

SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS E ESTUDO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE ABSORVEM NO ULTRAVIOLETA, POR *ASPERGILLUS ORYZAE*

Alfrio de CARVALHO*
Ivanildes da Silveira Torres SANTIAGO*
Rubens MOLINARI*

RESUMO: Os resultados obtidos, ao se comparar a produção destas substâncias por vários bolores dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, mostraram que, entre as espécies estudadas, as mais produtivas são o *A. oryzae*, *A. nidulans* e o *A. ochraceus*. Tendo-se selecionado o *A. oryzae*, verificou-se, através das curvas de crescimento e produção, que o acúmulo do material nos meios de cultura é um processo diretamente relacionado ao crescimento microbiano e, pelo emprego de meios quimicamente definidos, foram estudadas as necessidades nutricionais para o crescimento do *A. oryzae* e para a produção das substâncias. Usando-se sacarose como fonte de carbono, observou-se que as melhores fontes de nitrogênio são o sulfato de amônio, o nitrato de potássio e o L-aspartato de potássio. Constatou-se também que a concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção das substâncias em estudo (*S₂₆₀*) e que, na composição dos meios nutrientes, a concentração do ortofosfato parece ser o fator mais importante e que mais afeta o acúmulo do material *D₂₆₀* no caldo de cultura.

UNITERMOS: *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus nidulans*; *Aspergillus ochraceus*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus amstelodami*; *Penicillium citrinum*; substâncias que absorvem no ultravioleta.

INTRODUÇÃO

Desde a publicação do primeiro trabalho que encontramos na literatura¹, a produção microbiana de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos (*S₂₆₀*) tem despertado bastante interesse, tornando a bibliografia pertinente bastante extensa^{2 a 8}.

* Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação – Instituto de Química – UNESP – 14800 – Araraquara – SP.

Em nossos laboratórios pesquisamos o assunto já há algum tempo, tendo trabalhado tanto com bactérias^{2 e 9 a 11} quanto com bolores^{12 a 15}.

O objetivo deste trabalho foi estender nossos estudos ao *Aspergillus oryzae*, com a finalidade de obter informações que possibilitem, no futuro, melhor conhecimento da fisiologia deste bolor e os motivos que levam o microorganismo à produção e ao acúmulo destas substâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio para preparação do inóculo – Este meio continha, por litro, glicose 40g, peptonina 10g, agar 20g e pH 6,5. A água utilizada na preparação dos meios foi sempre água destilada.

Meio básico (sem fonte de carbono) – A composição do meio básico empregado neste trabalho era, por litro, a seguinte: 3,96g (30mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,306g (7,5mM) de K_2HPO_4 ; 0,2g 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 5mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Os métodos utilizados para a esterilização dos meios de cultivo e outros materiais (autoclave), para a preparação dos inóculos (suspensão de esporos), para o cultivo dos bolores e para a quantificação do material produzido, em analogia com o sistema utilizado por Bendich¹⁶, já foram descritos em trabalho anterior¹⁵.

RESULTADOS

Seleção de microrganismos – Os resultados obtidos, ao se comparar a produção das substâncias que absorvem no UV (S_{260}) por vários bolores dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, estão indicados na Tabela 1 e mostram que, entre as espécies empregadas, as mais promissoras são o *A. oryzae*, o *A. nidulans* e o *A. ochraceus*. Assim, o microrganismo escolhido e empregado neste trabalho foi o *A. oryzae*.

Influência do tempo de agitação no crescimento do microrganismo e produção das substâncias S_{260} – A Figura 1 mostra que a produção do material, que absorve no ultravioleta, no meio básico mais D-glicose (50g/l) como fonte de carbono e energia, é um processo em que o crescimento do *A. oryzae* e o acúmulo do material ocorrem simultaneamente, após o que passou-se ao estudo da influência da composição do meio nutriente na produção destas substâncias.

Fonte de nitrogênio – A Tabela 2 contém os resultados obtidos ao se estudar a influência da fonte de nitrogênio na produção das S_{260} e no crescimento do *A. oryzae* quando se usa, no meio básico, sacarose como fonte de carbono¹¹ e substituiu-se o sulfato de amônio por várias outras fontes de nitrogênio.

Os resultados indicam que, para a produção do material S_{260} , a melhor fonte de nitrogênio, entre as estudadas, é o sulfato de amônio, isoladamente ou em mistura com carbonato de cálcio, seguindo-se o nitrato de potássio e as demais com menor produção.

TABELA 1 – Seleção de microrganismos para a produção de substâncias que absorvem no ultravioleta (S_{260})

Microrganismos	Tempo de agitação (horas)					
	90		183		276	
	A-260		A-260		A-260	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
<i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 692)	2,1	1,5	6,9	6,6	11,5	10,5
<i>Aspergillus nidulans</i> (IZ 1535)	2,2	1,8	7,1	6,9	7,8	8,6
<i>Aspergillus ochraceus</i> *	1,7	1,5	3,1	2,8	5,7	5,0
<i>Aspergillus flavus</i> (EPM 157)	0,8	0,4	1,6	1,4	2,3	1,9
<i>Aspergillus amstelodami</i> **	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,6
<i>Penicillium citrinum</i> (IZ 1612)	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2
<i>Penicillium italicum</i> (IZ 1584)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2
<i>Aspergillus clavatus</i> (IZ 1486)	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2
<i>Penicillium notatum</i> (IZ 1614)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1

Meio A: meio básico mais sacarose (50g/l) como fonte de carbono

Meio B: meio básico mais D-glicose (50g/l) como fonte de carbono

* cultura recebida da Laboratório Rápida-Bristol S/A

** cultura recebida da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Para o crescimento do *A. oryzae* observou-se que, com exceção da trietanolamina, as substâncias utilizadas, isoladamente ou em misturas, servem como fonte de nitrogênio, destacando-se o sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio, a gellanina e o L-aspartato de potássio.

Fonte de fósforo – Os resultados indicados na Tabela 3 foram obtidos ao se estudar a influência da concentração inicial do ortofosfato dipotássico na produção das substâncias S_{260} e no crescimento microbiano quando se usou, no meio básico, sacarose (50g/l) como fonte de carbono e energia e diferentes concentrações do ortofosfato como fonte de fósforo. A concentração de potássio foi mantida constante pela adição de sulfato de potássio.

Verifica-se pelos resultados apresentados que, dentro das concentrações empregadas, há aumento na produção das substâncias S_{260} ao aumentar-se a concentração inicial do ortofosfato até 1,5mM, decrescendo a seguir para maiores concentrações deste sal.

Com relação ao crescimento do *A. oryzae*, a análise da tabela citada nos mostra que, ao aumentar-se a concentração inicial do ortofosfato, ocorreu aumento progressivo no crescimento microbiano e a concentração 7,5mM parece ser a mais adequada para o desenvolvimento do microrganismo.

TABELA 2 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção do material S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus oryzae*, usando-se o meio básico e saccharose (50g/l) como fonte de carbono

Fontes de nitrogênio	pH final		A ₂₆₀ final		Concentração de micélio (mg/ml)	
	170 h	283 h	170 h	283 h	170 h	283 h
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30mM)	2,4	2,4	6,1	14,0	5,8	11,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (15mM) com L-aspartato de potássio (30mM)	4,3	5,2	4,2	8,9	15,1	25,4
KNO ₃ (60mM)	6,6	7,5	3,5	9,7	6,7	14,9
Uréia (30mM)	3,6	6,9	2,5	2,3	11,8	24,7
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30mM) com CaCO ₃ (4g/l)	6,9	6,1	2,0	12,5	18,9	40,5
L-aspartato de potássio (60mM)	6,0	8,5	1,9	4,4	19,7	30,5
Glicina (60mM)	3,6	7,9	1,3	2,3	10,1	17,3
Gelatina (5g/l)	4,4	6,7	0,9	1,0	21,2	34,1
Trietanolamina (60mM)	2,5	2,7	0,2	4,9	0,1	1,0
Nenhuma	3,2	3,2	0,2	0,2	0,1	0,3

& ZELINKA¹⁷, mas sim, de desvio metabólico ativo ainda não completamente esclarecido⁹. Neste trabalho esse desvio foi nutricionalmente manipulado de forma a obter-se meio nutriente adequado para produção máxima das substâncias que absorvem no UV.

Entre as fontes de nitrogênio empregadas (Tabela 2), as mais adequadas são o sulfato de amônio e o nitrato de potássio, para a produção do material; e o sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio, a gelatina e o L-aspartato de potássio, para o crescimento do bolor. Com o *A. oryzae* não observamos aumento na produção das substâncias S₂₆₀ com o uso do sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio ou em mistura com o L-aspartato de potássio, como havíamos observado anteriormente para outros microrganismos^{9, 12 e 14}.

Em relação à influência da concentração inicial de ortofosfato, verifica-se pela Tabela 3, através da "produção específica", ou seja, razão entre a produção (A₂₆₀) e o crescimento microbiano, que aumenta conforme diminui a concentração inicial de fosfato, que o *A. oryzae* secreta para o meio de cultura precursores de ácidos nucleicos devido à insuficiência de fosfato para a produção dos nucleosídeos trifosfatos, necessários à biossíntese destas macromoléculas.

No caso específico do *A. oryzae* ao se reduzir a concentração inicial de fosfato de 7,5mM para 1,5mM houve redução de 21,3% no crescimento do bolor, mas aumento de 43,8% na produção do material.

Ecl. Quím., São Paulo, 14: 1-8, 1989.

CONCENTRAÇÃO MICELAR (mg/ml) (°)

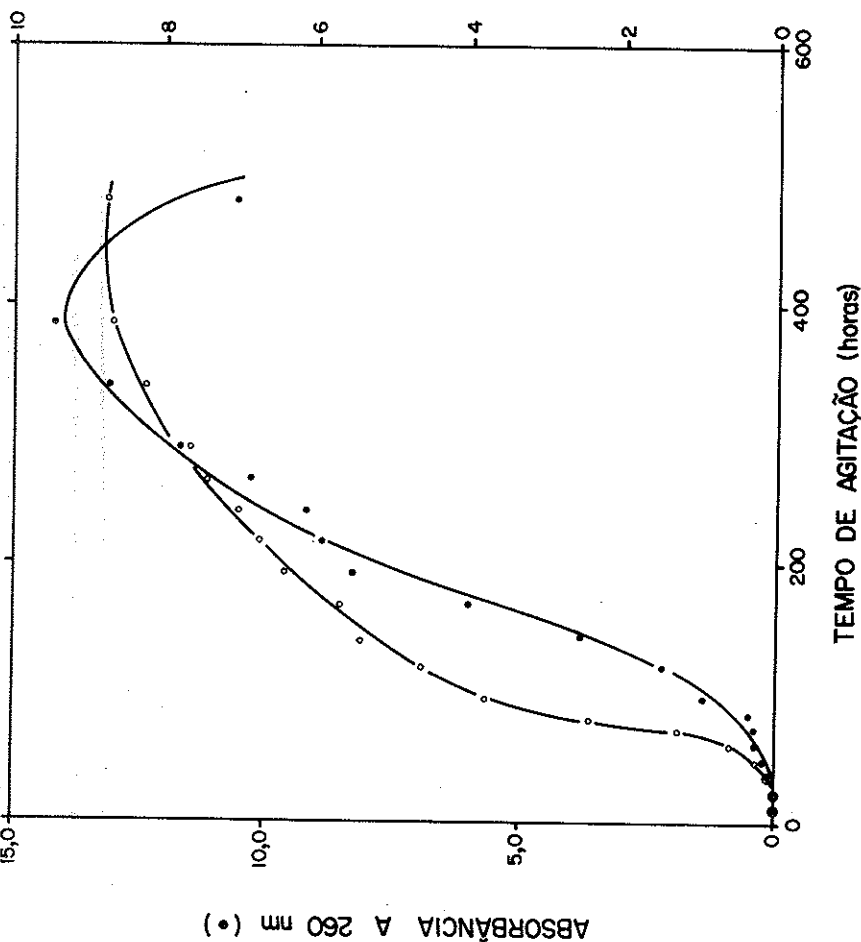


FIG.1 - Curvas de crescimento do *Aspergillus oryzae* e produção das substâncias S₂₆₀ em função do tempo de agitação, no meio básico mais glicose (50 g/l) como fonte de carbono.

DISCUSSÃO

A Tabela 1, que mostra os resultados obtidos ao ser estudada a produção das substâncias que absorvem no UV (S₂₆₀) por vários boloros dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, indica que, entre os microrganismos utilizados, os *Aspergillus* são, em geral, melhores produtores, destacando-se entre eles os *A. oryzae*, *A. nidulans* e o *A. ochraceus*.

Tendo-se selecionado o *A. oryzae* para o desenvolvimento do trabalho, verificou-se (Figura 1) que o crescimento deste microrganismo e o aparecimento das substâncias S₂₆₀ no caldo de cultura são processos simultâneos em todas as fases do desenvolvimento microbiano. Este fato confirma resultados anteriores obtidos com outros microrganismos^{9, 12, 14 e 15}, e indica que a produção do material está diretamente relacionada à atividade microbiana e não se trata de processo implicado com a degradação de ácidos nucleicos, pré-formados, na fase decrescente, como sugerem SIMUTH

Ecl. Quím., São Paulo, 14: 1-8, 1989.

TABELA 3 - Influência da concentração da fonte de fósforo na produção das substâncias S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus oryzae*

K ₂ HPO ₄ (mM)	K ₂ SO ₄ (mM)	pH final	A ₂₆₀ final	Concentração de micélio (mg/ml)	Concentração de micélio	
					A ₂₆₀	A ₂₆₀
0,0	10,0	2,3	9,4	4,7	2,0	2,0
0,5	9,5	2,2	10,2	9,1	1,1	1,1
1,5	8,5	2,2	12,8	9,6	1,3	1,3
3,0	7,0	2,3	9,1	10,5	0,9	0,9
4,5	5,5	2,2	8,4	10,7	0,8	0,8
6,0	4,0	2,3	7,9	11,0	0,7	0,7
7,5	2,5	2,2	8,6	11,7	0,7	0,7
9,0	1,0	2,3	8,5	11,8	0,7	0,7
10,0	0,0	2,2	9,3	12,0	0,8	0,8
7,5	0,0	2,2	8,9	12,2	0,7	0,7

Tempo de agitação: 170 horas

Observação: nesta experiência foi usado novo inóculo de *Aspergillus oryzae*.

À Tabela 3 mostra também que o potássio introduzido junto ao fosfato já estava na concentração necessária, pois um aumento na sua concentração inicial não influi no crescimento do microrganismo, nem na produção das substâncias S₂₆₀.

Assim, o meio de cultivo mais adequado para a produção das substâncias S₂₆₀ desenvolvido neste trabalho, apresenta, por litro, a seguinte composição: 50g de sacarose; 3,96g (30mM) de (NH₄)₂SO₄; 0,26g (1,5mM) de K₂HPO₄; 0,2g de MgSO₄·7H₂O; 10mg de ZnSO₄·7H₂O; 10mg de FeSO₄·7H₂O; 10mg de MnSO₄·H₂O e 5mg de CoSO₄·7H₂O.

A análise química preliminar dos caldos de cultura, através de cromatografia de troca-iônica, cromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indica de maneira semelhante ao trabalho com *Streptomyces aureofaciens*² a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, como será visto em publicação posterior.

CARVALHO, A. de alii - Selection of microorganisms and production of UV light absorbing substances by *Aspergillus oryzae* studies. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 14: 1-8, 1989.

ABSTRACT: The results obtained in the comparison of UV light absorbing substances production between *Aspergillus* and *Penicillium* moulds indicate that, among those studied, *A. oryzae*, *A. nidulans* and *A. ochraceus* are the best. Following the initial findings on the ability of the *A. oryzae* strain to secrete the S₂₆₀ production is a process directly related to the microbial activity in all growth phases and not a process linked to the degradation of preformed nucleic acid in the decline phase. Chemically defined media suitable for *A. oryzae* growth and UV light absorbing substances production were investigated and established. With sucrose as carbon source the most suitable nitrogen sources are: ammonium sulfate, potassium nitrate, and potassium L-aspartate. The results showed that the S₂₆₀ production level depends on medium composition where phosphate concentration seems to be the most important factor increasing the UV light absorbing substances accumulation.

KEY-WORDS: *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus nidulans*; *Aspergillus ochraceus*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus amstelodami*; *Penicillium citrinum*; UV-absorbing substances.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MAGASANIK, B. & BROOKE, M. - *J. Biol. Chem.*, 206, 83 (1954).
- CARVALHO, A. & MOLINARI, R. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 762 (1983).
- DEMAIN, A. L.; JACKSON, M.; VITALLI, R. A.; HENDLIN, D. & JACOB, T. A. - *Appl. Microbiol.*, 14, 821 (1966).
- FURUYA, A.; ARAKI, K.; NOHARA, M.; ABE, S. & KINOSHITA, S. - *Amino Acid Nucleic Acid (Japão)*, 9, 24 (1964).
- FURUYA, A. - *Hakko Kagaku Zasshi (Japão)*, 52, 461 (1974).
- MISAWA, M.; NARA, T. & KINOSHITA, S. - *Agr. Biol. Chem. (Japão)*, 34, 617 (1970).
- SCHWARTZ, J. & MARGALITH, P. - *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 85 (1973).
- SHIBAI, H.; ENEL, H. & HIROSE, Y. - *Process Biochem.*, 13, 6 (1978).
- CARVALHO, A. & MOLINARI, R. - *Rev. Bras. Tecnol.*, 7, 289 (1976).
- CARVALHO, A.; OLIVEIRA, P. L. C. & MOLINARI, R. - *Ecl. Quím.*, 2, 47 (1977).
- CARVALHO, A. - *Tese de Livre-Docência, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"*, UNESP, Araraquara, 1982.
- CARVALHO, A.; FARIA, C. R. & MOLINARI, R. - *Ecl. Quím.*, 3, 55 (1978).
- CARVALHO, A.; SITA, W. & MOLINARI, R. - *Ecl. Quím.*, 5, 63 (1980).
- CARVALHO, A.; REBOLLA, E. A. & MOLINARI, R. - *Ecl. Quím.*, 6, 21 (1981).
- CARVALHO, A.; ROSIM, R. C. & MOLINARI, R. - *Rev. Microbiol.*, 18, 269 (1987).
- BENDICH, A. - In: COLOWICK, S. P. & Kaplan, N. O. - *Methods in enzymology*, vol III Academic Press, New York, 1957, Cap. V.
- SIMUMUTH, J. & ZELINKA, J. - *J. Antibiot.*, 23, 242 (1970).

Recebido em 19.01.89
Aceito em 23.05.89