

INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES COMPLEXOS NA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS A ÁCIDOS NUCLEÍCOS POR *Aspergillus flavus*

Alirio de CARVALHO*
Flávio Carvalho RIBEIRO**
Olympio JARDIM JUNIOR*
Rubens MOLINARI*

■ **RESUMO:** Estudou-se a influência do enriquecimento do meio, quimicamente definido e desenvolvido em trabalho anterior (*Ecl. Quím.*, v. 19), com os nutrientes complexos: água de milho, bacto-casitona, bacto-peptona, extrato de carne, extrato de levedo, farelo de algodão, farelo de amendoim, farinha de soja e hidrolisado de caseína, adicionados individualmente e em combinações variadas. Observou-se que a produção das substâncias S_{280} pode ser aumentada pela adição de alguns desses nutrientes complexos. A maior produção foi obtida no meio contendo bacto-peptona e bacto-casitona. Os resultados mostraram também que o extrato de carne, individualmente, é o que mais estimula a produção, seguindo-se a bacto-casitona, o hidrolisado de caseína, o farelo de algodão e a bacto-peptona. Meios contendo combinações de bacto-peptona, bacto-casitona e hidrolisado de caseína permitem a obtenção de bons resultados. Constatou-se que o crescimento microbiano pode ser aumentado em até 100% e que a produção das substâncias S_{280} pode ser aumentada mais de 15 vezes, em comparação com os melhores resultados anteriormente obtidos no meio quimicamente definido. Entretanto, nem todas as combinações são adequadas, o que sugere que a síntese do material S_{280} parece não estar relacionada com o teor de nutrientes dos meios de cultivo, mas depender particularmente de apenas alguns componentes. Os resultados obtidos indicaram ainda que a concentração inicial dos componentes dos meios tem grande influência na produção das substâncias e que o melhor meio de cultivo encontrado continha, por litro, sacarose (75 g), gelatina (5 g), K_2HPO_4 (0,75 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g), bacto-peptona (7,5 g) e bacto-casitona (5 g). Nesse meio, a produção das substâncias S_{280} e o crescimento máximos são obtidos após 144 e 216 horas de agitação, respectivamente.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus flavus*; substâncias relacionadas a ácidos nucleicos; substâncias que absorvem luz ultravioleta; nutrientes complexos.

* Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação - Instituto de Química - UNESP - 14800-900 - Araraquara - SP - Brasil.

** Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP, Processo n.4 - Biológicas 78/0193.

Introdução

A produção microbiana de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos (S_{260}) tem despertado bastante interesse, tornando a bibliografia relacionada extensa,^{2-9,11-20} sobretudo pelo fato de algumas delas terem sido identificadas como potentes estimuladoras do sabor dos alimentos.

Verificou-se, em trabalho anterior,¹⁰ que o *Aspergillus flavus*, quando cultivado em meios quimicamente definidos, acumula, nos caldos de cultura, tais substâncias e foram estudadas condições de cultivo para máxima produção destas. Ficou claro que o crescimento do fungo e a produção do material ocorrem simultaneamente, ou seja, que a síntese das substâncias está diretamente relacionada à atividade microbiana, não se tratando de processo de degradação de ácidos nucleicos, pré-formados, na fase decrescente.²¹

Entretanto, o emprego industrial de meios de cultivo quimicamente definidos para a produção de substâncias úteis por fermentação é um processo relativamente pouco comum, sendo empregados, de preferência, meios constituídos de nutrientes complexos, usualmente resíduos ou subprodutos da indústria agropecuária, por serem econômicos e eficientes. Por esse motivo procurou-se, neste trabalho, enriquecer o meio quimicamente definido anteriormente desenvolvido pela adição de nutrientes complexos, objetivando-se determinar o efeito no acúmulo das substâncias S_{260} e aumentar, ao máximo, a biossíntese das mesmas. Estudou-se também a influência da variação simultânea das concentrações dos nutrientes selecionados e, ainda, a cinética do processo (por meio da determinação das curvas de crescimento do microorganismo e da produção do material, em função do tempo de agitação) com a finalidade de se obterem informações que possibilitem, no futuro, melhor conhecimento sobre a fisiologia do *A. flavus* e sobre os motivos que o levam à produção e ao acúmulo destas substâncias.

Material e método

Meio para preparação do inóculo. Sacarose, 50 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g; K_2HPO_4 , 1,31 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mg; e $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg, por litro de meio.

Inóculo. Preparou-se uma suspensão inicial de esporos da cultura utilizada (*Aspergillus flavus* EPM 157) pela adição de 8 ml de água destilada esterilizada a um tubo da cultura na forma ágar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio, no tubo, com uma espátula esterilizada.

Inoculou-se número suficiente de frascos de Roux contendo, cada um, 200 ml do meio indicado mais 2% de ágar, com 2 ml da suspensão de esporos obtida

anteriormente, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio nutriente. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 19 dias.

Adicionaram-se, então, 130 ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi obtida da maneira já citada. A suspensão preparada 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, os frascos foram rapidamente congelados a -30°C e, assim, mantidos até o momento de serem utilizados.

Composição do meio de referência. O meio quimicamente definido¹⁰ continha sacarose, 50 g; gelatina, 5 g; K_2HPO_4 , 0,52 g; e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g, por litro.

Esterilização dos meios de cultivo e outros materiais. A esterilização foi feita em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 121°C durante 30 minutos. A sacarose era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio, no momento da inoculação.

O pH dos meios era ajustado após a esterilização e, quando necessário, pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de potássio diluídos e esterilizados, de modo a se obter pH entre 6,0 e 7,0.

Técnica de cultivo. O processo empregado para conseguir o crescimento do microorganismo em condições de produzir as substâncias S_{260} foi o de "frascos agitados". Com tal técnica, a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa. Utilizaram-se frascos de Erlenmeyer de 125 ml, contendo 30 ml de meio nutriente e 1 ml de inóculo (suspensão de esporos), colocados na mesa agitadora, onde descreviam círculos de 3 cm de diâmetro na velocidade de 250 rpm.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 1 cm de espessura, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C , em experimentos de 170 horas, em que a agitação só era interrompida para carga e descarga do aparelho, a fim de se manter oxigenação contínua ao microorganismo em desenvolvimento.

Cada resultado deriva de par de frascos preparados e analisados paralelamente.

Método analítico. A produção das substâncias S_{260} foi determinada pela absorbância (A_{260}), medida a 260 nm, do caldo de cultura filtrado. Foram feitas correções nos valores obtidos em função da absorbância do meio nutriente esterilizado ("Branco") e do volume final do caldo de cultura em relação ao volume inicial de meio de cultivo.

Por analogia com o sistema utilizado por Bendich,¹ definiu-se uma unidade do material S_{260} como a quantidade de substâncias contida em 1 ml de solução, cuja absorbância a 260 nm é de 1,0 medida em cuba de 1 cm.

Resultado e discussão

Os meios de cultivo foram ensaiados pela adição, ao meio de referência,¹⁰ de nove nutrientes complexos, isoladamente e em combinações variadas, na concentração de 5 g/l de cada um, em experiências de 170 horas.

Os resultados obtidos pelas dez melhores combinações entre as 140 estudadas estão descritos na Tabela 1, que mostra que a síntese das substâncias S₂₆₀ pode ser aumentada pela adição de nutrientes complexos ao meio de referência. A maior produção foi obtida no meio contendo bacto-peptona e bacto-casitona.

A Tabela 1 mostra também que o extrato de carne, individualmente, é o que mais estimula a produção, seguindo-se a bacto-casitona, o hidrolisado de caseína, o farelo de algodão e a bacto-peptona.

Tabela 1 - Dados quantitativos sobre o efeito estimulante da adição de nutrientes complexos na produção das substâncias S₂₆₀ pelo *Aspergillus flavus*

Composição dos meios em nutrientes complexos*													
Ext. lev.	Ext. carne	Far. soja	Far. pept.	Bacto-casit.	Bacto-casit.	Hid. cas.	Far. amen.	Far. alg.	Água milho	pH final	A ₂₆₀ final	Produção relativa	Estímulo (%)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	90,2	1,00	-
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	6,9	1307,9	14,50	1350
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	1154,6	12,80	1180
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	6,0	1109,5	12,30	1130
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	6,0	956,1	10,60	960
-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	6,5	938,1	10,40	940
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	7,0	369,8	4,10	310
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	7,0	351,8	3,90	290
-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	6,0	297,7	3,30	230
-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	6,2	126,3	1,40	40
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	5,8	117,3	1,30	30

* O sinal (-) indica a ausência do nutriente complexo e o sinal (+) indica a presença do nutriente na concentração de 5 g/l.

Meios contendo combinações de bacto-peptona, bacto-casitona e hidrolisado de caseína permitem a obtenção de bons resultados.

Entretanto, nem todas as combinações são adequadas, conforme indicam alguns exemplos descritos na Tabela 2, o que sugere que a produção das substâncias S₂₆₀ parece não estar relacionada com o teor de nutrientes dos meios de cultivo, mas depender particularmente de alguns componentes, como sugerem claramente as Tabelas 1 e 2.

Tabela 2 - Dados quantitativos sobre o efeito inibidor da adição de nutrientes complexos na produção das substâncias S₂₆₀ pelo *Aspergillus flavus*

Composição dos meios em nutrientes complexos*													
Ext. lev.	Ext. carne	Far. soja	Far. pept.	Bacto-pept.	Bacto-casit.	Hid. cas.	Far. amen.	Far. alg.	Água milho	pH final	A ₂₆₀ final	Produção relativa	Estímulo (%)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	90,2	1,00	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	6,5	39,7	0,44	56
-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	6,0	33,4	0,37	63
-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	6,3	23,5	0,26	74
-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	6,5	20,8	0,23	77
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6,5	18,9	0,21	79
-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	7,0	17,1	0,19	81
-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	6,3	9,9	0,11	89
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,0	0,0	0,00	100

* O sinal (-) indica a ausência do nutriente complexo e o sinal (+) indica a presença do nutriente na concentração de 5 g/l.

Observou-se, ainda, que nutrientes como farelo de amendoim, farinha de soja, água de milho e extrato de levedo são, na concentração utilizada, inibidores do processo, quando associados ou mesmo como únicos aditivos.

Utilizando-se a mistura de bacto-peptona com bacto-casitona, como aditivos de enriquecimento do meio de referência, procedeu-se ao estudo da influência da variação simultânea das concentrações dos componentes do meio de cultivo na produção das substâncias S₂₆₀. Os resultados obtidos (Tabela 3), pelas 15 melhores combinações, entre as 45 estudadas, mostram que a concentração inicial dos componentes do meio tem grande influência na produção do material S₂₆₀. A maior produção foi obtida no meio em que foram aumentadas em 50% as concentrações iniciais da sacarose, do orto-fosfato dipotássico e da bacto-peptona.

Tabela 3 - Dados quantitativos relativos à influência da concentração inicial dos componentes do meio de cultivo na produção das substâncias S₂₆₀ pelo *Aspergillus flavus*

Concentração dos componentes do meio (g/l)									
Saca-rose	Gelatina	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Bacto-peptona	Bacto-castitona	pH final	A ₂₆₀ final	Produção relativa	Estímulo (%)
75,0	5,0	0,75	0,20	7,5	5,0	5,0	3269,7	36,25	3525
50,0	7,5	0,52	0,20	5,0	5,0	5,0	1916,3	21,25	2025
50,0	5,0	0,75	0,20	5,0	5,0	6,5	1346,6	14,93	1393
50,0	5,0	0,52	0,20	5,0	5,0	6,9	1294,8	14,35	1335
50,0	2,5	0,52	0,10	5,0	2,5	5,0	1256,0	13,93	1293
75,0	5,0	0,25	0,30	5,0	2,5	4,0	1152,4	12,78	1178
50,0	5,0	0,52	0,10	2,5	2,5	4,5	1113,5	12,34	1134
75,0	5,0	0,52	0,20	5,0	5,0	6,0	971,1	10,77	977
50,0	5,0	0,52	0,20	5,0	2,5	5,0	893,4	9,90	890
50,0	5,0	0,52	0,20	5,0	7,5	4,5	828,7	9,19	819
50,0	5,0	0,52	0,10	5,0	5,0	4,0	725,1	8,04	704
50,0	7,5	0,52	0,30	5,0	7,5	6,8	686,2	7,61	661
50,0	5,0	0,25	0,20	5,0	5,0	6,0	427,3	4,74	374
50,0	5,0	0,52	0,20	7,5	5,0	4,0	310,8	3,45	245
50,0	5,0	0,52	0,30	5,0	5,0	4,0	297,8	3,30	230
50,0	5,0	0,52	0,20	-	-	3,0	90,2	1,00	-

A Figura 1 mostra os resultados obtidos ao serem determinadas as curvas de crescimento do *A. flavus* e da produção das substâncias S₂₆₀ em função do tempo de cultivo, no melhor meio complexo desenvolvido, ou seja, que contém, por litro, sacarose, 75 g; gelatina, 5 g; K₂HPO₄, 0,75 g; MgSO₄·7H₂O, 0,2 g; bacto-peptona, 7,5 g; e bacto-castitona, 5 g. Os resultados mostram que a produção e o crescimento máximos são obtidos após 144 e 216 horas de agitação, respectivamente. A mesma Figura indica também que a produção do material S₂₆₀ está diretamente relacionada com o crescimento do bolor (fase logarítmica), não se tratando de processo de degradação de ácidos nucléicos na fase decrescente.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram, em relação aos descritos no meio de referência,¹⁰ aumentos de 100% no crescimento microbiano e maior que 1.500% na produção das substâncias S₂₆₀ e, ainda, redução superior a 44% no tempo de cultivo.

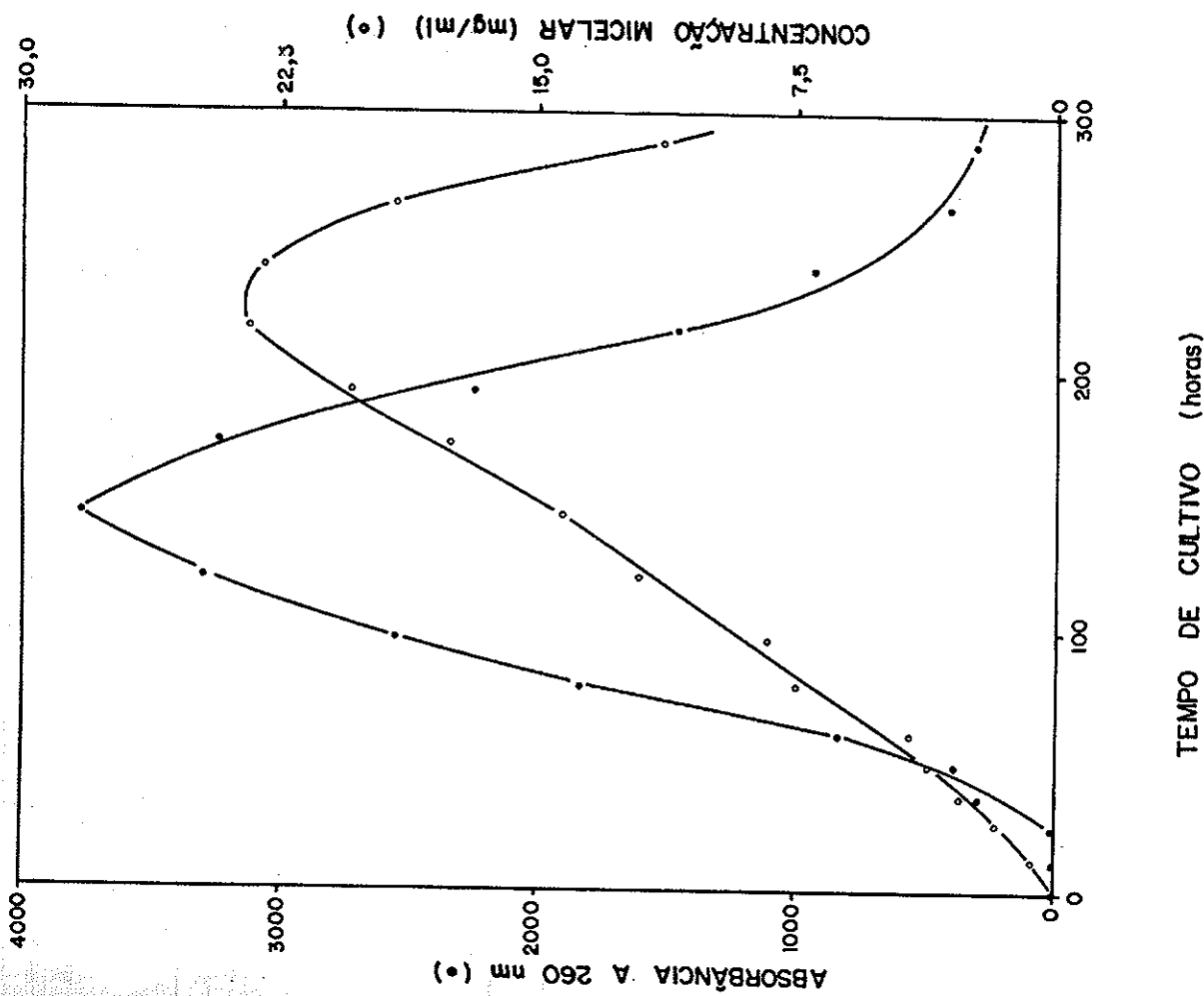


FIGURA 1 - Curvas de crescimento do *Aspergillus flavus* (•-•-•) e de produção das substâncias S₂₆₀ (◻-◻-◻), em função do tempo de cultivo, no meio enriquecido com bacto-peptona e bacto-castitona.

Análise química preliminar do material S_{260} produzido, feita por métodos clássicos, envolvendo cromatografia de troca iônica, cromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indicou, de maneira semelhante ao trabalho com *Streptomyces aureofaciens*,⁶ a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, o que será tratado em publicação posterior.

CARVALHO, A. de et al. The influence of complex nutrients on the production of nucleic acid-related substances by *Aspergillus flavus*. *Ecl. Quím.* (São Paulo), v.20, p.17-25, 1995.

■ **ABSTRACT:** The accumulation of nucleic acid-related substances, previously studied in chemically defined media, was further investigated in complex media, obtained by the addition of complex nutrients (added one by one or in combinations as enrichment nutrients) to a defined basic medium. The following materials have been used: corn steep liquor, bacto-casitone, bacto-peptone, cotton seed meal, casein hydrolysate, meat extract, peanut meal, soybean flour and yeast extract. Media with good production were obtained with meat extract, bacto-casitone, casein hydrolysate, cotton seed meal and bacto-peptone, alone or in mixtures with some of the other complex nutrients. Some of the complex nutrients studied, peanut meal, soybean flour, corn steep liquor and yeast extract, are inhibitory to the production of S_{260} substances, when used either alone or in combinations. The best medium was obtained with bacto-peptone plus bacto-casitone, with increased growth of the microorganism (100%) and with increased production of the material (1,500%). The medium giving maximal production has the following composition, per liter: sucrose, 75 g; gelatin, 5 g; K_2HPO_4 , 0.75 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; bacto-peptone, 7.5 g; and bacto-casitone, 5 g. Here also the process was found highly dependent of the microorganism growth suggesting an active secretion, rather than preformed nucleic acid hydrolysis in the decline phase, as mechanism of the accumulation of the nucleic acid-related compounds.

■ **KEYWORDS:** *Aspergillus flavus*; nucleic acid-related substances; UV light absorbing substances; complex nutrients.

Referências bibliográficas

- 1 BENDICH, A. In: COLOWICK, S. P. KAPLAN, N. O. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1957. v.3, cap.5.
- 2 CARVALHO, A. Produção de substâncias, que absorvem no ultravioleta, por fermentação microbiana: estudos da nutrição e condições de cultivo para produção máxima. Araraquara, 1982. 213p. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- 3 CARVALHO, A., FARIA, C. R., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.3, p.55-67, 1978.
- 4 CARVALHO, A. et al. *Ecl. Quím.*, v.18, p.7-18, 1993.
- 5 CARVALHO, A., LORENZETTI, L. L., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.16, p.81-5, 1991.
- 6 CARVALHO, A., MOLINARI, R. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.46, p.762-4, 1983.
- 7 _____. *Rev. Bras. Tecnol.*, v.7, p.289-96, 1976.
- 8 CARVALHO, A., OLIVEIRA, P. L. C., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.2, p.47-60, 1977.
- 9 CARVALHO, A., REBOLLA, E. A., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.6, p.21-8, 1981.

10 CARVALHO, A., RIBEIRO, F. C., JARDIM JÚNIOR, O., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.19, p.49-55, 1994.

11 CARVALHO, A., ROSIM, R. C., MOLINARI, R. *Rev. Microbiol.*, v.18, p.269-75, 1987.

12 CARVALHO, A., SANTIAGO, I. S. T., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.14, p.1-8, 1989.

13 _____. *Rev. Microbiol.*, v.20, p.327-32, 1989.

14 CARVALHO, A., SITA, W., MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, v.5, p.63-70, 1980.

15 CHERMENSKI, D. N. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, v.9, p.236-9, 1973.

16 DEMAIN, A. L. et al. *Appl. Microbiol.*, v.14, p.821-5, 1966.

17 FURUYA, A. *Hakko Kogaku Zasshi*, v.52, p.461-7, 1974.

18 KOTANI, Y. et al. *Agric. Biol. Chem.*, v.42, p.399-405, 1978.

19 MISAWA, M., NARA, T., KINOSHITA, S. *Agric. Biol. Chem.*, v.34, p.617-26, 1970.

20 SCHWARTZ, J., MARGALITH, P. *Biotechnol. Bioeng.*, v.15, p.85-91, 1973.

21 SIMUTH, J., ZELINKA, J. *J. Antibiot.* v.23, p.242-9, 1970.

Recebido em 15.6.1994.

Aceito em 13.9.1994.