

ESTUDOS DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR *Aspergillus nidulans*

Alirio de CARVALHO*
Lilian de Lourdes LORENCETTI**
Olympio JARDIM JUNIOR**
Rubens MOLINARI*

■ **RESUMO:** Estudaram-se as necessidades nutricionais e as condições de cultivo para o crescimento microbiano e para produção e acúmulo de substâncias que absorvem luz ultravioleta (metabólitos secundários) pelo *A. nidulans*. Entre os vários meios utilizados, verificou-se que, usando-se sacarose como fonte de carbono e de energia, várias substâncias servem como fonte de nitrogênio para a produção do material S₂₆₀, destacando-se, entre as estudadas, a uréia, o nitrato de potássio, o L-aspartato de potássio e a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato. Para o crescimento do microrganismo, observou-se que, com exceção da trietanolamina, as substâncias usadas servem como fonte de nitrogênio, destacando-se entre elas o sulfato de amônio, isoladamente ou em mistura com L-aspartato. Os resultados mostram também que a concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção do material que absorve luz ultravioleta e que, dentro das concentrações usadas, há um aumento na produção das substâncias ao aumentar-se a concentração inicial do ortofosfato de potássio até 4,5 mM, diminuindo a seguir para maiores concentrações deste sal. Ao serem estudadas as condições de cultivo, verificou-se que as maiores produções do material ocorrem ao serem utilizados frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 40 ml de meio e 1 ml de inóculo, em experimentos de 264 horas de agitação (250 rpm e 30°C). Verificou-se, pelas curvas de crescimento do *A. nidulans* e de produção das substâncias em estudo, que o acúmulo do material nos caldos de cultura 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. Análise cromatográfica preliminar do caldo de cultura indicou a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, como será visto em publicação posterior.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus nidulans*; metabólitos secundários; substâncias que absorvem luz ultravioleta.

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

** Alunos de Iniciação à Pesquisa Científica - Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação - Instituto de Química - UNESP - 14800-900 - Araraquara - SP - Brasil.

Alguns microrganismos secretam nos meios de cultura várias substâncias que absorvem na região ultravioleta do espectro da luz e que apresentam absorvância máxima, em comprimentos de onda, próxima a 260 nm. Entre elas, estão substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, tais como bases nitrogenadas, nucleosídeos e nucleotídeos. A este material deu-se a denominação inespecífica de "substâncias S_{260} ", e desde a publicação do primeiro trabalho encontrado na literatura, de Magasanik & Brooke,¹⁸ a produção microbiana destas substâncias tem despertado muito interesse, em virtude de algumas delas terem sido identificadas como potentes estimuladoras do sabor dos alimentos, como, por exemplo, a guanosina-5'-monofosfato (GMP), a isonina-5'-monofosfato (IMP) e a xantosina-5'-monofosfato (XMP), tornando a bibliografia pertinente bastante extensa: Carvalho & Molinari,⁵ Chermenskii,¹² Demain et al.,¹³ Furuya,¹⁴ Hara & Ueda,¹⁵ Kotani et al.,¹⁶ e Schwartz & Margalith,¹⁹ entre outros. Em trabalhos anteriores (Carvalho et al.^{3,6-11}), comparamos a produção destas substâncias por bactéria e vários bolores dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, tendo-se verificado que, entre os microrganismos utilizados, os *Aspergillus* são, em geral, melhores produtores.

O objetivo deste trabalho foi o de aprofundar nossos estudos com o *Aspergillus nidulans*, um dos bolores que havia se mostrado como dos mais promissores para a produção do material que consideramos metabólitos secundários, por serem muito provavelmente formados do desvio metabólico a partir do metabolismo primário principal, podendo-se inclusive manipular nutricionalmente este metabolismo secundário.¹⁷

Foram feitos estudos das necessidades nutricionais para o crescimento adequado do microrganismo e para a produção máxima das substâncias citadas, utilizando-se para isso de meios de cultivo quimicamente definidos.

Material e métodos

Meio para preparação do inóculo. A composição deste meio era, por litro, a seguinte: 15 g de sacarose; 1,98 g (15 mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,30 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 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 g de ágar para a solidificação do meio.

Inóculo. Foi preparada uma suspensão de esporos da cultura do *Aspergillus nidulans* pela adição de 10 ml de água destilada esterilizada a um tubo de cultura na forma de ágar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio com uma espátula esterilizada.

A seguir foram inoculados sete frascos de Roux contendo 200 ml do meio já indicado, com 2 ml cada da suspensão de esporos, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio sólido. Os frascos foram deixados a temperatura ambiente durante dez dias.

Foram adicionados, então, 150 ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi preparada da forma já descrita. A suspensão obtida foi assepticamente homogeneizada em liquidificador de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 10 a 30 ml, para frascos estéreis de 50 ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, os frascos foram mantidos em câmara fria até serem usados.

Meio de referência. A composição do meio de referência empregado no estudo das fontes de nitrogênio 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 e 0,2 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Esterilização dos meios de cultivo e outros materiais. A esterilização foi feita por aquecimento em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 121°C durante vinte minutos. A fonte de carbono era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio.

O pH dos meios era ajustado, após a esterilização, 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.

Técnicas de fermentação. O processo empregado para permitir o crescimento do microrganismo em condições de produzir as substâncias que absorvem no ultravioleta (S_{260}) 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 30 ml de meio nutriente e 1,0 ml de inóculo, colocados na mesa agitadora, onde descreviam círculos de aproximadamente 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 o mínimo possível, para carga e descarga do aparelho, a fim de manter oxigenação contínua ao microrganismo em desenvolvimento.

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 S_{260} foi determinada pela absorvância (A_{260}), medida a 260 nm, do caldo de cultura filtrado. Foram feitas correções nos valores obtidos em função da absorvância do meio nutriente esterilizado ("Branco") e do volume final do caldo de cultura em relação ao volume inicial de meio de cultivo. Tais correções são necessárias para permitir a correta comparação de resultados dentro de uma mesma experiência e entre experiências diferentes, visto

ser normal a perda de água no processo de cultivo. Determinou-se também o pH do filtrado.

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

O crescimento microbiano foi avaliado pela determinação da massa micelar do microrganismo 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 quinze horas.

Os resultados, média dos pares, são apresentados como micélio por mililitro de caldo de cultura (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.

Resultado e discussão

Resultado

Fonte de nitrogênio. A Tabela 1 contém os resultados obtidos ao se substituir o sulfato de amônio, no meio de referência, por outras fontes de nitrogênio, usando-se sacarose como fonte de carbono, conforme Carvalho.²

Os resultados indicam que para a produção do material S_{260} a melhor fonte de nitrogênio, entre as estudadas, é a uréia, seguindo-se o nitrato de potássio, o L-aspartato de potássio e a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato.

Para o crescimento do *A. nidulans* observamos que, com exceção da trietanolamina, as substâncias usadas, isoladamente ou em misturas, servem como fonte de nitrogênio, destacando-se a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato, o sulfato de amônio, o L-aspartato de potássio e a glicina.

A trietanolamina é má fonte de nitrogênio também para a produção do material S_{260} , e a mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio, embora sirva para o crescimento microbiano, é ineficiente para a produção do material.

A adição de carbonato de cálcio ao sulfato de amônio provoca redução de 49,4% no crescimento microbiano e de 57,8% na produção do material S_{260} , quando comparados com os resultados obtidos no meio de referência.

Tabela 1 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção das substâncias S_{260} e no crescimento do *Aspergillus nidulans*, usando-se sacarose como fonte de carbono

Fontes de nitrogênio	pH final	A_{260} final (U/ml)	Concentração micelar (mg/ml)
Uréia (30 mM)	3,0	58,0	8,2
KNO ₃ (60 mM)	3,0	42,2	8,5
L-aspartato de potássio (60 mM)	4,5	27,1	13,1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (15 mM) com L-aspartato de potássio (30 mM)	3,5	11,2	16,4
Glicina (60 mM)	4,7	8,2	12,7
Sulfato de amônio (30 mM)	2,1	7,1	15,8
Gelatina (5 g/l)	3,5	4,2	10,6
Sem fonte de nitrogênio	5,8	3,5	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30 mM) com CaCO ₃ (4 g/l)	3,6	3,0	8,0
Trietanolamina (60 mM)	4,7	0,8	2,2

Influência da concentração da fonte de fósforo. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 2 e mostram que, dentro das concentrações usadas, há aumento na produção das substâncias S_{260} ao se aumentar a concentração inicial do ortofosfato até 4,5 mM, diminuindo a seguir para maiores concentrações de ortofosfato.

Tabela 2 - Efeito da concentração da fonte de fósforo na produção das substâncias S_{260} e no crescimento do *Aspergillus nidulans*

K_2HPO_4 (mM)	K_2SO_4 (mM)	pH final	A_{260} final (U/ml)	A_{260}	
				Concentração micelar (mg/ml)	Concentração micelar (U/mg)
0,0	10,0	4,0	1,0	7,6	0,1
0,5	9,5	3,2	33,7	7,0	4,8
1,5	8,5	3,3	49,9	7,0	7,1
3,0	7,0	3,3	60,9	6,4	9,5
4,5	5,5	3,5	70,7	7,2	9,8
6,0	4,0	3,5	63,3	7,0	9,1
7,5	2,5	3,4	55,1	6,6	8,3
9,0	1,0	3,5	41,5	7,0	5,9
10,0	0,0	3,7	22,1	7,6	2,9
7,5	0,0	3,6	58,1	6,8	8,5

Com relação ao crescimento do microrganismo observa-se que, no intervalo estudado, a concentração inicial do ortofosfato não afeta significativamente o desenvolvimento do *A. nidulans*.

Podemos destacar também que para o ortofosfato na concentração 7,5 mM a concentração de potássio parece já ser adequada, uma vez que não houve variação significativa no crescimento ou na produção ao aumentar-se a concentração inicial deste cátion.

Nesta experiência, a concentração de potássio foi mantida constante pela adição de sulfato de potássio.

Influência do volume de meio nutriente. Ao se estudar a influência do volume de meio na produção das substâncias S_{260} e no crescimento microbiano (Tabela 3), os resultados obtidos mostram que, entre os volumes de meio utilizados, obtém-se maior crescimento microbiano e maior produção do material S_{260} com os volumes de 10 ml e 40 ml, respectivamente.

Tabela 3 - Influência do volume inicial de meio na produção do material S_{260} e no crescimento do *Aspergillus nidulans*

Volume inicial de meio (ml)	pH final	A_{260} final (U/ml)	Concentração micelar (mg/ml)
10	3,6	58,2	8,9
20	3,1	65,4	7,5
25	3,0	72,3	7,2
30	3,0	70,9	7,2
35	3,0	70,9	7,8
40	2,9	75,3	6,6
50	2,9	72,6	6,9
55	2,9	69,4	7,2

Inóculo: Todos os frascos receberam 1 ml da suspensão de esporos da espécie utilizada.

Influência do volume de inóculo. Verificou-se que, entre os volumes de inóculo utilizados, obtém-se maior crescimento do *A. nidulans* e maior produção do material S_{260} com os volumes de 2,5 ml e 1,0 ml, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Influência do volume de inóculo na produção do material S_{260} e no crescimento do *Aspergillus nidulans*

Volume de inóculo (ml)	pH final	A_{260} final (U/ml)	Concentração micelar (mg/ml)
0,4	3,2	54,7	7,5
0,6	3,2	64,4	6,6
1,0	3,3	75,1	6,6
1,8	3,4	65,9	7,5
2,5	3,5	56,6	9,2
3,0	3,5	46,5	8,6

Volume de meio: Todos os frascos continham 40 ml de meio de cultivo, e as diferenças nos volumes de inóculo eram compensadas com água destilada esterilizada.

Curvas de produção e crescimento. A Figura 1 mostra as curvas de produção das substâncias S_{260} e de crescimento do *A. nidulans* no meio e condições desenhadas, ou seja, no meio de cultivo contendo por litro: 50 g de sacarose; 1,802 g (30 mM) de uréia; 0,784 g (4,5 mM) de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e usando-se 40 ml de meio nutriente e 1,0 ml de inóculo por frasco, em função do tempo de agitação. Os resultados obtidos indicam que o crescimento máximo do bolor e a produção máxima das substâncias S_{260} são obtidos com 168 e 264 horas de agitação, respectivamente, com aumentos de 4,5% no crescimento e de 90,3% na produção, quando comparados com os valores obtidos em experimentos de 170 horas de agitação.

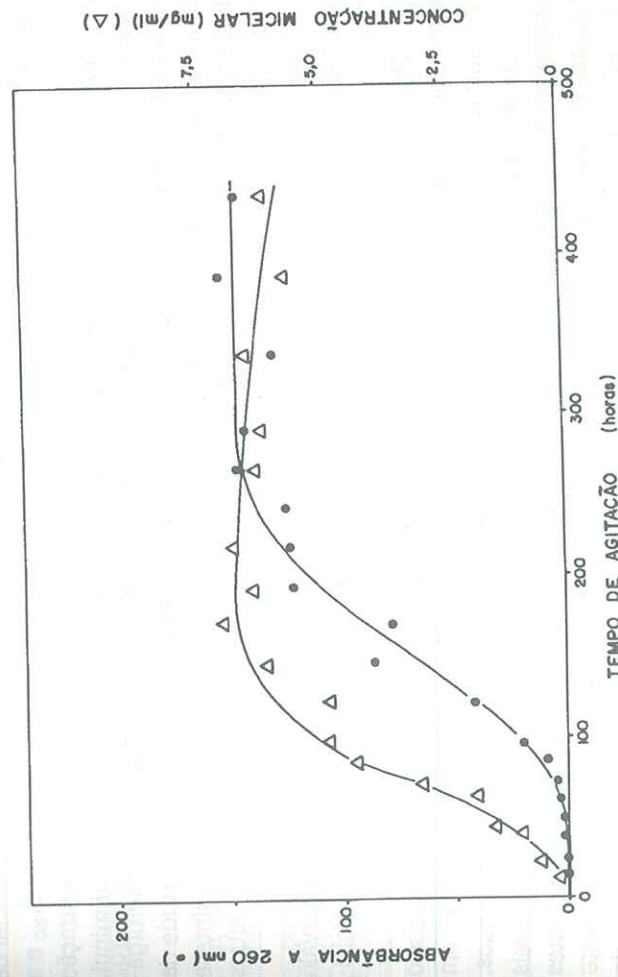


FIGURA 1 - Curvas de crescimento do *Aspergillus nidulans* e de produção das substâncias S_{260} em função do tempo de agitação, no meio nutriente desenvolvido e condições estudadas.

Neste trabalho foram desenvolvidos meios de cultivo, quimicamente definidos, que proporcionassem máximo crescimento ao microrganismo e, simultaneamente, máxima produção das substâncias S_{260} .

Entre os meios estudados, o melhor apresenta, por litro, a seguinte composição: 50 g de sacarose, 1,802 g (30 mM) de uréia, 0,784 g (4,5 mM) de K_2HPO_4 e 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Neste meio obtém-se crescimento máximo de 6,9 mg/ml e produção máxima de 142,9 unidades S_{260} por mililitro de caldo fermentado, após 168 horas e 264 horas de agitação, respectivamente.

As melhores fontes de nitrogênio para a produção das substâncias S_{260} , usando-se sacarose como fonte de carbono, são: uréia, nitrato de potássio, L-aspartato de potássio, mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio, glicina e sulfato de amônio.

Para o crescimento do *A. nidulans* as melhores fontes de nitrogênio, quando se usa sacarose como fonte de carbono, são: mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio, sulfato de amônio, L-aspartato de potássio, glicina, gelatina, nitrato de potássio, uréia e mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio.

Empregando-se meio nutriente contendo sacarose e uréia, constatou-se que a concentração inicial de ortofosfato é fundamental para a produção das substâncias em estudo, e esta é máxima na presença de 4,5 mM deste sal.

Os resultados obtidos mostram que, ao se aumentar a concentração inicial de ortofosfato, aumenta progressivamente a produção específica, razão entre a A_{260} e a concentração micelar, indicando maior produção do material S_{260} até a concentração indicada. Para maiores concentrações de ortofosfato a produção específica diminui, indicando que, em meios contendo baixas concentrações de ortofosfato, o microrganismo secreta para o meio de cultura precursores de ácidos nucléicos em virtude da falta de fosfato para a produção de nucleosídeos trifosfatos, necessários à síntese destas macromoléculas. O mesmo já havia sido observado anteriormente para outros microrganismos, conforme Carvalho & Molinari⁴ e Carvalho et al.^{3,7,8}

Com relação ao crescimento do *A. nidulans*, observou-se que, no intervalo estudado, a concentração de ortofosfato não afeta significativamente o desenvolvimento deste bolor.

Observou-se que, para produção das S_{260} e crescimento do *A. nidulans*, o potássio introduzido na fonte de fósforo e o enxofre introduzido no magnésio já estão em concentração suficiente, pois a adição de sulfato de potássio não altera os resultados.

Os resultados mostram que os volumes de meio e de inóculo são variáveis interdependentes e que a produção do material S_{260} depende da relação entre estes volumes e é máxima, nas condições e relações usadas, para 40 ml de meio nutriente e 1,0 ml de inóculo de *A. nidulans*. A diminuição da produção para volumes de meio acima do volume ótimo indica a dependência do processo da aeração, que é função, neste caso, do volume de líquido no frasco.

Confirmando resultados anteriores, obtidos com o *Streptomyces aureofaciens* (Carvalho & Molinari⁴), com o *Aspergillus niger* (Carvalho et al.³) e com o *Aspergillus amstelodami* (Carvalho et al.⁷), a Figura 1 mostra que o crescimento do *A. nidulans* e o acúmulo das substâncias S_{260} no caldo fermentado são também processos simultâneos em todas as fases do desenvolvimento deste bolor. Isso implica que a produção do material está diretamente relacionada à atividade microbiana, não se tratando de processo de degradação de ácidos nucléicos na fase decrescente, conforme descrito por Simuth & Zelinka²⁰ para o *Streptomyces aureofaciens*. O fato de a produção das substâncias S_{260} ser processo aeróbio pode ser visto também como outra indicação contrária à hipótese de hidrólise de ácidos nucléicos, processo este que não depende de oxigênio, e, sim, de desvio metabólico ativo que pode ser nutricionalmente manipulado — daí estas substâncias terem sido denominadas metabólitos secundários.¹⁷

No melhor meio, quimicamente definido, e em condições desenvolvidas, obteve-se aumento de 2029,6% na produção das substâncias S_{260} , porém, redução de 57% no crescimento do *A. nidulans*, em relação à produção e crescimento no meio e em condições iniciais.

Análise preliminar do caldo fermentado, por cromatografia de troca iônica, cromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indica, de maneira semelhante ao trabalho com *Streptomyces aureofaciens*, segundo Carvalho & Molinari,⁵ a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucléicos, como será visto em publicação posterior.

Conclusão

1. A produção das substâncias relacionadas a ácidos nucléicos está diretamente relacionada com a atividade microbiana, não se tratando de processo de degradação de ácidos nucléicos na fase decrescente.
2. A concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção do material S_{260} .
3. O *A. nidulans* supostamente secreta para o meio de cultura precursores de ácidos nucléicos em virtude da falta de fosfato para a produção de nucleosídeos trifosfatos, necessários à síntese destas macromoléculas.

■ **ABSTRACT:** An investigation was carried out in order to discover the nutritional requirements and conditions of cultivation for microbial growth, production, and accumulation of substances which absorb ultraviolet light (secondary metabolites) through *A. nidulans*. Using sucrose as a carbon source, several assimilable nitrogen compounds were suitable for both growth and substances accumulation, among which were urea, potassium nitrate, potassium L-aspartate, and ammonium sulfate plus potassium L-aspartate. The S_{280} production level is dependent on the medium composition where phosphate concentration seems to be the most important factor involved in increasing the production of substances; a 4.5 mM concentration of phosphate is the most efficient for maximum accumulation. Higher S_{280} productions are obtained using 125 ml Erlenmeyer flasks, containing 40 ml of fermentation medium inoculated with 1 ml of inoculum culture, in experiments involving 264 hours fermentation (250 rpm; 30°C). The accumulation of substances in the growth medium is a process closely related to the microbial activity in all growth phases, and proves to be an active metabolic deviation, not a process linked to the degradation of pre-formed nucleic acid in the decline phase. In the present work this deviation was nutritionally manipulated with the object of attaining an adequate culture medium for maximum accumulation of the secreted material, i.e. secondary metabolites. Preliminary chromatographic analysis of the culture filtrate indicated the presence of nucleic acid-related substances in the complex composition, as will be shown in a forthcoming paper.

■ **KEYWORDS:** *Aspergillus nidulans*; secondary metabolites; ultra-violet light absorbing substances.

Referências bibliográficas

1. BENDICH, A. Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In: COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1957. v. 3, p. 715.
2. CARVALHO, A. de. *Produção de substâncias, que absorvem no ultravioleta, por fermentação microbiana: estudos da nutrição e condições de cultivo para produção máxima*. Araraquara, 1982. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
3. CARVALHO, A. de, FARIA, C. R., MOLINARI, R. Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios quimicamente definidos. *Ecl. Quím.*, v. 3, p. 55, 1978.
4. CARVALHO, A. de, MOLINARI, R. Production of nucleic acid-related substances by *Streptomyces aureofaciens*. *Rev. Bras. Tecnol.*, v. 7, p. 289, 1976.
5. ———. Identification of low-molecular-weight nucleic acid-related substances secreted by *Streptomyces aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 46, p. 762, 1983.
6. CARVALHO, A. de, OLIVEIRA, P. L. C., MOLINARI, R. Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Streptomyces aureofaciens* em meios complexos. *Ecl. Quím.*, v. 2, p. 47, 1977.
7. CARVALHO, A. de, REBOLLA, E. A., MOLINARI, R. Estudo da nutrição e produção de substâncias que absorvem no UV por fermentação com *Aspergillus amstelodami*. *Ecl. Quím.*, v. 6, p. 21, 1981.

8. CARVALHO, A. de, ROSIM, R. C., MOLINARI, R. Estudo da nutrição e produção de substâncias que absorvem no ultravioleta por *Aspergillus ochraceus*. *Rev. Microbiol.*, v. 18, p. 269, 1987.
9. CARVALHO, A. de, SANTIAGO, I. S. T., MOLINARI, R. Seleção de microrganismos e estudos da produção de substâncias que absorvem no ultravioleta por *Aspergillus oryzae*. *Ecl. Quím.*, v. 14, p. 1, 1989.
10. ———. Produção de substâncias que absorvem luz ultravioleta por *Aspergillus oryzae* em meios complexos. *Rev. Microbiol.*, v. 20, p. 327, 1989.
11. CARVALHO, A. de, SITA, W., MOLINARI, R. Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios complexos. *Ecl. Quím.*, v. 5, p. 63, 1980.
12. CHERMENSKI, D. N. Nucleotides of the culture liquid filtrate of the fungus *Penicillium sizova*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, v. 9, p. 236, 1973.
13. DEMAIN, A. L., JACKSON, M., VITALLI, R. A., HENDLIN, D., JACOB, T. A. Production of guanosine 5'-monophosphate and inosine 5'-monophosphate by fermentation. *Appl. Microbiol.*, v. 14, p. 821, 1966.
14. FURUYA, A. Annual review of fermentation technology, Japan, 1973: nucleic acids and related substances. *Hakko Kagaku Zasshi*, v. 52, p. 461, 1974.
15. HARA, T., UEDA, S. Studies on nucleic acid production and application. II - A further study of extracellular DNA production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Biochem.*, v. 3, p. 11, 1981.
16. KOTANI, Y., YAMAGUCHI, K., KATO, F., FURUYA, A. Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes: inosine accumulation by mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*, strain improvement and culture conditions. *Agric. Biol. Chem.*, v. 42, p. 399, 1978.
17. LIMA, U. A., AOUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia, tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blucher, 1975, v. 1, p. 45.
18. MAGASANIK, B., BROOKE, M. The accumulation of xanthosine by a guanineless mutant of *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.*, v. 206, p. 83, 1954.
19. SCHWARTZ, J., MARGALITH, P. Binding of end product in the fermentation of nucleotides. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 15, p. 85, 1973.
20. SIMUTH, J., ZELINKA, J. Nucleic acid degradation products of *Streptomyces aureofaciens*. *J. Antibiot.*, v. 23, p. 242, 1970.

Recebido em 25.8.1993.
Aceito em 13.1.1994.