

PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS A
ÁCIDOS NUCLEICOS POR *ASPERGILLUS NIGER* EM
MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS

PRODUCTION OF NUCLEIC ACID-RELATED SUBSTANCES
BY *ASPERGILLUS NIGER* IN CHEMICALLY DEFINED
MEDIA

A. de Carvalho*, C.R. Faria e R. Molinari
Instituto de Química, UNESP, Araraquara, São
Paulo, Brasil.

RESUMO

Estudou-se a produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios de cultura quimicamente definidos. A produção máxima foi obtida em meio contendo, por litro, 30 g de glicose, 1,32 g (10 mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,26 g (1,5mM) de K_2HPO_4 , 0,52 g (3,0mM) de K_2SO_4 , 4,0 g de CaCO_3 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 5 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

ABSTRACT

A chemically defined medium was developed for the nucleic acid-related substances accumulation by *Aspergillus niger*. Maximum production was obtained in a medium containing per liter, 30 g of glucose, 1,32 g (10 mM) of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,26 g (1,5 mM) of K_2HPO_4 , 0,52 g (3,0 mM) of K_2SO_4 , 4,0 g of CaCO_3 , 2,0 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg of $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 5 mg of $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

INTRODUÇÃO

A produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por fermentação microbiana tem sido intensivamente investigada⁽¹⁻⁸⁾.

CARVALHO & MOLINARI⁽⁹⁾ estudaram a produção de substâncias por *Streptomyces aureofaciens* em meios quimicamente definidos e CARVALHO, OLIVEIRA & MOLINARI⁽¹⁰⁾ em meios complexos.

O objetivo deste estudo foi determinar as melhores condições para a produção máxima de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por fermentação com *Aspergillus niger* em meios de cultura quimicamente definidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio Básico

A composição do meio básico quimicamente definido foi, por litro, a seguinte: 50 g de sacarose; 3,96 g (30 mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,306 g (7,5 mM) de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 5 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Inóculo

Preparou-se uma suspensão de esporos da cultura utilizada (*Aspergillus niger*, linhagem NRR1 — 337) pela adição de 8 ml de água destilada esterilizada a um tubo da cultura na forma de agar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio com uma espátula esterilizada.

Inoculou-se 4 frascos de Roux, contendo 200 ml do meio básico solidificado com 1,75% de agar, com 1,5 ml da suspensão de esporos acima, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio de cultura e os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 27 dias.

Adicionou-se, então, 130 ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi preparada da forma já descrita. A suspensão foi assepticamente homogeneizada em liquidificador de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 30 ml, para frascos estéreis de 50 ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, foram prontamente congelados por imersão

em banho refrigerante de etanol-gelo seco e conservados em congelador (-30°C) até serem usados.

A esporulação pode ser acelerada reduzindo-se as concentrações da fonte de carbono e/ou nitrogênio do meio básico. Quando se usa sacarose (15 g/l) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 mM) obtém-se esporulação máxima em 10 dias.

Esterilização dos meios de Cultura

A esterilização dos meios foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 120°C durante 30 minutos. A fonte de carbono era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio.

O pH dos meios, após a esterilização, foi ajustado, quando necessário, pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio diluídos e esterilizados, de modo a obter-se pH entre 6,8 — 7,2.

Fermentação

O processo empregado para permitir o crescimento do microrganismo, em condições de produzir as substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, foi o de "frascos agitados". Com tal técnica a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação. Foram utilizados frascos de 125 ml, contendo 20 ml de meio de cultura e 1,0 ml de inóculo, colocados na plataforma oscilante da máquina agitadora, onde descreviam círculos de 3 cm de diâmetro na velocidade de 250 rotações por minuto.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 1 cm, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C, em experiências de 110 horas.

As experiências foram sempre constituídas por duplicatas, ou seja, cada resultado deriva de par de frascos preparados e analisados paralelamente.

Métodos Analíticos

A produção das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos ($\text{S}_{2,3,0}$) foi determinada pela densidade óptica, arbitra-

riamente medida a 260 nm, do caldo fermentado filtrado (A_{260}). Foram feitas correções nos valores obtidos em função da densidade óptica do caldo de cultura esterilizado ("Branco"), da contribuição do inóculo e do volume final do caldo fermentado em relação ao volume inicial (20 ml).

Por analogia com o sistema utilizado por BENDICH⁽¹¹⁾ definiu-se uma unidade de material (S_{260}) como a quantidade de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos contida em 1 ml de solução, cuja densidade óptica a 260 nm é 1,0 medida em cuba de 1 cm.

O crescimento foi avaliado pela determinação da massa micelar do micélio filtrado e lavado com água destilada. O micélio lavado era transferido, com auxílio de um mínimo de água, para copos de 50 ml previamente secos e pesados. Eliminava-se a maior parte da água de transferência por aquecimento dos copos em chapa quente (não se permitindo ebulição), seguindo-se aquecimento em estufa a 105°C durante 15 horas.

Os resultados, média dos pares, são apresentados como micélio por mililitro de caldo fermentado (mg/ml), referidos ao volume inicial de meio e desprezando-se a contribuição do inóculo.

Quando o meio de cultura continha carbonato de cálcio, o micélio era lavado com ácido perclórico 0,1 M antes de ser lavado com água, para a remoção daquele sólido.

RESULTADOS

A produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos pelo *Aspergillus niger*, no meio básico quimicamente definido, é mostrado na figura 1 como um processo onde o crescimento do microrganismo e o acúmulo do material ocorrem simultaneamente.

A análise do caldo fermentado, através de cromatografia de troca-iônica, cromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indica uma mistura complexa e a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, conforme será visto em publicação posterior.

Constatada a produção pelo *Aspergillus niger* de substâncias que absorvem no ultravioleta (S_{260}), no meio básico quimicamente definido, passou-se ao estudo da influência da composição do meio de cultura na produção do material.

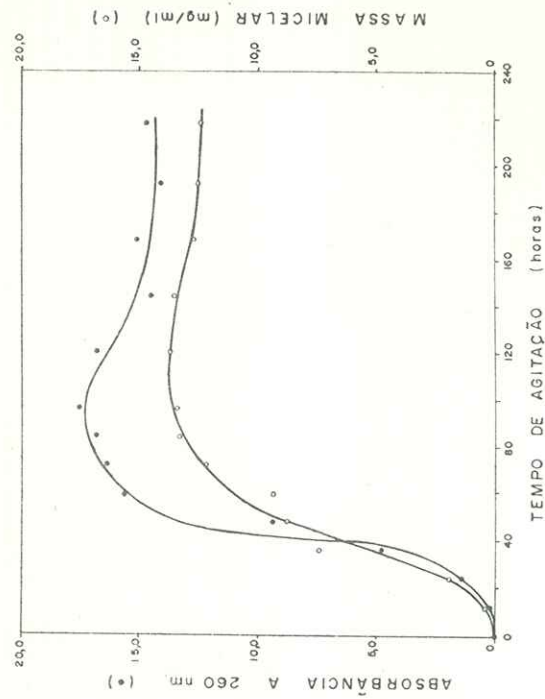


FIG. 1 — Curvas de crescimento do *Aspergillus niger* e produção do material S_{260} no meio básico

Fonte de carbono

A Tabela I mostra os resultados obtidos quando são comparados vários açúcares como fonte de carbono, em três concentrações diferentes.

Os resultados indicam glicose, sacarose e frutose como as melhores fontes de carbono, entre as estudadas, para a produção de S_{260} e crescimento do microrganismo. Observa-se

TABELA I

Influência da Fonte de Carbono na Produção e Crescimento do Microorganismo

Fonte de Carbono (g/l)	pH final	A ₂₆₀ final	Massa Micelar (mg/ml)
Glicose (40)	2,2	17,8	10,4
Glicose (50)	2,2	16,5	13,3
Sacarose (50)	2,2	15,1	13,4
Frutose (40)	2,1	14,9	11,8
Glicose (70)	2,1	14,5	11,8
Frutose (70)	2,2	12,6	9,1
Manose (70)	2,2	11,9	10,2
Manose (50)	2,2	11,9	14,6
Sacarose (70)	2,2	10,6	14,7
Frutose (50)	2,1	10,6	13,6
Sacarose (40)	2,4	10,5	10,8
Manose (40)	2,5	9,8	10,5
Maltose (70)	2,2	6,3	12,0
Maltose (50)	2,2	5,1	10,4
Maltose (40)	2,3	5,0	9,8
Sem açúcar	6,2	0,0	0,0

também a influência da concentração do açúcar em ambas as atividades. A maltose é a que menos serve para a produção do material.

Fonte de nitrogênio

A Tabela II contém os resultados obtidos pela substituição do sulfato de amônio por várias outras fontes de nitrogênio, usando-se glicose (40 g/l) como fonte de carbono.

Esta Tabela mostra que, com exceção da trietanolamina, as substâncias utilizadas, isoladamente ou em misturas, servem como fonte de nitrogênio para a produção das substâncias S₂₆₀ e para o crescimento do microorganismo.

Observa-se que a adição de carbonato de cálcio promove um aumento de 23% na produção do material, quando se usa

TABELA II

Efeito da fonte de nitrogênio na produção de S₂₆₀ e crescimento do microorganismo, usando glicose (40 g/l) como fonte de carbono

Fontes de Nitrogênio	pH final	A ₂₆₀ final	Massa Micelar (mg/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,015 M) com L-asp. de potássio (0,030 M)	4,4	21,9	11,2
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,030 M) com CaCO ₃ (4,0 g/l)	4,3	21,2	8,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,030 M)	2,1	17,3	10,3
Glicina (0,060 M)	4,0	12,2	8,1
KNO ₃ (0,060 M)	5,7	9,9	4,0
Uréia (0,030 M)	5,2	9,7	6,0
L-asp. de potássio (0,060 M)	5,6	8,8	9,0
D L-alanina (0,060 M)	3,9	7,9	8,1
Gelatina (5,0 g/l)	3,6	4,5	9,7
Trietanolamina (0,060 M)	7,5	0,6	0,3
Nenhuma	6,2	0,2	0,3

sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. A explicação está relacionada com o pH final mais favorável. Fato semelhante é observado pela adição de L-aspartato de potássio:

Entre as substâncias e misturas utilizadas verifica-se que as misturas de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio ou carbonato de cálcio são as que permitem maior produção do material S₂₆₀. Para a continuação do trabalho foi escolhida, como fonte de nitrogênio, a mistura sulfato de amônio mais carbonato de cálcio.

Concentração da fonte de carbono

A Tabela III mostra a influência da concentração de glicose na produção de S₂₆₀ e crescimento do microorganismo em meio de cultura contendo, como fonte de nitrogênio, mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio.

Esta Tabela indica que a concentração de glicose tem grande influência na produção do material S₂₆₀. Obteve-se

TABELA III

Influência da concentração da fonte de carbono

Glicose (g/l)	pH final	A ₂₆₀ final	Massa Micelar (mg/ml)
0,0	6,3	0,0	0,1
15,0	5,9	11,6	7,8
30,0	4,5	24,8	8,7
40,0	4,5	22,0	8,6
50,0	4,7	18,9	8,4
70,0	4,8	15,6	7,6
90,0	4,5	15,6	7,1
120,0	4,8	10,2	6,8
160,0	4,8	4,5	6,4

maior produção com a concentração 30 g/l. Observa-se menor influência da concentração desta fonte de carbono no crescimento do microrganismo.

Concentração da fonte de nitrogênio

A Tabela IV mostra a influência da concentração de sulfato de amônio na produção do material S₂₆₀ e crescimento do microrganismo, em meio contendo glicose (30 g/l) e carbonato de cálcio (4 g/l).

TABELA IV

Influência da concentração da fonte de nitrogênio

(NH ₄) ₂ SO ₄ (x 10 ³ M)	pH final	A ₂₆₀ final	Massa Micelar (mg/ml)
0,0	4,1	0,8	0,7
10,0	3,1	31,8	7,9
15,0	4,7	30,5	7,7
20,0	4,8	26,8	7,6
25,0	4,9	25,0	7,2
30,0	4,7	24,1	8,2
40,0	4,9	23,9	8,4
50,0	4,9	28,3	8,6

A Tabela IV indica que a maior produção é obtida com a concentração 100 mM, correspondendo a um aumento de 32% quando comparada com aquela obtida com a concentração 30 mM inicialmente usada.

Concentração da fonte de fósforo

A Tabela V mostra a influência da concentração do ortofosfato dipotássico em meio de cultura contendo glicose (30 g/l) como fonte de carbono e a mistura sulfato de amônio (10 mM) mais carbonato de cálcio (4 g/l) como fonte de nitrogênio. A concentração de potássio foi mantida constante pela adição de sulfato de potássio.

TABELA V

Influência da concentração da fonte de fósforo

K ₂ HPO ₄ (x 10 ⁴ M)	K ₂ SO ₄ (x 10 ⁴ M)	pH final	A ₂₆₀ final	Massa Micelar (mg/ml)	A ₂₆₀ Massa Micelar
0,0	130,0	3,4	2,0	0,8	2,5
15,0	115,0	3,6	39,9	8,3	4,8
30,0	100,0	3,6	30,5	7,2	4,2
45,0	85,0	3,7	29,0	7,3	4,0
60,0	70,0	3,6	29,0	7,4	4,0
80,0	50,0	3,5	30,9	8,9	3,5
100,0	30,0	3,1	30,7	9,1	3,4

Observa-se na Tabela acima que a presença de fosfato no meio de cultura é fundamental tanto para o crescimento do microrganismo quanto para a produção do material S₂₆₀ e que a maior produção é obtida na vizinhança de 1,5mM.

Influência da concentração de potássio

A Tabela VI mostra a influência da concentração de potássio na produção do material S₂₆₀ e crescimento do microrganismo, quando se usa glicose (30 g/l) como fonte de carbono, a mistura sulfato de amônio (10 mM) mais carbo-

nato de cálcio (4 g/l) como fonte de nitrogênio, e ortofosfato dipotássico (1,5 mM) como fonte de fósforo.

TABELA VI
Influência da concentração de potássio

K ₂ SO ₄ (x 10 ⁴ M)	Potássio (x 10 ⁴ eq g/l)	pH final	A ₂₆₀ final	Massa Micelar (mg/ml)
0,0	0,0*	5,9	11,5	5,0
0,0	15,0**	4,7	13,0	8,3
0,0	30,0***	4,5	32,0	9,4
10,0	50,0	4,5	33,3	9,9
20,0	70,0	4,5	40,8	10,1
30,0	90,0	4,4	43,0	9,6
45,0	120,0	4,5	36,3	9,6
60,0	150,0	4,6	34,5	8,5
75,0	180,0	4,7	38,5	8,2
95,0	220,0	4,6	34,4	8,5
115,0	260,0	4,5	38,7	7,9
145,0	320,0	4,2	35,6	8,8

* neste meio o ortofosfato dipotássico (1,5 mM) foi substituído pelo sal dissódico de mesma concentração;

** neste caso foi utilizado uma mistura em partes iguais dos dois sais;

*** neste e nos demais meios a fonte de fósforo é constituída exclusivamente pelo ortofosfato dipotássico (1,5 mM).

Esta Tabela mostra que, quando se substitui o ortofosfato dipotássico pelo sal dissódico, ocorre uma redução de 64% na produção do material S₂₆₀ e de 47% no crescimento microbiano, indicando a importância do potássio para a produção e crescimento máximos. As concentrações necessárias para cada caso são ligeiramente diferentes, ou seja, 9,0 meq g/l e 7,0 meq g/l respectivamente.

A Figura 2 mostra as curvas de produção do material S₂₆₀ e crescimento do microrganismo no meio desenvolvido, ou seja, contendo por litro: 30 g de glicose, 1,32 g (10 mM) de (NH₄)₂SO₄, 0,26 g (1,5 mM) de K₂HPO₄, 0,52 g (3,0 mM) de K₂SO₄, 4,0 g de CaCO₃, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 10 mg de

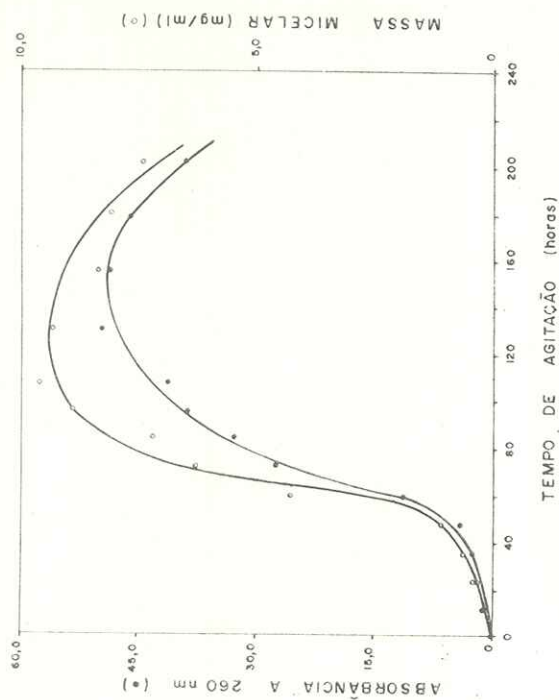


FIG. 2 — Curvas de crescimento do *Aspergillus niger* e produção do material S₂₆₀ no meio quimicamente definido desenvolvido

ZnSO₄.7H₂O, 10 mg de FeSO₄.7H₂O, 10 mg de MnSO₄.H₂O e 5 mg de CoSO₄.7H₂O. O crescimento máximo é obtido após 120 horas de agitação e a produção máxima após 150 horas.

DISCUSSÃO

As Figuras 1 e 2 indicam que, simultaneamente com o crescimento do *Aspergillus niger*, ocorre o aparecimento do material S₂₆₀ no caldo fermentado. Esta observação sugere que a produção do material S₂₆₀ é um processo diretamente relacionado à atividade microbiana em todas as fases do crescimento e não um processo implicado com a degradação de ácidos nucleicos, pré-formados, na fase decrescente⁽¹²⁾.

Este fato confirma os resultados obtidos com o *Streptomyces aureofaciens* ⁽⁹⁾, quando admitimos que o acúmulo no caldo fermentado de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos tratava-se, não de um processo de degradação, mas de um desvio metabólico ativo ainda não totalmente esclarecido.

Neste trabalho tal desvio foi nutricionalmente manipulado de forma a obter-se meio de cultura adequado para produção máxima do material S₂₀₀. O melhor meio desenvolvido permitiu um aumento de 144% na produção do material em relação ao meio básico arbitrariamente escolhido.

A Tabela I mostra que vários açúcares servem como fonte de carbono para o crescimento microbiano e produção do material, e que a glicose, entre os estudados, é o mais adequado, enquanto a maltose é o menos indicado.

A Tabela II indica que substâncias como sulfato de amônio, glicina e misturas como sulfato de amônio mais L-aspartato de potássio ou sulfato de amônio mais carbonato de cálcio são adequadas como fonte de nitrogênio tanto para a produção quanto para o crescimento do microrganismo.

Como mostra a referida Tabela, o pH final depende da fonte de nitrogênio utilizada pelo microrganismo. Quando o sulfato de amônio é a fonte de nitrogênio, o pH final cai em consequência da incorporação do íon em compostos neutros e a produção diminui. Contudo, como já havíamos observado para o *Streptomyces aureofaciens* ⁽⁹⁾, com a adição de carbonato de cálcio ou de L-aspartato de potássio o pH final diminui menos, permitindo produções maiores, com aumentos superiores a 20%.

A Tabela III mostra que a concentração de glicose tem grande influência na produção das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos e menor efeito no crescimento microbiano. Fato semelhante é mostrado pela Tabela IV com relação à concentração da fonte de nitrogênio. As concentrações mais adequadas são, respectivamente, 30 g/l e 10 mM.

Com relação à influência de fosfato, a Tabela V indica, através da "produção específica", razão entre a A₂₆₀ e a massa micelar, que aumenta conforme diminui a concentração de fosfato, que o *A. niger* secreta para o meio de cultura precu-

sores de ácidos nucleicos devido à deficiência de fosfato para a produção de nucleosídeos trifosfatos, necessários à síntese destas macromoléculas. O mesmo já havia sido observado para o *Streptomyces aureofaciens* ⁽⁹⁾.

A Tabela VI mostra a influência da concentração de potássio, onde se observa que, ao ser substituído por sódio, ocorre redução de 64% na produção e de 47% no crescimento. As concentrações mais adequadas de potássio para o crescimento e produção são, respectivamente, 7,0 e 9,0 meq g/l.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Akiya, T., Midorikawa, Y., Kuminaka, A., Yoshino, H. and Ikeda, Y. — Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 36(2): 227-233 (1972).
- 2) Demain, A.L., Jackson, M., Vitali, R.A., Hendlin, D. and Jacob, T.A. — Appl. Microbiol. 14(5): 821-825 (1966).
- 3) Furuya, A., Araki, K., Nohara, M., Abe, S. and Kinoshita, S. — Amino Acid Nucleic Acid (Tokyo) 9: 24-30 (1964).
- 4) Igarasi, S., Takeuchi, Y., Imada, A. and Nogami, I. — Ann. Rept. Takeda Res. Lab. (Japan) 23: 64-68 (1964).
- 5) Ishii, K. and Shiio, I. — Agr. Biol. Chem. 37 (2): 287-300 (1973).
- 6) Kawamoto, I., Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S. — Agr. Biol. Chem. 34 (8): 1142-1149 (1970).
- 7) Schwartz, J. and Margalith, P. — Biotechnol. Bioeng. 15(1): 85-91 (1973).
- 8) Shavlovskii, G.M., Logvinenko, E.M. and Kachan, A.F. — Ukr. Bioklim. Zh. 42(4): 517-523 (1970).
- 9) Carvalho, A. and Molinari, R. — Rev. Bras. Tecnol. 7(3): 289-296 (1976).
- 10) Carvalho, A., Oliveira, P.L.C. e Molinari, R. — Eclética Química 2: 47-60 (1977).
- 11) Bendich, A. — Methods for Characterization of Nucleic Acids by Base Composition. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. — Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1957, Vol. III, p. 715-723.
- 12) Sinuth, J. and Zelinka, J. — J. Antibiot. 23(5): 242-249 (1970).