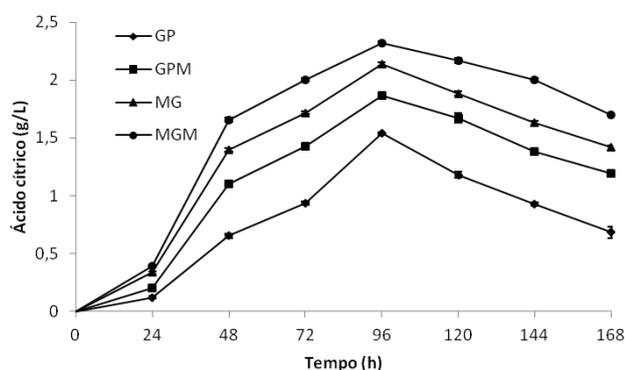


Figura 2 - Perfil de ácido cítrico de *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261 em diferentes meio de cultura: glicose e peptona (GP); glicose, peptona e metanol (GPM); milhocina e glicose (MG); milhocina, glicose e metanol (MGM).

A análise estatística demonstrou diferenças significativas na produção do ácido cítrico em função do tempo de cultivo e da composição do meio de cultura ($P < 0,05$) em relação à cultura controle.

Por sua natureza inócua, o ácido cítrico apresenta várias aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Comercialmente é obtido a partir de fermentações submersas com *Aspergillus niger* (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). A literatura revela que, embora haja variação em relação ao organismo e às condições de cultivo, a produção do ácido cítrico inicia-se entre 80 e 120 horas de cultivo (idíofase) (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). Neste estudo, os conteúdos máximos foram obtidos com 96 horas de crescimento em todas as condições de cultivo, corroborando os dados da literatura.

Paralelamente, alguns estudos relatam que diversos fatores como composição do meio, tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio e presença de elementos traço influenciam a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (GOSH, 2013; AUTA *et al.*, 2014).

Assim, uma grande variedade de substratos vem sendo testada para se avaliar a sua eficiência e eficácia na estimulação da produção do ácido cítrico. Resíduos de frutas, resíduos de cervejaria, dentre outros resíduos e subprodutos agroindustriais, foram avaliados em relação à produção do ácido cítrico, apresentando resultados positivos em diversas condições experimentais (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; AUTA *et al.*, 2014).

Por outro lado, o efeito positivo do metanol para a produção do ácido cítrico está relatado (ZHANG *et al.* 2011; CHANG; SITANGGANG; WU, 2011).

Os resultados das atividades das enzimas celulase, celobiase, exoglucanase e xilanase estão apresentados na FIG. 3A-D.

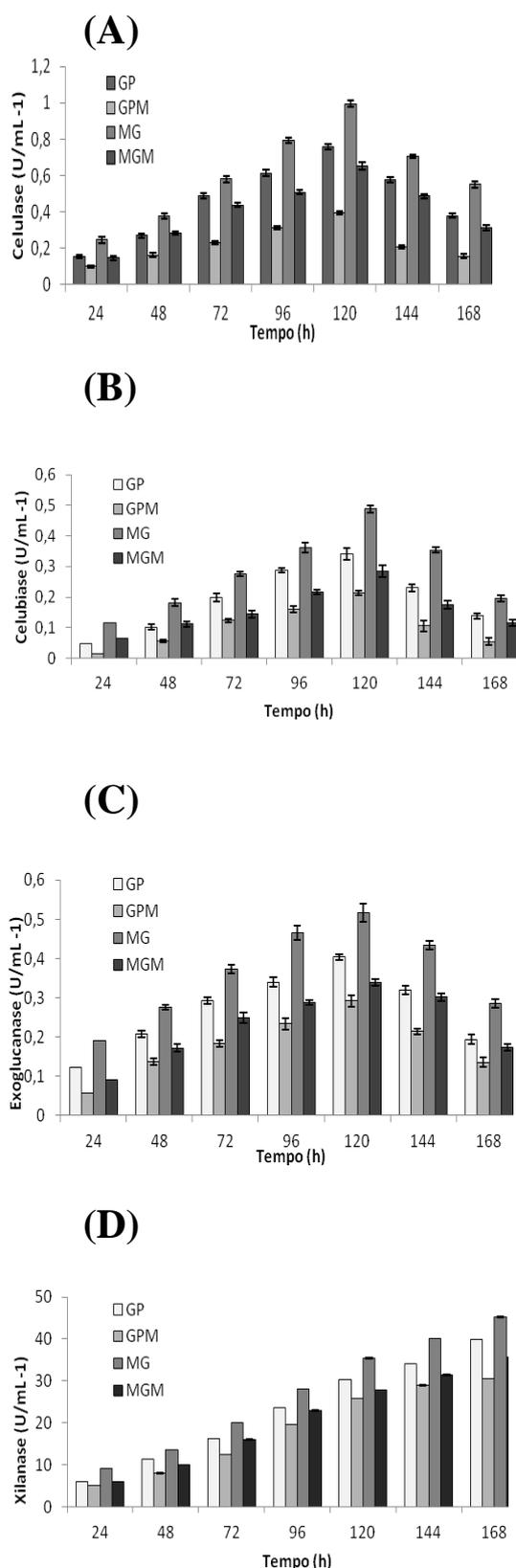


Figura 3 - Atividade enzimática de *Aspergillus niger* UCPWFCC 1261.. A – celulase; B – celubiase; C – exoglucanase e D – xilanase.

Em relação às enzimas do complexo celulolítico, os dados obtidos demonstram que as maiores atividades foram observadas com 120 horas de cultivo. Para as celulases totais atividades de $0,758 \text{ U mL}^{-1}$, $0,394 \text{ U mL}^{-1}$, $0,996 \text{ U mL}^{-1}$, e $0,654 \text{ U mL}^{-1}$, foram obtidas nos meios GP, GPM, MG e MGM, respectivamente. A adição do metanol resultou em reduções de 48 % e 34,3 % nos meios contendo peptona e água de maceração, respectivamente. A maior atividade da celubiase correspondeu a $0,488 \text{ U mL}^{-1}$ no meio MG. Comparando-se com o meio MGM, uma redução de 41 % foi observada. Em relação ao meio glicose-peptona e glicose-peptona-metanol, atividades de $0,342 \text{ U mL}^{-1}$, e $0,214 \text{ U mL}^{-1}$, foram obtidas, caracterizando uma redução média de 37,4 %. Para a exoglucanase, atividades correspondentes a $0,52 \text{ U mL}^{-1}$, $0,40 \text{ U mL}^{-1}$, $0,34 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,29 \text{ U mL}^{-1}$ foram obtidas nos meios MG, GP, MGM e GPM, respectivamente. Novamente, a presença do metanol induziu à diminuição da atividade enzimática em 27,5 % e 34,6 % nos meios GPM e MGM, respectivamente.

Para a xilanase, atividades correspondentes a $39,99 \text{ U mL}^{-1}$, $30,59 \text{ U mL}^{-1}$, $45,27 \text{ U mL}^{-1}$ e $35,73 \text{ U mL}^{-1}$ foram determinadas para as células cultivadas nos meios GP, GPM, MG e MGM, respectivamente. Verifica-se que a presença da água de maceração gerou um aumento de 11,7 % na produção da enzima. A presença do metanol no meio contendo água de maceração do milho (MGM) gerou uma redução de 21,1 % na atividade enzimática em relação ao meio sem metanol (MG). Por outro lado, no meio contendo glicose-peptona (GP), ocorreu uma redução de 23,5 % na produção enzimática em relação ao meio contendo a água de maceração e metanol.

A utilização de fungos para a produção industrial de enzimas extracelulares tem sido explorada como resultado do alto potencial de síntese desse grupo de organismos (PAPAGIANNI, 2004; ZHANG; HIMMEL;

MIELENZ, 2006). Dentre os fungos, o *Aspergillus niger* é considerado um modelo biológico para processos biotecnológicos e industriais (DOBREV *et al.*, 2007; ZUNIGA *et al.*, 2011).

As enzimas do complexo celulolítico e as xilanases estão entre as enzimas de maior aplicação nas diversas áreas industriais. Os maiores problemas associados à exploração comercial das enzimas são a estabilidade do rendimento e os custos de produção, o que estimula estudos associados à busca, na natureza, de novos sistemas potenciais como produtores e de novas matérias-primas como substratos (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Dessa forma, uma busca na literatura revela que diversos estudos estão associados à avaliação dos efeitos de diversos resíduos e subprodutos agroindustriais sobre a produção de enzimas ligninocelulolíticas em *Aspergillus niger*, com base na relevância dessas moléculas em diversos processos. Entre as diferentes fontes de nitrogênio, a peptona induz às maiores atividades enzimáticas, correspondendo a valores entre $1,20 \text{ U mL}^{-1}$ a $2,5 \text{ U mL}^{-1}$ para as celulases e $20,0 \text{ U mL}^{-1}$ a 90 U mL^{-1} para as xilanases (BENEDETTI *et al.*, 2013; KARUNAKARAN *et al.*, 2014).

O presente estudo revela que *Aspergillus niger* produziu quantidades significativas das enzimas celulase, celobiase, exoglucanase e xilanase em meio contendo água de maceração do milho, considerada um potencial substrato em função de seu baixo custo em relação à peptona. Além disso, os dados mostram a existência de uma variação significativa ($P < 0,05$) na produção das enzimas em relação à cultura controle.

O cultivo do fungo nos diferentes meios de cultura permitiu verificar a produção de protease (FIG. 4).

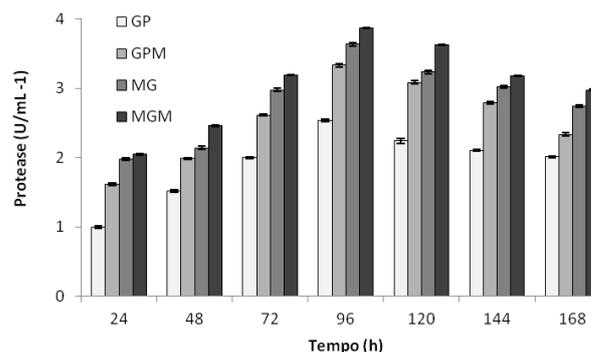


Figura 4 - Perfil de atividade proteásica de *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261 em meio glicose e peptona (GP); glicose, peptona e metanol (GPM); milhocina e glicose (MG); milhocina, glicose e metanol (MGM).

Os resultados apontam atividades correspondentes a $2,53 \text{ U mL}^{-1}$, $3,33 \text{ U mL}^{-1}$, $3,63 \text{ U mL}^{-1}$ e $3,86 \text{ U mL}^{-1}$ nas culturas com 96 horas de cultivo, para os meios GP, GPM, MG e MGM, respectivamente. Uma comparação entre os dados permite verificar que o cultivo na presença da água de maceração do milho e do metanol induziu a um aumento de 34 % em relação à peptona no meio GP e de 13,7 % em relação ao meio sem metanol (MG). Paralelamente, a presença do metanol gerou um aumento de 24 % na atividade da enzima (meio GPM) em relação ao meio glicose-peptona (GP).

Os resultados mostraram que, para os diferentes meios de cultura utilizados, ocorreu um efeito significativo ($P < 0,05$) na atividade da protease em relação ao controle.

Aspergillus niger é considerado um bom produtor de várias enzimas, incluindo proteases (GNANADOSS, ROBERT; JEBAPRIYA, 2011; SANKEERTHANA *et al.*, 2013). Nesses estudos, isolados de *Aspergillus niger* exibiram atividades entre 20 U mL^{-1} e 66 U mL^{-1} , detectadas em meios de cultura com diferentes substratos.

Considerando o papel do polifosfato na fisiologia celular, o comportamento do polímero foi avaliado, demonstrando que o seu conteúdo aumenta progressivamente nas células em até 96 horas de cultivo, atingindo valores de 2,02 mg dL⁻¹ e 2,53 mg dL⁻¹ nos meios contendo peptona (GP) e água de maceração do milho (MG), respectivamente, com uma variação de 20 % no conteúdo celular do polímero. Os dados apontam o efeito estimulador do subproduto na acumulação do polifosfato no isolado analisado (FIG. 5).

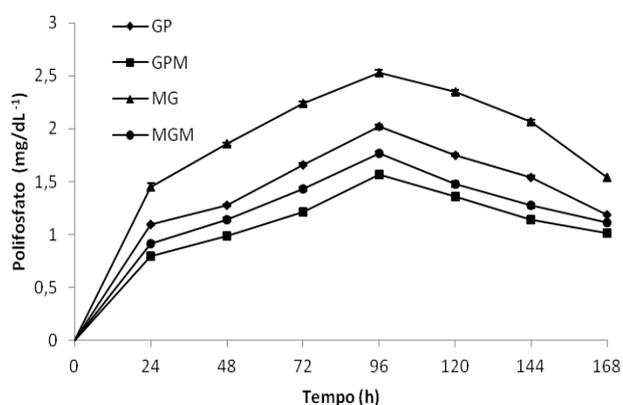


Figura 5 - Perfil do polifosfato de *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261 em diferentes meio de cultura: glicose e peptona (GP); glicose, peptona e metanol (GPM); milho e glicose (MG); milho, glicose e metanol (MGM).

Por outro lado, verificou-se que a adição do metanol no meio de cultivo contendo água de maceração do milho (MGM) gerou um conteúdo de 1,77 mg dL⁻¹, o que representa uma redução de 30% no conteúdo do polímero em relação ao meio MG. A introdução do álcool no meio GP resultou em uma diminuição de 22,3 % do polímero, correspondendo a 1,57 mg dL⁻¹.

Os resultados obtidos revelaram que amostras cultivadas em meio contendo água de maceração do milho foram capazes de acumular maiores concentrações do polímero em relação às células cultivadas na presença de peptona durante as primeiras 96 horas de crescimento. Após esse

intervalo, tem início a redução do polímero, indicando possivelmente sua degradação e utilização como fonte de fósforo para crescimento celular, o que é reforçado pelo progressivo aumento da biomassa.

A utilização da milhocina no meio de cultura possibilitou um significativo aumento, ao nível de 5 % do conteúdo do polímero em relação ao meio controle (com peptona) e, na presença do metanol, ocorreu uma diminuição do acúmulo do polímero.

O papel do fosfato é estudado em muitos tipos celulares (KORNBERG; RAO; AULT-RICHE, 1999; RAO; GÓMEZ-GARCÍA; KORNBERG, 2009).

A habilidade de acumular polifosfato tem grande implicação no potencial de sobrevivência de microorganismos em resposta a variações ambientais e em processos de remediação ambiental (KORNBERG; RAO; AULT-RICHE, 1999; KEASLING *et al.*, 2000).

A FIG. 6 apresenta a morfologia do isolado cultivado nas diferentes condições de cultivo através da microscopia fotônica.

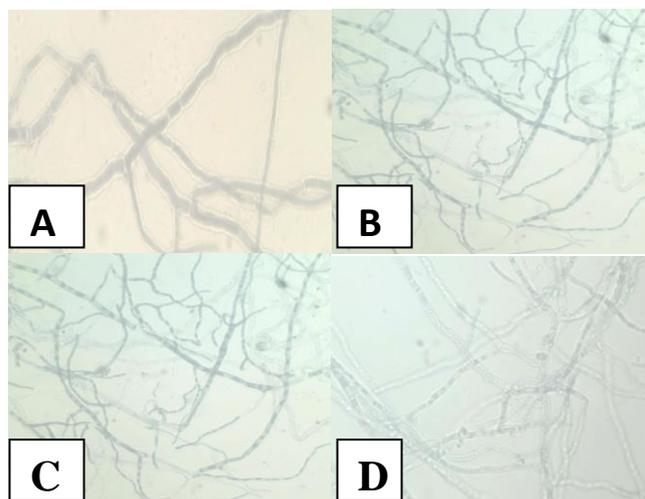


Figura 6 - Micrografias de *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261. A- cultivado em meio glicose-peptona (GP); B – cultivado em meio glicose-peptona-metanol (GPM); C – cultivado em glicose-água de maceração do milho (MG) e D – cultivado em meio glicose-água de maceração-metanol (MGM), 40X.

A análise das amostras permitiu verificar o surgimento de variações relativas à espessura, homogeneidade citoplasmática e padrão de ramificação das hifas.

A morfologia dos fungos filamentosos é complexa e tem sido alvo de diversos estudos com vistas à elucidação do comportamento bioquímico e fisiológico. O cultivo em meios sólidos, líquidos, em estado submerso ou em estado sólido, revela a existência de várias morfologias, que os estudos associam à carga genética, composição química do meio, concentração dos constituintes do meio de cultura, fatores físicos como pH, temperatura e forças mecânicas (KOSSEN, 2000; PAPAGIANNI, 2004).

Assim, alguns estudos relatam a influência das condições de cultivo sobre a morfologia de *Aspergillus niger* em relação à produção de ácido cítrico, proteases e glicoamilases e glicosamina (PAPAGIANNI; MATTEY; KRISTIANSEN, 1994, 1998; PAPAGIANNI *et al.*, 1999; PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 2002; PAPAGIANNI, 2004).

Adicionalmente, estudos relacionados à morfologia dos fungos filamentosos são ferramentas importantes, considerando-se que o processo produtivo está associado a um tipo especial de morfologia, sendo um requisito para a aplicação industrial (DRIOUCH; SOMMER; WITTMANN, 2010; KRULL *et al.*, 2013).

Por outro lado, o metanol é considerado um agente estimulador em processos fermentativos. Verifica-se o efeito do metanol sobre a morfologia micelial, aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática, o que contribui para aumento da excreção de metabólitos em *Aspergillus niger* (MADDOX ; HOSSAIN; BROOKS, 1986; HAQ *et al.*, 2003).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, verifica-se que o isolado de *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261 foi capaz de crescer na presença da água de maceração do milho, a qual exibiu efeito estimulador sobre a produção de biomassa, glicosamina, ácido cítrico, celulase, celobiase, exoglucanase, xilanase e protease. Contudo, a presença do metanol induziu redução de biomassa e das atividades das enzimas celulase, celobiase, exoglucanase, xilanase. O fungo foi capaz de acumular polifosfato. O conteúdo do polímero foi estimulado pela água de maceração do milho e reduzido na presença do metanol. Alterações estruturais foram observadas nas células cultivadas na presença da água de maceração do milho e metanol.

As variações determinadas nos processos de produção dos bioativos neste estudo foram estatisticamente significativas, indicando o efeito da água de maceração do milho sobre a capacidade metabólica do isolado. Tais resultados indicam o potencial do isolado endógeno e sua aplicação no desenvolvimento de processos produtivos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro do Projeto SISBIOTA – CNPq, à FACEPE, à CAPES e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela concessão da infraestrutura para execução da parte experimental.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, p. 117–139, 2014.
- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.
- ALBUQUERQUE, U.P. *et al.* Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. **The Scientific World Journal**, v.25, p.1-18. 2012.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **Food Science and Technology**, v.50, p.367-370, 2013.
- ANTUNES, A. A. *et al.* Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arquivos do Insituto. Biologia**, v. 80, p.334-341, 2013.
- AUTA, H. S. *et al.*, Citric acid production by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp. **International Scholarly Research Notices**, v. 11, p. 1-8, 2014.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.257-270, 1992.
- BENEDETTI, A. C. E. *et al.* Low-cost carbon sources for the production of a thermostable xylanase by *Aspergillus niger*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v. 34, p. 25-31, 2013.
- BERGER, L. *et al.* Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and Their Physicochemical Characteristics and Cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, p. 2771-2792, 2014.
- CARTER, S. B.; NOKES, S. E.; CROFCHECK, C. L. The influence of environmental temperature and substrate initial moisture content on *Aspergillus niger* growth and phytase production in solid state cultivation. **Transaction American Society of Agricultural Engineering**, v. 47, p.945-949, 2004.
- CHANG, Y. F.; SITANGGANG, A. B.; WU, H. S. Optimizing Biotechnological Production of Glucosamine as Food Ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742, **Journal of Food Technology**, v.9, p.75-82, 2011.
- CHMIELOWSKI, R. A.; WU, H. S.; WANG, S. S. Scale-up of upstream and downstream operations for the production of glucosamine using microbial fermentation. **Biotechnology Journal**, v.2, p.996-1006, 2007.
- DOBREV, G. T. *et al.* Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2671-2678, 2007.
- DRIOUCH, H., SOMMER, B., WITTMANN, C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, p. 1058-1068, 2010.
- ERNANDES, S.; BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O. Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*. **Acta Scientarum**, v.35, p. 11-18, 2013.
- EZEJIOFOR, T. I. N. *et al.* Waste to Wealth- Value Recovery from Agrofood Processing Wastes Using Biotechnology: A Review. **British Biotechnology Journal**, v.4, p. 418-481, 2014.
- FISKE, C. H., SUBBAROW – The colorimetric determination of phosphorus. **Journal Biology Chemical**. v. 66, p. 375 – 400, 1925.
- GE, X. Y.; ZHANG, W. G. Screening *Aspergillus niger* for production of ethanol from Jerusalem artichoke flour by simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Food Science Biotechnology**, v.25, p.83–87, 2005.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GNANADOSS, J.; ROBERT, R.; JEBAPRIYA, R. G. Production of protease from *Aspergillus niger* and *Mucor mucedo* under submerged and solid state fermentation. **International Journal of Current Research**, v.3, p.075-078, 2011.
- GOSH, P. Comprehensive review on citric acid fermentation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, p. 890-914, 2013.
- HAQ, I. U. *et al.* Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a

- 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 227-233, 2003.
- HAYES, M. *et al.* Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan – Part B: applications. **Biotechnology Journal**, v.3, p.878–889, 2008.
- HSIEH, J. W.; WU, H. S.; WEI, Y. H. Determination and kinetics of producing glucosamine using fungi. **Biotechnology Progress**, v.23, p.1009-1016, 2007.
- IGARASHI, M.; SAKAMOTO, K.; NAGAOKA, I. Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. **International Journal of Molecular Medicine**, v.28, p.373–379, 2011.
- KARUNAKARAN, S. *et al.*, Xylanase Production from *Aspergillus niger*. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 6, p. 4207-4211, 2014.
- KEASLING, J. D. *et al.* Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**. v.65, p.324-331, 2000.
- KORNBERG, A.; RAO, N. N.; AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annual Review of Biochemistry**, v.68, p. 89-125, 1999.
- KOSSEN, N. W. F. The morphology of filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 70, p. 1-33, 2000.
- KRULL, R. *et al.* Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.163, p.112-123, 2013.
- LIU, L. *et al.* Microbial production of glucosamine and N-acetylglucosamine : advances and perspectives. Mini-review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p.6149-6158, 2013.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p; 265-276, 1951.
- MACHADO R. *et al.* Resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato para produção de fungo entomopatogênico *Lecanicillium Lecanii*. **Gragantia Revista de Ciências Agrônômicas**, v.68, p.28-36, 2009.
- MANERA, A. P. *et al.* Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v.33, p.155–161, 2011.
- MCGRATH, J. .; QUINN, J. P. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4068-4073, 2000.
- MENEGHETTI C. C.; DOMINGUES J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, p.512-536, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MOYER, A. J.; COGHILL, R. D. Penicillin IX. The laboratory scale production of penicillin in submerged cultures by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). **Journal of Bacteriology**, v. 51, p. 79–93, 1946.
- OKUDA, N. *et al.* Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: inoculum size increase and coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.105, p. 90–96, 2008.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advance**, v. 22, 189-259, 2004.
- RAO, N. N.; GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. **Annual Review of Biochemistry**, v.78, p.605-647, 2009.
- SAFFRAN, M.; DENSTEDT, D. F. A rapid method for determination of citric acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 175, p.849-855, 1948.
- SANKEERTHANA, C. A. *et al.* Production and Partial Characterization of Protease from *Aspergillus flavus* using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparison with *Aspergillus niger* Protease. **International Journal of Current Engineering and Technology**, Special Issue1, p.143-147, 2013.
- SCHUSTER, E. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.
- SITANGGANG, A. B. *et al.* Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus sp.* BCRC 31742. **Bioresource Technology**, v.101, p.3595–3601, 2010.

SITANGGANG, A. B.; SOPHIA, L.; WU, H. S. MiniReview. Aspects of glucosamine production using microorganisms. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 393-404, 2012.

TSIAMIS, G. *et al.* Microbial Diversity for Biotechnology. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-3, 2014.

ZAMANI, A. *et al.*, Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56. p. 314–8318, 2008.

ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Review Biotechnology Advance**, v.24, p.452–481, 2006.

ZHANG, J. *et al.* Enhanced glucosamine production by *Aspergillus sp.* BCRC 31742 based on the time-variant kinetics analysis of dissolved oxygen level. **Bioresource Technology**, v.111, p.507–511, 2011.

ZUNIGA, U. F. R. *et al.* Produção de celulases por *Aspergillus niger*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.912-919, 2011.