

PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS A ÁCIDOS NUCLEICOS POR  
*STREPTOMYCES AUREOFACIENS* EM MEIOS COMPLEXOS.

A. de Carvalho, P. L. Corrêa de Oliveira e  
R. Molinari  
Instituto de Química, UNESP, Araraquara, São  
Paulo, Brasil.

RESUMO

Estudou-se a produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos pelo *Streptomyces aureofaciens* em meio de cultura quimicamente definido enriquecido com os nutrientes complexos: extrato de carne, extrato de levedo, farinha de soja, farelo de amendoim, hidrolisado de caseína, bacto-peptona e bacto-casitona, adicionados isoladamente e em combinações variadas.

Os melhores meios foram obtidos com as combinações envolvendo farinha de soja associada a outros nutrientes e meios contendo farelo de amendoim isoladamente ou associado a outros.

Os melhores resultados decorreram da escolha de inóculo adequado e do ajuste da melhor concentração de farelo de amendoim, quando a produção básica original foi pouco mais que quadruplicada.

ABSTRACT

The production of nucleic acid-related substances by *Streptomyces aureofaciens* was further studied by the ad-

dition of the following complex nutrients: meat extract, yeast extract, soybean flour, peanut meal, casein hydrolysate, Bacto-Peptone and Bacto-Casitone to a chemically defined culture medium previously established.

The best media were obtained by mixtures containing soybean flour and media having peanut meal either as the only addition or in combination with other nutrients.

The best results were obtained by the selection of the most adequate inoculum and by the adjustment of the optimal concentration of peanut meal as the only complex nutrient. Under these conditions the original basic production was increased a little more than four-fold.

#### INTRODUÇÃO

A produção microbiana de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos tem sido intensivamente investigada. (1-7)

CARVALHO & MOLINARI (8) verificaram que o *Streptomyces aureofaciens*, quando cultivado em meios quimicamente definidos, levava ao acúmulo, nos caldos fermentados, de nucleosídeos e bases nucleicas; estudaram também as condições de cultivo para a produção máxima destas substâncias.

O objetivo deste trabalho foi estudar a adição de nutrientes complexos ao meio básico, quimicamente definido, e o efeito na produção das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos. Foi também estudada a influência do inóculo na produção do referido material.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

##### Meio básico

A composição do meio básico quimicamente definido foi, por litro, a seguinte: 50g de sacarose, 8,5g de gelatina, 0,226g de  $K_2HPO_4$ , 0,2g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10mg de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10mg de  $MnSO_4 \cdot H_2O$  e 5 mg de  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ .

##### Inóculo

Uma amostra da cultura (*Streptomyces aureofaciens*, linhagem NRRL-B-1286) foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 250ml contendo 40ml do meio básico e agitada durante 25 horas a 30°C em uma máquina agitadora (250rpm; círculos com 3 cm de diâmetro). A cultura foi assepticamente homogeneizada em

liquidificador de copo de alumínio, estéril, e imediatamente usada para o preparo de grandes volumes de inóculo (2 ml de cultura por frasco de Erlenmeyer de 250 ml contendo 40 ml de meio e deixando-se crescer de maneira semelhante durante 40 horas).

O inóculo obtido pela reunião do conteúdo de todos os frascos foi também homogeneizado como descrito acima e aspticamente transferido, em porções de 30 ml, para frascos estéreis de 50 ml. Após fechamento dos mesmos com tampa de borraça 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 realização deste trabalho envolveu a preparação de 4 culturas-inóculos, ou simplesmente inóculos, todas derivadas da linhagem microbiana citada. A figura 1 mostra esquematicamente as relações entre elas.

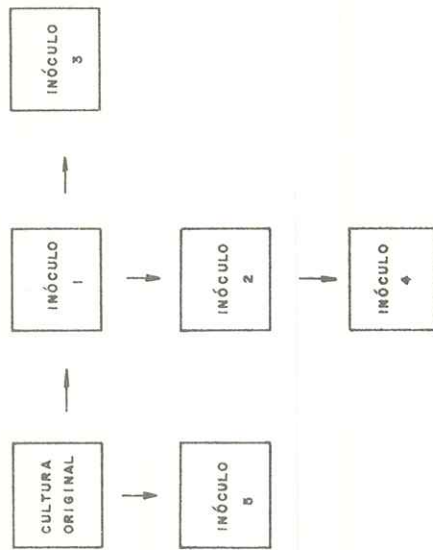


FIG. 1 - RELAÇÕES ENTRE OS INÓCULOS

#### Esterilização dos meios de cultura

A esterilização dos meios foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 120°C durante 20 minutos.

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 se obter 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. Utilizou-se frascos de 125ml, contendo 35ml de meio de cultura e 1,2ml de inóculo, colocados na plataforma oscilante da máquina agitadora, onde descreviam círculos de 3cm de diâmetro na velocidade de 250 rotações por minuto.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 0,5cm, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C.

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

Método analítico para a quantificação das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos

A produção das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos ( $S_{260}$ ) foi determinada pela densidade ótica, arbitrariamente medida a 260nm, do caldo fermentado filtrado ( $A_{260}$ ). Foram feitas correções nos valores obtidos em função da densidade ótica do caldo de cultura esterilizado ("Branco"), da contribuição do inóculo e do volume final do caldo fermentado em relação ao volume inicial (35ml).

Por analogia com o sistema utilizado por BENDICH (9) 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 ótica a 260 nm é 1,0, medida em cuba de 1 cm.

#### RESULTADOS

Os meios de cultura foram ensaiados pela adição, ao meio básico, dos nutrientes complexos, isoladamente e em combinações variadas, em experiências de 170 horas.

Os resultados obtidos, pelas dez melhores combinações entre as 54 estudadas, estão descritos na Tabela I.

A Tabela I mostra que a produção do material ( $S_{260}$ ) pode ser duplicada pela adição de nutrientes complexos ao meio sintético, quimicamente definido, sendo, entre eles, a farinha de soja e o farelo de amendoim particularmente eficientes.

Esta Tabela mostra também que o farelo de amendoim, individualmente, é o que mais estimula a produção e que também, quando combinado, permite a obtenção de bons resultados.

TABELA I

Efeito estimulante da adição de nutrientes complexos na produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos ( $S_{260}$ )

Composição dos meios em nutrientes complexos					pH Final	$A_{260}$ Final	Produção Relativa
Par. Soja	Ext. Lev.	Ext. Carne	Far. Amen.	Hid. Bacto Casit.			
-	-	-	-	-	7,4	24,1	1,00
+	-	-	-	+	6,1	53,0	2,20
+	-	-	+	-	5,0	51,6	2,14
+	-	-	+	-	5,5	50,4	2,09
-	-	-	+	-	4,3	48,1	2,00
-	-	-	+	-	5,2	44,8	1,86
+	-	-	-	+	6,1	39,4	1,63
-	-	-	+	+	6,5	37,7	1,56
-	+	-	-	-	6,8	35,1	1,46
-	-	-	-	+	5,7	34,5	1,43
-	-	-	+	-	5,5	31,8	1,32

O sinal (-) indica a ausência do nutriente complexo e o sinal (+) indica a presença do nutriente na concentração de 5 g/l. Nesta experiência foi utilizado o inóculo 2.

Entretanto nem todas as combinações são adequadas, conforme ilustram alguns exemplos descritos na Tabela II.

Esta Tabela também mostra que a farinha de soja, isoladamente, é prejudicial à produção do material ( $S_{260}$ ), embora em algumas combinações (Tabela I) forneça meios adequados.

TABELA II

Efeito inibidor da adição de nutrientes complexos na produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos (S<sub>260</sub>)

Composição dos meios em nutrientes complexos				pH Final	A <sub>260</sub> Final	Produção Relativa
Far. Ext.	Far. Amen.	Hid. Bacto	Cas. Pept.			
-	-	-	-	7,4	24,1	1,00
+	-	-	+	5,5	21,2	0,88
-	+	-	-	5,5	20,0	0,83
-	+	-	+	6,0	16,6	0,69
+	-	-	-	5,4	15,7	0,65
-	-	-	+	7,6	14,2	0,59
-	-	+	-	6,3	13,8	0,57
+	+	-	-	6,3	12,7	0,53
+	+	-	+	5,1	12,5	0,52
+	+	-	-	6,3	11,9	0,49
-	-	-	+	5,5	4,2	0,17
-	+	-	-	5,1	3,8	0,16
+	+	+	+	8,2	0,0	0,00

O sinal (-) indica a ausência do nutriente complexo e o sinal (+) indica a presença do nutriente na concentração de 5 g/l. Nesta experiência foi utilizado o inóculo 2.

Utilizando-se o meio com farelo de amendoim, estudou-se o efeito do inóculo na produção do material. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela III.

TABELA III

Produção do material (S<sub>260</sub>), em meio com farelo de amendoim, em função do inóculo de *Streptomyces aureofaciens*

Inóculo	Farelo de Amendoim (g/l)	pH Final	A <sub>260</sub> Final	Aumento Percentual da Produção Básica
2	5	4,3	48,1	100
2	-	7,4	24,1	-
3	5	5,6	15,3	122
3	-	7,5	6,9	-
4	5	3,9	4,0	5
4	-	3,0	3,8	-
5	5	5,3	96,3	212
5	-	6,4	30,9	-

A Tabela III mostra que, nas condições da experiência, o inóculo 5 permite aumento de 212% na produção das substâncias (S<sub>260</sub>), constituindo-se também no melhor entre os ensaios, tendo-se em vista a produção absoluta do material.

Esta Tabela mostra ainda que o inóculo 5, preparado a partir da cultura original, permite a obtenção de melhores resultados quando comparado com inóculos obtidos por subculturas. O inóculo 4, obtido por duas subculturas, é o menos produtivo entre os ensaiados, reforçando a observação anterior.

A Figura 2 mostra os resultados obtidos com o inóculo 5 ao se estudar a produção do material ( $S_{260}$ ) em função da concentração de farelo de amendoim como único aditivo, em vista dos bons resultados obtidos com este (Tabelas I e III).

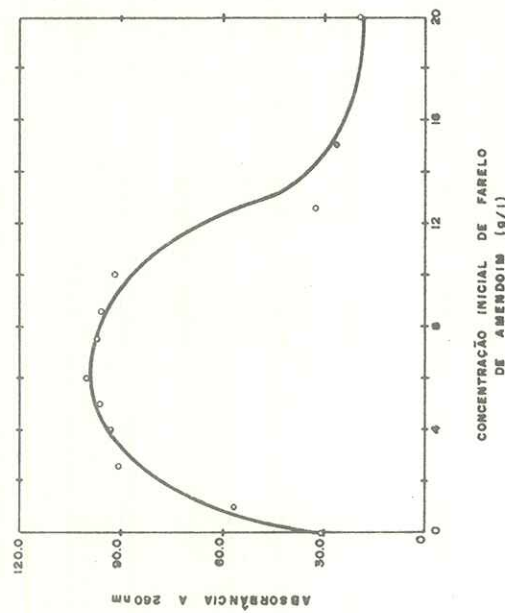


FIG. 2 - PRODUÇÃO DO MATERIAL ( $S_{260}$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE AMENDOIM

FIG. 2 - PRODUÇÃO DO MATERIAL ( $S_{260}$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE AMENDOIM.

Observa-se maior produção para o intervalo de concentração deste nutriente entre 5 e 7 g/l. A concentração de 6 g/l permite aumento de 224 % em relação ao meio básico.

#### DISCUSSÃO

O emprego industrial de meios de cultivo quimicamente definidos para a produção de substâncias úteis por fermenta-

ção é um processo relativamente raro, dando-se preferência a meios constituídos por materiais complexos, usualmente resíduos ou subprodutos da indústria agropecuária, por serem econômicos e eficientes (10-11).

Por essa razão, neste trabalho, decidiu-se procurar enriquecer o meio quimicamente definido descrito anteriormente (8) pela adição dos 7 nutrientes complexos contidos nas Tabelas I e II.

Do elevado número de combinações ensaiadas nem todos os meios enriquecidos nutricionalmente mostraram-se favoráveis ao aumento da produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos ( $S_{260}$ ), o que sugere que essa produção não parece estar relacionada com o teor de nutrientes dos meios, mas depender particularmente de alguns componentes como sugerem claramente as Tabelas I e II.

O farelo de amendoim mostrou ser o mais eficiente nutriente complexo para o enriquecimento do meio básico. Sua associação com outros nutrientes, todos na concentração de 5 g/l, embora tenham levado a meios produtivos não aumentam sensivelmente a ação isolada daquele farelo.

Outro nutriente que isoladamente é ativo, embora inferior ao farelo de amendoim, é a bacto-casitona, um hidrolisado de caseína. Este, quando adicionado a farinha de soja, leva a bom meio, enquanto que a soja isoladamente inibe a produção.

Desses resultados iniciais surgiu a possibilidade de se estudar o enriquecimento do meio básico unicamente com o farelo de amendoim, não somente pela sua eficácia como pelo seu re-

lativamente baixo valor econômico, que levaria a meios baratos e produtivos.

Sendo o acúmulo de substâncias produzidas por fermentação dependente tanto do meio de cultura quanto da natureza do inóculo (10 e 11) o estudo acima foi iniciado pela escolha de inóculo adequado quando obteve-se o inóculo 5 que, em meio com 5 g/l de farelo de amendoim, quadruplicou a produção do meio básico com o inóculo originalmente utilizado (inóculo 2).

A Figura 2 mostra uma curva típica do efeito da concentração de nutriente sobre o acúmulo de produto de fermentação onde há aumento da produção por concentrações baixas de nutriente, há um ótimo e há uma fase de inibição da produção por excesso de nutriente (8, 10 e 11).

Nestas condições o melhor meio estabelecido no presente trabalho é o meio básico enriquecido com 6 g/l de farelo de amendoim, quando a densidade ótica do caldo fermentado ( $A_{260}$ ) foi elevada a 100,1, o que corresponde a aumento de 2,24 vezes a produção do meio básico com o inóculo 5 e a 4,15 vezes a produção deste último com o inóculo original (inóculo 2).

#### REFERÊNCIAS

1. Furuya, A., Araki, K., Nohara, M., Abe, S. and Kinoshita, S. Production of nucleic acid-related substances by fermentation processes. VII. Accumulation of nucleotides by bacteria. Amino Acid Nucleic Acid (Japan) 9: 24-30 (1964)
2. Misawa, M., Nara, T. and Kinoshita, S. - Nucleic acid-related substances by fermentative processes. XXXIV. Isolation

of nucleotide accumulating bacteria from natural sources. Agr. Biol. Chem. (Japan) 34: 617-626 (1970).

3. Uchida, K., Kuninaka, A., Yoshino, H. and Kibi, M. - Fermentative production of hypoxanthine derivatives. Agr. Biol. Chem. (Japan) 25: 804-805 (1961).
4. Igarasi, S., Takeuchi, Y., Imada, A. and Nogami, I. - Accumulation of adenosine nucleotides by *Streptomyces*. Ann. Rept. Takeda Res. Lab. (Japan) 23: 64-68 (1964)
5. Schwartz, J. and Margalith, P. - Binding of end product in the fermentation of nucleotides. Biotechnol. Bioeng. 15: 85-91 (1973)
6. Simuth, J., Tomajka, J. and Zelinka, J. - Identification of nucleic acid breakdown products in the fermentation medium from *Streptomyces aureofaciens*. Biológia (Bratislava) 23: 665-674 (1968).
7. Simuth, J. and Zelinka, J. - Nucleic acid degradation products of *Streptomyces aureofaciens*. J. Antibiot. 23: 242-249 (1970).
8. Carvalho, A. e Molinari, R. - Estudos sobre a produção de nucleosídeos e derivados por fermentação com *Streptomyces aureofaciens*. Tese de Doutorado apresentada à F.F.C.L. de Araraquara, 1973.
9. 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.

10. Lima, U. A., Aquarone, E. e Borzani, W. - *Biotechnologia, Tecnologia das Fermentações*, Vol. 1, Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1975.
11. Rainbow, C. and Rose, A. H. - *Biochemistry of Industrial Micro-organisms*. Londres, Academic Press, 1963.