

INFLUÊNCIA DO ZINCO E DO FERRO SOBRE A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA
FÚNGICA EM AMIDO DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

GILDO ALMEIDA DA SILVA

Pesquisador da EMBRAPA - CNPMF

Orientador: Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio, 1978

A meus pais e irmãos
A Angela e Adriana

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

Sinceros agradecimentos deverão ser dirigidos:

- Ao Professor Dr. Rodolpho de Camargo, pela segura orientação e estímulo na execução deste trabalho e contribuição para a minha formação de pesquisador;
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo apoio financeiro concedido;
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de modo particular ao Departamento de Tecnologia Rural, pelas facilidades oferecidas para execução do presente trabalho;
- À Chefia e colegas do Centro Nacional de Pesquisas de Mandioca e Fruticultura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPMPF);
- Ao Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ, nas pessoas dos Professores Dr.^s Otávio Valsechi, então Chefe do Departamento, e Homero Fonseca, pela autorização da determinação de aflatoxina em materiais inerentes a este trabalho;
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, nas pessoas dos Professores Dr.^s Otto Jesu Crocomo, Henrique Bergamin Filho e Francisco José Krug, pela autorização das análises de zinco, ferro, aminoácidos e nitrogênio total;

Aos Professores Dr.^s Roland Vencovsky e Humberto de Campos e ao colega da EMBRAPA/CNPMPF Ranulfo Correia Caldas, pelas sugestões durante as análises estatísticas dos dados;

Aos Colegas do curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ;

Aos Amigos Gustav e Daisy Westhoff, Dr. Jonas Vaz de Arruda e Maria de Lourdes Ortolani Arruda, Dr. Aloísio e Augusta Viana, Dr. Eurico e Olga Bueno de Souza, pelo apoio dispensado;

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ, em especial dos setores de Microbiologia de Alimentos e de Processamento e Bioquímica de Alimentos, bem como do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, em particular das Secções de Química Analítica e de Bioquímica de Plantas, pela colaboração e execução das análises de aflatoxina, zinco, ferro, nitrogênio total e aminoácidos;

Aos Funcionários das Bibliotecas Central e do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ e da EMBRAPA/CNPMPF;

À funcionária da EMBRAPA/CNPMPF, Elane Borges Nascimento, pela execução dos serviços datilográficos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA	6
4 - METODOLOGIA	35
4.1 - Preparo do Material	35
4.2 - Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo	36
4.3 - Ensaio de Duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio) para o Crescimento de <u>Fusarium</u> sp. , <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 e <u>Aspergillus wentii</u> IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca	37
4.4 - Ensaio de Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro para o Crescimento de <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia	38
4.5 - Ensaio de Cinco Níveis de Ferro para o crescimento de <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca, Uréia e Sulfato de Zinco na Concentração Ótima Encontrada	39
4.6 - Curva de Crescimento do <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca, Uréia, Sulfato de Zinco e Sulfato Ferroso	40
4.7 - Determinação de Aflatoxina	41
4.8 - Análise Estatística	41

	Página
5 - RESULTADOS	43
5.1 - Determinação do Teor de Micronutrientes no Amido de Mandioca	43
5.2 - Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo	43
5.3 - Ensaio de Duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio) para o crescimento de <u>Fusarium</u> sp. , <u>Aspergil - lus niger</u> IZ-9 e <u>Aspergillus wentii</u> IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca	51
5.4 - Ensaio de Cinco Níveis de Zinco (0,45 - 5,45 - 10,45 - 15,45 e 20,45 ppm) e Cinco de Ferro (0,51 - 5,51 - 10,51 - 15,51 e 20,51 ppm) para o Crescimento de <u>Asper - gillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gra mas de Carboidrato por Cento) e Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento)	54
5.5 - Ensaio de Cinco Níveis de Ferro (15,51 - 20,51 - 25,51 - 30,51 e 35,51 ppm) para o Crescimento de <u>Aspergillus ni - ger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Car boidrato por Cento) , Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) e Zinco (5,45 ppm)	72
5.6 - Curva de Crescimento do <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cen to) , Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) , Sul fato de Zinco (5,45 ppm de Zinco) e Sulfato Ferroso (20,51 ppm de Ferro)	77
6 - DISCUSSÃO	82
6.1 - Seleção do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo	82

6.2 - Ensaio de Duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio) para o Crescimento de <u>Fusarium</u> sp. , <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 e <u>Aspergillus wentii</u> IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca	87
6.3 - Ensaio de Cinco Níveis de Zinco (0,45 - 5,45 - 10,45 - 15,45 e 20,45 ppm) com Cinco de Ferro (0,51 - 5,51 - 10,51 - 15,51 e 20,51 ppm) e de Cinco de Ferro (15,51 - 20,51 - 25,51 - 30,51 e 35,51 ppm) Fixando o Zinco na Concentração de 5,45 ppm para o Crescimento de <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento) e Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento)	90
6.4 - Curva de Crescimento do <u>Aspergillus niger</u> IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento), Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) , Sulfato de Zinco (5,45 ppm de Zinco) e Sulfato Ferroso (20,51 ppm de Ferro)	96
7 - CONCLUSÕES	97
8 - SUMMARY	99
9 - LITERATURA CITADA	101

1. RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo averiguar se o amido de raízes de mandioca possui quantidades adequadas de zinco e ferro para proporcionar o máximo crescimento de um determinado fungo, escolhido para utilizar este substrato como fonte de carbono para a produção de proteína, quais as doses dos microelementos necessárias à obtenção de tal crescimento e se o possível efeito inibitório de um deles em determinadas concentrações pode ser eliminado ou, pelo menos, reduzido, com a adição do outro.

Dentre os microrganismos ensaiados (Aspergillus niger IZ-9 , Aspergillus wentii IZ-1625 e Fusarium sp.) os melhores resultados foram alcançados com o Aspergillus niger IZ-9 cultivado em pH 3,0.

Os resultados obtidos quando diferentes doses de ferro e zinco foram adicionadas mostraram que o amido de mandioca da variedade utilizada (IAC-YARA) não possuía concentrações destes elementos em níveis adequados às produções máximas de biomassa e proteína bruta por Aspergillus niger IZ-9, as

quais foram atingidas em concentrações de 20,51 ppm de ferro e 5,45 ppm de zinco. Observou-se que o zinco apresenta efeito tóxico a partir de concentrações em torno de 10 ppm para este microrganismo. Desta maneira, desconhecendo-se os teores de ferro e zinco de raízes de mandioca utilizadas para o crescimento e produção de proteína por Aspergillus niger IZ-9 sugeriu-se que fosse adicionado apenas ferro, na concentração em torno de 20 ppm, uma vez que este não é tóxico em concentrações mais elevadas, elimina o efeito inibitório do zinco e corrige a deficiência do mesmo, se em concentrações insuficientes. Verificou-se, ainda, que para o Aspergillus niger IZ-9, cultivado nas condições estabelecidas no presente trabalho, o melhor pH do meio foi encontrado estar em torno de 3, sendo os valores de pH final acima de 8 indicadores de mau desenvolvimento do microrganismo. Pelo perfil de aminoácidos essenciais encontrou-se que o microrganismo é bom produtor de treonina e que o meio de cultura utilizado deve ser enriquecido com outros componentes, tais como fósforo, potássio, cálcio e magnésio, para que os aminoácidos essenciais restantes sejam produzidos em maiores proporções e /ou estudos genéticos devem ser realizados a fim de que se obtenham linhagens com capacidade de sintetizar tais aminoácidos em maiores quantidades.

2. INTRODUÇÃO

A mandioca tem sido, desde a antiguidade, uma fonte de alimento não suficientemente explorada. Possuindo a capacidade de se adaptar a condições adversas, quanto ao aspecto químico do solo, é competitivamente superior a outras culturas de subsistência, principalmente, em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento. O Brasil, sendo o maior produtor mundial destaca-se também como um dos maiores consumidores e um dos que menos participam do processo de exportação. No Nordeste, o cultivo da mandioca atinge cerca de 1.200.000 hectares, sendo um hábito tradicional que está, quase na sua totalidade, sob o domínio de pequenos produtores, que fazem desta cultura sua fonte de renda e vida. Mais de 90% da produção total se destina ao consumo humano, principalmente sob a forma de farinha. Um dos maiores problemas que atingem o produtor reside no esporádico emprego de uma tecnologia industrial que dê à mesma um merecido valor comercial e nutritivo. Sendo o emprego da farinha de mandioca na alimentação uma tradição que, desde a época que antecede o descobrimento deste país, foi transmi-

tida de pais para filhos, não pode ser demolida, em um curto espaço de tempo, com o advento de novas idéias. Portanto, a utilização de mandioca para a produção de proteína microbiana não pode afetar o sistema de produção da tradicional farinha, mas tentar oferecer meios de, pelo menos, se aproveitar os resíduos feculentos decorrentes do processo de prensagem que muitas vezes são desperdiçados. A utilização de raízes de mandioca como fonte de carbono para o crescimento de microrganismos pode não só redundar em alimentos de valor nutritivo mais elevado como oferecer à cultura uma alternativa mais nobre, chegando a incentivar a industrialização para fins alimentares que atinjam direta ou indiretamente o homem. Para tal, é necessário o emprego de microrganismos que sejam amilolíticos, para evitar gastos com processos de hidrólise, e que se desenvolvam em valores de pH baixos e em temperaturas altas, a fim de minimizar a contaminação. É igualmente importante o uso de fungos que, além da proteína de seus micélios, ofereçam simultaneamente, condições para que o líquido residual de suas culturas seja utilizado em indústrias químicas e farmacêuticas com a produção de antioxidantes, ácidos orgânicos e enzimas.

No entanto, alguns problemas microbiológicos podem surgir acarretando uma baixa produção de biomassa e síntese protéica. Um deles pode estar relacionado com as quantidades de microelementos presentes no substrato, decorrentes de práticas de adubação utilizadas para aumentar a produção de raiz de mandioca por área. O zinco tem mostrado, dependendo do solo, aumentar a produção, o que leva os técnicos em adubação a utilizá-lo para tal fim. Este pode se acumular nas raízes em altas ou baixas concentrações dependendo da variedade a ser cultivada. Considerando que a presen-

ça de micronutrientes em quantidades não adequadas pode ser um dos fatores limitantes para o crescimento de microrganismos e que cada um deles exige uma concentração diferente dos mesmos para atingir seu máximo crescimento, o presente trabalho tem por objetivo averiguar se o amido de raízes de mandioca possui quantidades adequadas de zinco e ferro para proporcionar o máximo crescimento de um determinado fungo, escolhido para utilizar este substrato como fonte de carbono para a produção de proteína, quais as doses dos microelementos necessárias à obtenção de tal crescimento e se o possível efeito inibitório de um deles em determinadas concentrações pode ser eliminado, ou, pelo menos, reduzido, com a adição do outro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A ação de microelementos estimulando ou inibindo o desenvolvimento de microrganismos tem sido amplamente relatada na literatura.

RICHARDS (1899) relata que o ferro tem um duplo efeito sobre o desenvolvimento de fungos, sendo, em determinadas concentrações, um nutriente necessário ao fungo e, em maiores quantidades, um estimulante do crescimento. Em relação ao zinco encontrou um efeito estimulante dentro de certa faixa de concentração, passando a tóxico após atingir determinado nível.

WATTERSON (1904) encontrou que pequenas quantidades de sulfato de zinco, assim como de sulfato fêrrico, aumentam a taxa de crescimento e produção de dióxido de carbono por Aspergillus niger e Penicillium glaucum.

CURRIE (1917) achou que, quando nitrogênio foi suprido como sais de amônio ou como asparagina para a produção do ácido cítrico por Aspergillus niger, o ferro não estimulou os processos metabólicos. Quando, porém, o nitrogênio foi suprido como nitrato, o ferro teve um efeito estimulante acentuado, especialmente notável na produção aumentada de dióxido de

carbono e peso micelial. A adição de 0,01 g/l de sulfato ferroso, correspondente a 2 ppm de ferro, ao meio contendo nitrato estimulou o crescimento do micélio e aumentou a taxa do metabolismo, principalmente nos primeiros dias de fermentação, sugerindo que alguma reação química envolvida na utilização do nitrato é acelerada na presença de ferro.

STEINBERG (1919) encontrou na literatura uma grande discrepância em relação à produção máxima de biomassa com mínima concentração de zinco. Esclarece que esta discrepância pode resultar, pelo menos em parte, do uso de linhagens que exigem diferentes quantidades de zinco para seu desenvolvimento ótimo e que a presença de diferentes concentrações de zinco no meio, não levada em consideração, pode ser um fator causal adicional. O autor não cita, porém, um outro fator de grande importância que é a composição do meio em termos de fontes de carbono e nitrogênio. O metal pode desempenhar um papel muito importante no metabolismo destes dois elementos em quantidades diferentes, dependendo da complexidade das duas fontes.

Ainda em 1919, o mesmo autor usou o método de purificação hidrolítica para estudar a influência do zinco e do ferro sobre o crescimento de Aspergillus niger. Verificou que os dois elementos isoladamente não apresentavam um efeito estimulatório significativo, porém, quando adicionados ao meio conjuntamente, o fenômeno característico de estimulação do crescimento era observado. No controle, sem adição de ferro e zinco, ocorreu um pequeno crescimento, o que pode ter sido devido à ineficiência do método em eliminar totalmente estes elementos do meio ou à presença de quantidades apreciáveis dos mesmos no inóculo capazes de promover algum crescimento. O ligeiro aumento observado após adição de ferro e zinco isoladamente se deve

além desses fatores, à impureza dos próprios sais de ferro e zinco.

MCHARGUE e CALFEE (1931), estudando o efeito do manganês, cobre e zinco sobre o crescimento e metabolismo de fungos filamentosos, observaram que para o Aspergillus flavus o maior peso micelial foi obtido quando os três microelementos estavam presentes. Quando tomados isoladamente, o manganês e o zinco foram os que mais influenciaram na produção de massa micelial, sendo o primeiro ligeiramente superior. Tanto para o manganês, como para o cobre e o zinco, o maior peso micelial foi obtido na concentração de 5 ppm (partes por milhão). Quando combinados dois a dois os melhores resultados foram obtidos com a combinação manganês - zinco, cuja produção aumentou cerca de 8,6 vezes em relação ao controle (sem adição de microelementos), comparada com cerca de 5,1 vezes para zinco-cobre e cerca de 4,0 vezes para manganês-cobre. A combinação dos três elementos produziu aproximadamente 9,0 vezes mais que o controle. Em sílica-gel, as concentrações ótimas desses elementos para o mesmo fungo foram 5 ppm para o cobre, 2,5 ppm para o manganês e 1 ppm para o zinco. Concordando com a medida tomada em peso seco, a melhor combinação dos elementos foi aquela em que os três estavam presentes, seguindo-se a combinação do manganês com o zinco. Os três elementos influenciaram a assimilação de fósforo, magnésio e cálcio, sendo que na presença de zinco esses elementos foram assimilados em maiores quantidades.

Pesquisando o efeito dos mesmos elementos sobre o crescimento de leveduras, os autores, no mesmo ano, verificaram que para se obter o máximo crescimento de Saccharomyces cerevisiae eram necessários 10 ppm de zinco, 10 ppm de manganês e 7,5 ppm de cobre. O crescimento foi medido em peso seco e taxa de divisão celular. Quando testados isoladamente, através de medida do peso seco, verificou-se que o cobre produziu melhor crescimento que

os outros elementos. Através de medida de taxa de divisão celular, o cobre inicialmente inibiu a reprodução, mas com o decorrer da incubação passou a favorecê-la mais que o manganês e o zinco. Estes, separadamente, produziram aumentos imediatos na taxa de divisão celular, quando comparados com o controle (sem adição de microelementos), e aumento do tamanho das células, enquanto que no meio contendo cobre as células eram pequenas, ligeiramente menores que as do controle. Os autores sugerem que o maior peso das células crescidas em meio com cobre está relacionado com o grande número de pequenas células. Quando estudados em grupos de dois (manganês e cobre; manganês e zinco; cobre e zinco), o maior peso foi obtido nas culturas contendo manganês e zinco, similarmemente ao encontrado para Aspergillus flavus. O número de células foi praticamente o mesmo nos três tratamentos, porém o tamanho das células foi maior quando o manganês estava associado com o zinco, resultando, daí, o maior peso das culturas deste grupo. Quando testados os três elementos em conjunto, as células se apresentaram ligeiramente menores que as do grupo formado por manganês e zinco, devido à maior taxa de divisão, o que resultou na obtenção do peso máximo nas culturas em que os três elementos estavam associados.

PORGES (1932) encontrou que a presença de cloreto fêrrico afetava a produção de ácido cítrico por Aspergillus niger. A concentração em que a produção de ácido e crescimento do fungo, medido em peso seco, alcançaram o máximo foi de 0,02 gramas de cloreto fêrrico por litro. Em concentrações superiores, tanto a produção de ácido como o crescimento decaíram até atingir um efeito tipicamente tóxico, quando uma concentração de 0,20 g/l foi usada. Testes com sulfatos de zinco, manganês, níquel e cobre na concentração de 0,01 g/l mostraram que apenas o zinco apresentou em efeito estimulatório, aumentando tanto a produção de ácido cítrico como a quan

tidade de ácido obtida por unidade de açúcar consumido, o que foi acompanhado de ausência de esporos escuros e aumento no desenvolvimento do micélio. Os outros elementos foram inibitórios na concentração usada. O autor conclui que a presença de ferro e zinco é essencial para o rápido crescimento e aumento no acúmulo de ácido cítrico. Embora o autor não chame atenção para o crescimento do fungo no meio onde não foram adicionados ferro e zinco, percebe-se que a presença destes se achava em quantidades suficientes para promover tanto o crescimento como a produção de ácidos. Níquel, manganês e cobre podiam estar presentes em quantidades suficientes para promover o desenvolvimento ótimo. Assim, quando adicionados ao meio exibiriam efeito tóxico devido à concentração alta resultante ou, a própria concentração de tais elementos adicionada poderia por si só ter sido alta, independentemente de uma quantidade existente no meio.

MOSSERAY (1932), analisando o efeito do zinco sobre várias espécies do gênero Aspergillus e linhagens de Aspergillus niger, verificou que as espécies e linhagens estudadas reagem à ação do zinco de maneira bastante diversa. A presença do zinco exerceu um aumento no peso dos microrganismos de duas a oito vezes em relação à cultura sem zinco. Utilizando três linhagens de Aspergillus niger (A. niger Church 731, A. niger Biourge 695 e A. niger Gobbe 714) observou diferentes comportamentos tanto no meio contendo zinco, como naquele sem o elemento. Para o meio contendo zinco, o maior peso foi produzido pela linhagem 731, ficando a 695 numa posição intermediária e a 714 como menor produtora de biomassa. Para o meio sem zinco, a linhagem 695 produziu o maior peso, enquanto que a 731 ficou na posição intermediária e a 714 como menor produtora de biomassa. Apesar da linhagem 714 ter apresentado as mais baixas produções, foi a que se mostrou mais sensível à adição do zinco, sendo a 695 a de menor sensibilidade.

STEINBERG (1936), na tentativa de desenvolver um método para a completa remoção de metais pesados de meio de cultura para Aspergillus niger, através de extração alcóolica, chegou à conclusão de que o método era inaplicável para o fim a que se propunha. Aproveitou, então, os dados para estudar a relação entre substâncias acessórias de crescimento e metais pesados na nutrição de A. niger. Verificou que, com ou sem extração, a redução no crescimento do fungo era mais acentuada quando zinco e ferro não eram adicionados. Segundo o autor, a presença de crescimento na omissão de cada elemento se deve à falta de uma remoção total do mesmo ou ao transporte pelo inóculo de quantidades dos elementos suficientes para promover crescimento, provenientes do meio de cultura anterior. O método de extração foi capaz de remover zinco em quantidades suficientes para causar uma redução no crescimento de 10,51% para 4,93%. No entanto, o autor não leva em consideração que esta redução pode ter sido causada não pela remoção do zinco em si, mas por um desbalanceamento entre os diversos elementos. Em relação ao ferro, quando todos os componentes do meio foram submetidos à extração alcóolica o crescimento do fungo foi maior do que quando não foi usado processo de extração ou quando apenas a sacarose foi submetida ao mesmo. Isto poderia reforçar a hipótese de que a redução no crescimento resulta de um desbalanceamento entre os vários elementos. O autor achou, ainda, que a linhagem de A. niger estudada parece não necessitar de substâncias acessórias de crescimento, afirmando que o aumento no crescimento ocorrido quando extratos de materiais orgânicos, tais como extrato de malte ou levedura, foram usados, pode ter resultado da presença de metais pesados. Analisando alguns efeitos de metais pesados essenciais para a nutrição de Aspergillus niger sobre seu crescimento, STEINBERG, no mesmo ano, verificou que as taxas de crescimento aumentam com o aumento nas concentra-

ções de metais pesados até um certo ponto, a partir do qual o aumento nas concentrações leva a quedas progressivas nas taxas de crescimento. Manganês, ferro, zinco e cobre mostraram ser essenciais tanto para o crescimento como para a esporulação do fungo, podendo a não adição de ferro e zinco reduzir a produção em 98% ou mais, enquanto que a não adição de cobre e manganês pode reduzir de 60% ou mais.

Em 1937, o mesmo autor introduz o fator fonte de nitrogênio como um possível contribuinte para as variações observadas na utilização de elementos traços por A. niger. Observou que em todas as fontes de nitrogênio utilizadas, a não adição de ferro e, principalmente, zinco reduz sensivelmente o desenvolvimento do fungo. Quando a fonte de nitrogênio era o nitrato, exceto nitrato de cálcio, a omissão de molibdênio causava uma redução no crescimento igual e, às vezes, superior à observada na omissão do zinco. Dos microelementos testados (ferro, zinco, cobre, manganês e molibdênio) os que causaram menos alteração no crescimento, quando omissos, foram o manganês e o cobre. O autor salientou que é necessário um ajuste correto das concentrações destes componentes essenciais.

Ainda STEINBERG, em 1939, continuando seus estudos sobre os efeitos de elementos traços em diferentes fontes de nitrogênio, encontrou que, além do ferro, zinco, cobre, manganês e molibdênio, também o gálio é essencial para o crescimento de Aspergillus niger Van Tiegh. De um modo geral, quanto maior a deficiência menor o crescimento e maior a quantidade de íons residuais inicialmente adicionados. Na maioria das fontes de nitrogênio utilizadas as maiores reduções na produção de biomassa se devia a não adição do ferro e zinco. As baixas produções causadas pela não adição de ferro eram frequentemente acompanhadas de um aumento na produção de hidroxilamina, enquanto que baixas concentrações de zinco evitavam a formação deste composto.

Novamente o autor mostrou a redução do crescimento na omissão de molibdênio quando a solução nutriente continha nitratos de lítio, sódio, potássio e magnésio, salientando que o molibdênio parece ser de especial importância para os processos de redução não apenas de nitrato, mas de nitritos e sais de ácido nitrohidroxilamínico.

No mesmo ano, STEINBERG relacionou ainda os efeitos de elementos traços necessários ao desenvolvimento de A. niger Van Tiegh com diferentes fontes de carbono. Utilizando sacarose, d-glucose, d-frutose, d-manose, d-galactose e l-sorbose, como fontes de carbono, verificou que a não adição de zinco causou uma grande redução no crescimento quando as quatro primeiras fontes de carbono foram empregadas, enquanto que o ferro reduziu em maior proporção apenas nas duas primeiras fontes. O molibdênio produziu uma redução de cerca de 50% quando sacarose, d-manose e l-sorbose foram utilizadas. Manganês, cobre, gálio e escádio apresentaram pouca ou nenhuma alteração no crescimento com estas fontes de carbono, porém com glicerol o escádio dobrou a produção de biomassa.

FOSTER e WAKSMAN (1939) estudaram o efeito do zinco, ferro, cobre, manganês e molibdênio sobre o crescimento e produção de ácido fumárico por Rhizopus nigricans. Dos cinco elementos testados isoladamente, o zinco foi o que apresentou maior efeito tanto sobre o crescimento como sobre a produção de ácido fumárico. Numa concentração de 1,2 ppm, o zinco modificou a utilização de energia pelo fungo estimulando a produção de micélio aéreo abundante. Quando medido através de consumo de nitrogênio do meio, o crescimento das culturas que continham zinco era 2,5 vezes maior que o da cultura controle (não adição de microelementos). Cobre, manganês e molibdênio isolados não tiveram efeitos significativos, porém a presença simultânea do zinco levou à resposta característica. Pode-se, assim,

falar de um "efeito específico" do zinco sobre o crescimento do Rhizopus. Os dados sobre a produção de ácido fumárico sugerem a natureza deste efeito. Em culturas contendo zinco a produção do ácido foi sensivelmente reduzida. Na ausência deste elemento, o organismo transformou grande parte da glicose em ácido fumárico. O zinco torna o organismo capaz de utilizar sua fonte de carbono de maneira mais completa, em vez de deixar grande parte dela presa sob a forma de ácido fumárico. Pequenas quantidades deste elemento parecem catalisar a degradação mais completa da glicose e, conseqüentemente, sua melhor utilização como fonte de carbono e energia para a síntese celular. O ferro apresentou efeito contrário ao do zinco em relação ao crescimento. Quando usado isoladamente tendeu a deprimir o crescimento, porém a capacidade de produzir ácido fumárico não foi reduzida. Quando combinado com zinco o efeito do ferro foi não apenas inibido, mas o efeito específico do zinco foi até mesmo acentuado. O ajustamento da razão Fe: Zn pode reduzir o efeito específico do zinco, sendo a resposta característica do organismo ao ferro manifestada, ou seja, ocorre uma parcial neutralização dos dois elementos. Portanto, deve ser enfatizado que a natureza antagônica ou associativa desses dois elementos depende da sua razão.

Através de uma revisão bibliográfica sobre os metais pesados na nutrição de fungos, FOSTER (1939) concluiu que não há dúvida de que a necessidade por quantidades traços de vários metais pesados, tais como zinco, ferro, manganês, cobre e, possivelmente, outros é um fenômeno amplamente encontrado entre os fungos e, especialmente, entre os filamentosos, para os quais esses elementos devem ser considerados indispensáveis. Salientou que a maioria dos estudos é feita com Aspergillus niger e que, certamente, outros fungos têm diferentes necessidades por metais pesados, não sendo o papel de um determinado metal o mesmo para vários organismos.

BLANK (1941), numa tentativa de desenvolver o melhor meio possível para o crescimento de Phymatotrichum omnivorum, realizou vários experimentos para determinar que elementos são necessários para o crescimento ótimo e em que proporções. Cobre, ferro, manganês e zinco foram estudados intensivamente, parecendo que pelo menos os três últimos são essenciais para o crescimento ótimo do organismo em estudo. Dados preliminares revelaram que esses elementos eram exigidos em concentrações muito mais altas que as encontradas para vários organismos estudados por outros pesquisadores. Os resultados de três experimentos fatoriais, para determinar o efeito da presença ou ausência de cobre, ferro, manganês e zinco, em soluções purificadas, mostraram que o cobre foi um tanto benéfico a 2 ppm, indiferente a 5 ppm e causou uma ligeira depressão no crescimento a 10 ppm; com ferro, manganês e zinco presentes houve aumento acentuado no crescimento, muito maior que a somatória de seus efeitos individuais, indicando a existência de interações muito importantes; as melhores interações foram obtidas para as combinações ferro-zinco e manganês-zinco. Em soluções não purificadas os resultados foram iguais ou superiores aos obtidos com soluções purificadas, tendo sido omitida a adição de cobre, sendo ferro, manganês e zinco empregados aproximadamente nas mesmas razões. A solução não purificada foi extremamente sensível à adição de cobre e muito mais sensível a concentrações crescentes de ferro e, principalmente, zinco que a solução purificada. Em experimentos posteriores, nos quais ferro e zinco variaram em quatro diferentes níveis e manganês mantido constante em 2 ppm, a importância dessas taxas relativas tornou-se mais evidente e os efeitos prejudiciais resultantes de uma condição não balanceada foram enfatizados, principalmente os efeitos inibitórios de concentrações aumentadas de zinco em relação à concentração do ferro. Foi observado um efeito depressivo do ferro a

10 ppm, em solução não purificada, tendo praticamente desaparecido a concentrações mais altas.

Três novos isolados de Phymatotrichum omnivorum foram comparados entre si e com a linhagem anteriormente testada para determinar se todos os isolados utilizavam igualmente bem os elementos tidos como necessários para o crescimento ótimo. Os resultados mostraram que esses isolados podiam ser distinguidos pela taxa de crescimento e capacidade de utilizar diferentes combinações de ferro, manganês e zinco.

PERLMAN et alii (1946) estudaram o efeito de íons metálicos sobre a produção de ácido cítrico por cinco linhagens de Aspergillus niger (59, 62, 69, 70 e 72) em dois diferentes meios: Meio A: 140 g/l de sacarose, 1,0 g/l de KH_2PO_4 , 0,25 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/l de NH_4NO_3 , 0,232 g/l HCl, para ajustar o pH para 2,3, 18 γ /l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 62 γ /l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 5 γ /l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e 162 γ /l $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; Meio B: 140 g/l sacarose, 1,0 g/l K_2HPO_4 , 0,23 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,23 g/l NH_4NO_3 , 0,325 g/l HCl, para pH 2,3, 16 γ /l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 92 γ /l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 102 γ /l $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Com o meio A, variando apenas as concentrações de sacarose de 100 a 200 g/l, verificaram que para a linhagem A. niger 62, concentrações de sacarose acima de 140 g/l reduziram a produção de ácido cítrico e a adição de 0,1 mg de ferro a este meio pareceu dar ótimos resultados independentemente da concentração de sacarose original. Com o meio B, para as linhagens 62, 69, 70 e 72, a concentração ótima de ferro ficou entre 0,1 e 1,0 ppm, enquanto que, para a linhagem 59, a concentração ótima foi de 10 ppm. Os efeitos do ferro, manganês, alumínio, molibdênio, cobre, zinco, cálcio e cromo foram testados no meio A. Nestas condições, apenas alumínio, cromo, ferro e manganês foram estimulatórios para a produção de ácido cítrico. O zinco foi inibitório em todas as concentrações testadas.

As produções obtidas quando o ferro foi associado a outros elementos estimulatórios, em geral, não foram melhores que as obtidas quando o ferro foi usado isoladamente. Entretanto, combinações de ferro e manganês, no meio B, deram melhores produções que os dois elementos isolados. No meio A, o ferro foi um tanto inibitório para a linhagem 72, enquanto que para a linhagem 62 foi nitidamente estimulatório; o manganês foi inibitório para a linhagem 72 a níveis muito baixos.

SHU e JOHNSON (1948), analisando a produção de ácido cítrico por Aspergillus niger em fermentação submersa, observaram que o processo podia ser dividido em duas fases distintas. A primeira era caracterizada pelo crescimento micelial onde o açúcar era utilizado principalmente para o desenvolvimento do fungo e a outra pela paralisação do crescimento e utilização da maior parte do açúcar para a síntese de ácido cítrico. Dependendo da dose de microelementos utilizada maiores produções de crescimento ou ácido cítrico podem ser obtidas. Foi observado que o peso micelial varia diretamente com a concentração de ferro. Em baixos níveis deste elemento a utilização do açúcar é pobre por causa do crescimento deficiente resultante. Por outro lado, em altas concentrações o abundante crescimento pode deprimir a produção de ácido devido à quantidade aumentada de açúcar utilizada para o crescimento. O autor explica, ainda, que o decréscimo na produção de ácido cítrico nestas condições pode ter sido devido a diminuição de ar disponível causada pela alta viscosidade do meio quando tal crescimento ocorre. A concentração ótima de ferro para a produção de ácido cítrico foi encontrada ser de aproximadamente 1 mg/ml.

No mesmo ano, os autores estudando a interdependência dos constituintes do meio na produção de ácido cítrico em culturas submersas,

mostraram que também o zinco era essencial para o processo. De dez linhagens de Aspergillus niger cultivadas em meio com e sem adição de zinco apenas uma não aumentou a produção de ácido em decorrência da adição de zinco, enquanto que a medida do peso micelial revelou um aumento no crescimento de 2,5 a 7,5 vezes. Como os autores testaram apenas uma quantidade de zinco, é possível que a variação apresentada tanto na produção de ácido como de massa micelial seja decorrente do fato das diversas linhagens exigirem o micrelemento em diferentes concentrações. Por exemplo, a linhagem que menos produziu ácido e biomassa no meio sem zinco foi a que mais respondeu à adição do elemento tanto para a produção de ácido como de biomassa, enquanto que a que produziu mais ácido apresentou um aumento muito menor.

FOSTER e DENISON (1950), estudando o papel do zinco sobre o metabolismo de Aspergillus niger e Rhizopus nigricans, verificaram que, quando pesos iguais de inóculos de micélios provenientes de meios de cultura sem e com zinco eram cultivados em meio contendo o elemento, aqueles originados de culturas com zinco atingiam rapidamente a taxa de crescimento máxima. O inóculo proveniente do meio deficiente, no entanto, sempre exigia 10 a 15 horas a mais para atingir sua taxa máxima de crescimento. Segundo os autores, isto indica que o zinco iônico faz parte de uma combinação orgânica ou que o mesmo é necessário para a síntese de alguma substância limitante de crescimento e que esta síntese ocorre durante a fase lag observada. Extratos de micélio proveniente de culturas contendo zinco, extrato de levedura e outros materiais naturais, dialisados e não dialisados, não encurtaram esta fase, indicando que a substância essencial era uma grande molécula e, provavelmente, termolábil. Analisando o efeito da deficiência do zinco sobre a carboxilase pirúvica de R. nigricans mostraram que em numerosos casos o micélio deficiente em zinco nunca evoluía CO_2 a não ser em taxas des

prezíveis, enquanto que micélio proveniente de culturas com zinco evoluía grandes quantidades, o mesmo acontecendo com caldo livre de células. A adição de cocarboxilase, zinco e magnésio ao caldo de micélio deficiente não produziu qualquer atividade carboxilase pirúvica. Pareceu provável que a carboxilase pirúvica era a substância responsável pelo maior tempo observado na fase lag do micélio deficiente. Pelos resultados obtidos verificaram que o zinco era essencial para a síntese da carboxilase pirúvica em Rhizopus nigricans embora haja indicação de que o metal não faz parte da enzima.

TOMLINSON et alii (1950), analisando a influência do zinco, ferro, cobre e manganês sobre a produção de ácido cítrico por Aspergillus niger, testaram, inicialmente, duas doses (0,005 e 0,1mg %) dos elementos e verificaram que apenas o zinco mostrou uma diferença marcante tanto na produção de ácido como de micélio seco, sendo a concentração de 0,1mg % a melhor. Fixaram, então, esta dose de zinco e variaram as doses de ferro, tendo encontrado que para a produção de ácido cítrico a melhor concentração ficou em torno de 0,01mg %, enquanto que para peso seco as melhores produções foram obtidas na faixa de 0,03 a 0,1mg %. Mantendo a concentração de zinco em 0,1mg %, fixando a de ferro em 0,01mg % e variando as de cobre e manganês, isoladamente, encontraram que em relação ao cobre as melhores produções para ácido cítrico foram obtidas quando concentrações na faixa de 0,01 a 0,1µg% foram empregadas, enquanto que para a produção de micélio não foi encontrada variação na faixa de 0,01 a 5,0µg%. Em relação ao manganês a melhor faixa para ácido cítrico foi de 0,01 a 0,1µg% e para peso seco de 1,0 a 5,0µg%. Quando os quatro elementos foram adicionados juntos, sendo 0,1mg % de zinco, 0,01mg % de ferro e concentrações de 0,01 a 5,0µg% de cobre e manganês, observaram que as melhores produções do ácido foram obtidas nas concentrações de 0,01 e 0,1µg% de cobre e manganês, enquanto que

para peso seco as melhores concentrações foram de 1,0 e 5,0 $\mu\text{g}\%$ destes elementos. Fixando o zinco em 0,1 $\text{mg}\%$ e o ferro numa concentração encontrada, anteriormente, como ótima para produção de biomassa (0,1 $\text{mg}\%$) e utilizando duas doses de manganês e cobre (0,1 e 5,0 $\mu\text{g}\%$), encontraram uma maior produção do ácido com 0,1 $\mu\text{g}\%$ dos elementos e de biomassa com 5,0 $\mu\text{g}\%$ dos mesmos. Ficou evidente que, de um modo geral, as quantidades de ferro, cobre e manganês exigidas para uma alta produção de ácido cítrico são menores que aquelas necessárias para o bom desenvolvimento do microrganismo.

NASON (1950) verificou que a síntese de triptofano em extratos livres de células de Neurospora provenientes de micélio deficiente em zinco era prejudicada e mostrou que parece haver uma relação entre zinco e a enzima que converte indol e serina em triptofano. O autor esclarece que não se sabe se o zinco é um constituinte enzimico ou se está relacionado direta ou indiretamente com a síntese de um ou mais constituintes do sistema enzimico.

NASON et alii (1951) encontraram alterações na constituição enzimica de Neurospora deficiente em zinco. Os resultados de cinco experimentos foram similares em relação ao tipo de distribuição enzimica. Em quatro dos experimentos, nenhuma atividade álcool desidrogenase foi detectada nos extratos deficientes em zinco e apenas um apresentou traços de atividade em relação ao controle suficiente em zinco. A adição de zinco ao extrato deficiente não restaurou a atividade da álcool desidrogenase. Da mesma forma, a adição de extrato deficiente ao extrato controle não alterou em nada a atividade enzimica do último, sugerindo que a perda da atividade enzimica em Neurospora deficiente em zinco não se deve à presença de inibidores, mas à falta da enzima. Houve também um decréscimo no teor da enzima que condensa indol e serina para a formação de triptofano em homogeni-

zado total de Neurospora deficiente em zinco e seu respectivo extrato. Este decréscimo não foi tão marcante quanto o ocorrido com a atividade da álcool desidrogenase, porém foi frequentemente observado. A adição de zinco a extratos deficientes não afetou a síntese do triptofano. Ao contrário do que se observou para estas duas enzimas, a deficiência em zinco resultou numa acentuada elevação no teor de NADase (nicotinaminada-adenina-dinucleotidase), sendo o aumento de 10 a 20 vezes por miligrama de proteína quando comparado com extratos normais. A adição de zinco a extratos deficientes não diminuiu a atividade desta enzima. Não foi detectado nenhum estimulador para a sua síntese em extratos deficientes, nem inibidor no extrato controle. Os autores verificaram, ainda, que a atividade da fumarase de Neurospora aparentemente não foi afetada pela deficiência em zinco e que as enzimas hexoquinase, aldolase e triosefosfato desidrogenase estão presentes em homogenizado e extrato de Neurospora deficiente em zinco em concentrações normais. Em relação ao crescimento do microrganismo nos cinco experimentos houve uma redução nos meios deficientes em zinco que variou de 37 a 59% em comparação com o observado nos controles. Testando as doses 0-0,02-0,10-2,0-20-100 e 600 γ de zinco por mililitro de meio, os autores verificaram que a dose de 2,8 γ/ml foi a que maior percentagem de crescimento proporcionou. As deficiências de outros elementos (manganês, ferro e magnésio) foram testadas. A omissão de manganês e ferro aparentemente teve muito pouco efeito sobre a concentração das enzimas estudadas, enquanto que a deficiência de cálcio resultou numa perda de atividade da álcool desidrogenase, um aumento significativo na concentração de NADase e não pareceu baixar o nível de enzima sintetizadora do triptofano. A deficiência em magnésio produziu ligeiras reduções na álcool desidrogenase e na enzima sintetizadora de triptofano em relação ao controle, porém estas variações não pare

ceram ser significantes. Os autores concluíram que a deficiência de zinco em Neurospora leva não simplesmente à produção de menos micélio, mas de micélio com características metabólicas drasticamente alteradas, as quais envolvem, além de desaparecimento virtual de certas atividades enzimáticas, aumentos acentuados na atividade de outras enzimas. As concentrações de certas proteínas enzimáticas dentro da célula diminuem, enquanto que outras aumentam. Determinações do teor de proteína total nos extratos mostraram que o efeito líquido é um profundo decréscimo na concentração de proteína. Uma vez que este quadro não se modifica pela adição de aminoácidos, purinas, pirimidinas e vitaminas ao meio deficiente em zinco parece que o efeito básico da deficiência está não na síntese destas unidades mas em seus metabolismos subsequentes. Se o zinco está relacionado diretamente com o processo de incorporação de aminoácidos em proteínas ou se seu papel neste processo é o resultado da ação em outro sítio, o fato é que o principal resultado da deficiência de zinco é a falta de síntese de proteínas enzimáticas de uma maneira normal. O mecanismo pelo qual as concentrações de certas enzimas podem ser aumentadas em células nutricionalmente deficiente ainda é desconhecido. Os autores levantaram a hipótese de que estas enzimas são proteínas de estruturas relativamente simples que podem ser sintetizadas mesmo na ausência de certas reações chaves que são necessárias para a síntese de moléculas proteicas mais complexas.

VALLEE e NEURATH (1955) encontraram que o zinco é um componente estrutural e funcional da carboxipeptidase e participa nos mecanismos de sua ação catalítica. O metal se acha ligado firmemente à proteína e parece ser indispensável para a atividade enzimática.

WACKER e VALLEE (1959) detectaram a presença de quantidades significantes de metais (magnésio, cálcio, estrôncio, bário, alumínio, crô-

mio, manganês, ferro, níquel, cobre e zinco) em RNA de diferentes fontes, desde microrganismos até vertebrados biologicamente complexos. Os autores sugerem que eles podem desempenhar um papel na manutenção da configuração da molécula de RNA, talvez ligando bases de purina ou pirimidina, ou ambos, através de ligações covalentes. Também foi detectada a presença de metais em DNA, porém em quantidades muito menores.

PATTERSON (1960) mostrou que um suplemento de cálcio, cobre, cobalto e zinco triplicou o crescimento de Mycobacterium tuberculosis avium e aumentou a produção de porfirina de cerca de 62 vezes após 45 dias de incubação. A adição de quantidades iguais de zinco ou cobalto ao meio, separadamente, também estimulou tanto o crescimento quanto a produção de porfirina, mas em qualquer caso o efeito foi apenas cerca da metade do induzido pelo suplemento completo. O cobre sozinho não teve nenhum efeito nem no crescimento nem na produção de porfirina. O autor conclui que o efeito do suplemento completo é em grande parte, se não unicamente, devido ao zinco e cobalto.

PRICE e VALLEE (1962) verificaram que a não adição de zinco diminuía acentuadamente o crescimento de Euglena gracilis. Partindo de doses crescentes de 0 a 16 µg/l. obtiveram uma relação linear, exceto no estágio inicial do crescimento. Comparando o desenvolvimento do microrganismo num meio contendo $10^{-5}M$ de zinco com o ocorrido sem adição do elemento verificaram que após 8 dias e meio a cultura deficiente em zinco paralisou seu crescimento. No entanto, a adição de $10^{-5}M$ do elemento no sétimo dia restaurou o crescimento após 24 horas, atingindo o mesmo nível da cultura sem deficiência de zinco aos 11 dias. Esta resposta revelou que a paralização no crescimento não se deve ao acúmulo de substâncias tóxicas mas à exigência do metal. Os autores não chamam atenção, porém, na cultura deficiente em zinco,

para o tempo que a alga levou para reiniciar seu rápido crescimento após a adição do metal. Isto pode revelar que o zinco é necessário para a síntese de substâncias indispensáveis ao bom desenvolvimento do microrganismo e que, pelo menos, uma destas substâncias é sintetizada na fase inicial do crescimento. As análises de nitrogênio revelaram resultados contrários aos observados em relação ao crescimento. A percentagem de nitrogênio total nas células deficientes em zinco foi o dobro da das células sem deficiência na fase exponencial do crescimento e aproximadamente o triplo daquelas da fase estacionária. Comparando os teores de metais das células com o teor de metal total do meio, os autores observaram que com exceção do zinco, cobre e ferro, a concentração de metais encontrada nas células representou pequenas frações dos metais totais adicionados ao meio. Como ferro e cobre não foram limitantes para o crescimento em concentrações muito baixas pareceu provável que apenas o zinco foi limitante para o crescimento do microrganismo.

WACKER (1962), estudando as alterações no teor de ácidos nucleicos, proteínas e metais em Euglena gracilis decorrentes da deficiência de zinco, verificou que quando este organismo foi desenvolvido na ausência de luz e num meio contendo $1,5 \times 10^{-7}$ M de zinco o desenvolvimento foi marcadamente reduzido comparado com a cultura crescida no escuro no meio normal, onde o teor de zinco era $1,5 \times 10^{-5}$ M. A adição de zinco à cultura deficiente restaurou o crescimento normal. O mesmo não ocorreu quando outros metais, aminoácidos, bases nitrogenadas ou nucleotídeos foram adicionados. Concorrendo com os trabalhos de PRICE e VALLEE (1962), anteriormente citados, o autor achou que a deficiência de zinco é acompanhada por alterações importantes no teor de proteína e ácido nucleico dos organismos, as quais consistem de uma redução na síntese protéica, indicada por um aumento em precursores de proteína como, por exemplo, aminoácidos, e um decréscimo em RNA. Em con

sequência, ainda, da deficiência em zinco há um aumento no volume e peso das células individuais, chegando a aumentar aproximadamente cinco vezes em relação às células crescidas em meio zinco-suficiente, e duplicação do teor de DNA, o que demonstra uma paralização mitótica. Baseado nos dados obtidos, o autor enfatiza que não se pode afirmar sem erro que os efeitos observados sobre o metabolismo das proteínas e ácidos nucleicos derivam diretamente da deficiência do microelemento no RNA desses microrganismos. Como o zinco faz parte de um grande número de enzimas, é possível que a sua falta leve a uma alteração no sistema enzimático acarretando defeitos na síntese de algum componente do processo de elaboração da proteína. O fato da adição de aminoácidos, purinas, pirimidinas ou seus nucleotídeos não superar os danos causados pela deficiência sugere que estes não se dão apenas sobre a síntese de precursores, mas sobre a síntese de proteína propriamente dita. Os efeitos da deficiência de zinco não comprometem simplesmente o metabolismo oxidativo no sentido de não fornecer energia suficiente para o processo de síntese proteica, uma vez que há um grande acúmulo de polifosfato ácido-insolúvel, chegando a constituir uma das principais características das células deficientes. Como o polifosfato se origina de moléculas de ATP pode-se deduzir que os sistemas geradores de energia estão funcionando eficientemente. O autor salienta que a identificação e localização de defeitos moleculares induzidos por deficiência em zinco parece possível e, desta maneira, pode-se chegar a uma conclusão a respeito do papel de metais no RNA.

TRUMPY e MILLIS (1963), estudando a produção de ácido cítrico por um mutante de Aspergillus niger, afirmam que o acúmulo de grandes quantidades deste ácido é resultante de uma função metabólica prejudicada do fungo num meio ácido com alto teor de açúcar e com concentrações altamente controladas de outros nutrientes. Mostraram também que deficiências nutri-

cionais múltiplas, como de nitrogênio, fósforo, zinco e ferro, são de grande importância por limitar o crescimento, uma vez que este deve ser controlado para se obter uma boa produção de ácido. Embora o crescimento deva ser limitado, isto, por si só, não é suficiente para dar altas produções de ácido cítrico. É necessária a presença de baixas concentrações de certos metais traços. O mutante de A. niger para a produção de ácido cítrico utilizado foi muito mais sensível ao zinco que ao cobre, ferro e manganês. Suportou maiores concentrações de microelementos que a linhagem paterna, porém a produção de ácido foi maior em baixas concentrações dos elementos, sendo o zinco o mais crítico. Os autores deixaram claro que a ação do zinco em concentrações mais elevadas, pelo menos para este mutante, é normalizar as funções metabólicas. Outros componentes do meio também podem exercer a mesma ação. O ferro em concentrações altas pode minimizar o efeito depressivo do zinco sobre a produção do ácido.

WEGENER et alii (1967), num estudo sobre o controle da formação de malato sintetase em Rhizopus nigricans, verificaram que o zinco exerce um notável efeito sobre o crescimento e atividades fisiológicas deste microrganismo. A adição de glicose ao meio de hidrolisado de caseína causou uma repressão na formação da enzima, a qual foi suprimida pela adição de zinco. Este elemento não teve nenhum efeito significativo sobre a formação da enzima quando adicionado isoladamente ao meio basal de hidrolisado de caseína. Entretanto, combinado com a glicose resultou na produção de malato sintetase num nível equivalente ao encontrado na cultura não reprimida. Além disso, o metal levou a uma quase completa utilização da glicose e a um aumento na síntese celular, indicando que o zinco suprime a repressão pela glicose efetuando a remoção de catabólitos repressores provenientes da mesma pela estimulação da incorporação de tais metabólitos em material ce-

lular. Foi determinado o nível da malato sintetase formada num meio sintético, que favorece a formação de ácido fumárico, contendo 5% de glicose e 0,2% de sulfato de amônio, portanto uma alta relação carbono/nitrogênio. Os resultados obtidos nas culturas com e sem adição de zinco mostraram que a adição do metal duplicou a produção da enzima, aumentou o peso celular e esgotou totalmente a glicose adicionada indicando, novamente, que o aumento no nível da enzima foi produzido, provavelmente, pelo incremento na utilização de glicose e síntese celular provocado pela adição do metal. Assim, parece que fatores que estimulam a síntese celular e remoção de glicose ou seus catabólitos favorecem a formação da malato desidrogenase. Com base nisto, seria de se esperar que um aumento na fonte de nitrogênio disponível e um ajuste na relação C/N para um valor mais favorável à síntese celular resultassem num aumento da formação desta enzima. Usando concentrações de sulfato de amônio de 0,2 a 2% os autores obtiveram aumentos gradativos atingindo cerca de três vezes mais enzimas na concentração de 2,0%, quando comparada com a de 0,2%. A adição de zinco aumentou ainda mais, tendo duplicado a produção alcançada nas culturas com 2,0% de sulfato de amônio e sem zinco. Analisando o efeito do acetato e do glicolato, ambos encontrados como estimuladores da formação da malato sintetase em muitos organismos, observaram que o acetato adicionado ao meio basal duplicou a produção em relação ao meio basal sem acetato, enquanto que o glicolato aumentou aproximadamente cinco vezes. O efeito indutivo do acetato aumentou significativamente quando zinco foi adicionado. O mesmo não ocorreu, porém, com a adição do metal ao glicolato. Esta diferença de comportamento sugeriu a possibilidade de haver no microrganismo em estudo, duas enzimas malato sintetases reguladas por vias diferentes. Através da inativação térmica foi comprovada a presença das duas enzimas, sendo a induzida pelo acetato mais sensível ao

calor que a induzida pelo glicolato.

PECIULIS et alii (1969) encontraram que cobalto, ferro, iodo, manganês, molibdênio e zinco estimulam a propagação de leveduras, enquanto que boro apresenta um efeito inibitório. A biossíntese de proteínas é afetada de diferentes maneiras. Alguns microelementos estimulam consideravelmente o aumento no teor de nitrogênio total, como o molibdênio e o zinco, outros a um grau menor, como o cobalto, o iodo e o manganês e, ainda, outros reduzem a quantidade de nitrogênio total, como o ferro a partir de 0,02mg/l e o boro a partir de 0,0115 mg/l. Sobre a biossíntese de aminoácidos os microelementos também influenciam diferentemente não alterando sua composição química mas reduzindo sua quantidade. O zinco reduz o teor de aminoácidos livres a mais da metade, inclusive de aminoácidos dicarbônicos, arginina, cistina, asparagina e ácido glutâmico. O molibdênio reduz consideravelmente o acúmulo de aminoácidos dicarbônicos, alanina e lisina. Por outro lado, tanto o zinco como o molibdênio produzem um aumento no acúmulo de aminoácidos ligados, indicando que esses microelementos estimulam a incorporação de aminoácidos em proteínas. Além disso, os autores verificaram que leveduras crescidas em licor sulfítico produziram maiores quantidades de ácido fólico, tiamina e riboflavina quando determinadas concentrações de manganês, cobalto, molibdênio, boro e zinco eram adicionadas, sendo o aumento de 26-52% quando comparado com um controle. Quantidades excessivas dos micronutrientes foram tóxicas tanto para o crescimento das leveduras como para o acúmulo de proteínas e vitaminas.

SÁNCHEZ-MARROQUÍN et alii (1970) verificaram que uma maior produção de ácido cítrico por Aspergillus niger foi obtida quando ferro, zinco e cobre estavam presentes em baixas concentrações, enquanto que uma maior produção de massa micelial ocorreu quando concentrações mais elevadas dos

três elementos foram empregadas. Estes dados estão de acordo com resultados apresentados por outros pesquisadores anteriormente citados.

McHAN e JOHNSON (1970), analisando a importância do zinco e de aminoácidos para o crescimento de Monascus purpureus, verificaram que interações do zinco com aminoácidos em meio mínimo onde glicose foi também uma fonte de carbono levando a um aumento no crescimento do microrganismo eram repetidamente notadas. Doze dos quatorze aminoácidos e todas as combinações de aminoácidos testadas em meio mínimo com adição de zinco produziram crescimentos significativamente maiores que os obtidos com os mesmos meios sem adição de zinco. Além disso, os ligeiros efeitos inibitórios de várias combinações de aminoácidos ocorridos na ausência do zinco tenderam a desaparecer na presença do microelemento. Alguns aminoácidos estimularam mais o crescimento que outros, porém quase todo efeito estimulatório foi aumentado pela adição de zinco. Os autores concluem que, além dos possíveis efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos, os principais efeitos do zinco estão também envolvidos com os mecanismos regulatórios que controlam interrelações entre os metabolismos dos carboidratos e do nitrogênio em M. purpureus.

WHITE e JOHNSON (1971), cultivando Helminthosporium cynodontis em meio de glicose-peptona-extrato de levedura agar (GPY) e Czapek -Dox, observaram uma grande diferença no crescimento e pigmentação das culturas. No meio de Czapek-Dox, o micélio se apresentou distintamente vermelho devido à produção abundante de cinodontina, enquanto que no meio GPY ocorreu um maior crescimento sem produção deste pigmento, mesmo após 50 dias de incubação, aparecendo, em seu lugar, uma coloração verde-escura mais característica da maioria das espécies de Helminthosporium na maior parte das condições culturais. Na composição do meio GPY estão presentes peptona e extrato de

levedura, os quais estão ausentes no meio de Czapek-Dox. Assim, peptona, extrato de levedura e suas respectivas cinzas foram adicionados ao meio basal de Czapek-Dox, isoladamente e em várias combinações, para se determinar qual ou quais componentes modificam o meio de Czapek-Dox de modo a reproduzir alguns efeitos observados no meio GPY. A adição de extrato de levedura aumentou o crescimento de mais de 2,5 vezes em relação ao controle, em cinco dias, e inibiu completamente a produção de cinodontina. A adição de peptona também aumentou o crescimento, porém não tanto quanto o extrato de levedura e aumentou a formação de pigmento. Quando cinzas de extrato de levedura foram adicionadas isoladamente ou em combinação com cinza de peptona foram obtidos resultados praticamente similares aos observados quando da adição de extrato de levedura, sugerindo que metais e, particularmente, os presentes no extrato de levedura, são reponsáveis pelo tipo de crescimento obtido no meio GPY. Sete elementos foram testados, dentre os quais ferro e zinco. Os metais foram adicionados, individualmente e em várias combinações, ao meio de Czapek-Dox para se averiguar seus efeitos sobre a linhagem RPP de Helminthosporium cynodontis. Em todos os casos em que o zinco foi adicionado, tanto isoladamente como em combinação com um ou mais elementos, o crescimento foi significativamente aumentado e a cinodontina completamente ausente. A adição de ferro ou boro diminuiu ligeiramente o crescimento, enquanto que cobre e cobalto reduziram consideravelmente o desenvolvimento do fungo. Tanto o cobre como o cobalto se apresentaram tóxicos nas concentrações usadas quando adicionados isoladamente, porém esta aparente toxicidade foi marcadamente reduzida na presença de outros íons metálicos, particularmente o zinco. Ferro, cobre e cobalto não apresentaram efeito significativo sobre a produção de pigmento, ao passo que o boro aumentou ligeiramente o teor do mesmo. O manganês, isoladamente, pouco efeito exerceu sobre o cresci

mento, porém aumentou ligeiramente a pigmentação. Em combinação com o zinco, o manganês elevou o efeito promotor de crescimento do zinco de aproximadamente 100% em relação ao meio contendo apenas zinco. Os resultados mostraram que o zinco é o principal responsável pelos efeitos do meio GPY e do extrato de levedura sobre a linhagem RPP de H. cynodontis. O estudo de diferentes concentrações de zinco (0 a 12,2 μM) sobre a síntese de pigmento e crescimento do fungo revelou que o aumento no teor de zinco diminuiu a produção do pigmento, chegando a quase desaparecer em concentrações de 6,1 μM , e aumentou o crescimento celular. A taxa de consumo de glicose e fosfato se apresentou aumentada na presença de zinco, confirmando dados relatados por outros pesquisadores.

COCUCCI e ROSSI (1972) mostraram, através de dados bioquímicos e morfológicos, que o zinco é essencial para o crescimento de Rhodotula gracilis, sendo seus efeitos mais marcantes as sínteses líquidas de RNA e proteína. A síntese de DNA pareceu não ser muito afetada. A adição do microelemento a culturas deficientes não estimulou nem inibiu a respiração, metabolismo de aminoácido e síntese de lipídeos. Estes resultados sugerem um efeito específico do elemento sobre as sínteses de RNA e proteína. A microscopia eletrônica revelou algumas características dos efeitos da deficiência de zinco. As células no início da fase estacionária mostraram, nitidamente, um aspecto de citoplasma degradado parecendo ser delimitado por uma única membrana e contendo, às vezes, mitocôndrias parcialmente degradadas e estruturas semelhantes aos vacúolos autofágicos e lisossomos.

WEGENER e ROMANO (1973) determinaram o efeito do zinco sobre o crescimento e produção de RNA, DNA e proteína por Rhizopus nigricans. A adição do microelemento estimulou imediatamente a síntese de RNA, enquanto que a síntese de proteína demorou mais a atingir a taxa de síntese máxima,

porém ao atingi-la tanto RNA como proteína cresceram na mesma taxa relativa. Os níveis de DNA aumentaram muito pouco em relação aos de RNA e proteína. O aumento no crescimento e utilização de glicose foi similar ao da síntese proteica. O mecanismo pelo qual o zinco estimula a síntese de RNA não é conhecido. Segundo os autores, o aumento em nucleotídeos livres, após adição do metal pode indicar um papel na síntese de purinas e pirimidinas ou nucleotídeos.

VEGA e TOURNEAU (1974) encontraram que a omissão de zinco resultou num decréscimo no peso seco de Whetzelinia sclerotiorum (Sclerotinia sclerotiorum) e na ausência de produção de esclerócio em três dos quatro isolados testados. Os autores esclarecem que a formação deste corpo de frutificação em um dos isolados pode ter sido devida a uma baixa exigência por zinco e presença de pequenas quantidades do elemento no meio.

WOLD e SUZUKI (1976) encontraram que a concentração de zinco determina o curso da produção de ácido cítrico por Aspergillus niger. Altas concentrações do metal mantinham as culturas na fase de crescimento, onde não havia acúmulo do ácido e níveis baixos limitavam o crescimento e o organismo passava à fase de acúmulo do ácido. A adição de zinco às culturas acidogênicas resultava na reversão para a fase de crescimento e paralização do acúmulo de ácido. Estes resultados estão de acordo com relatos de outros pesquisadores anteriormente citados.

GUPTA et alii (1977) observaram que o crescimento e produção de aflatoxina por Aspergillus parasiticus foram inibidos pela deficiência de zinco.

A utilização da raiz de mandioca para o desenvolvimento de microrganismos pode ser limitada pela presença de microelementos em níveis

não adequados.

GRAY e ABOU - EL - SEUD (1966), usando como fonte de carbono, para o crescimento de dois isolados de Cladosporium, a farinha de mandioca, verificaram que uma maior produção pode ser obtida pela adição de certas vitaminas e minerais ao meio de cultura e que depende do microrganismo usado. A produção a partir do Cladosporium cladosporioides I-83 quase que dobrou quando foram adicionados tais aditivos. O mesmo não ocorreu com o Cladosporium cladosporioides I-75 que teve sua produção reduzida de aproximadamente um terço na presença dos aditivos. Os autores chamam atenção para as diferenças individuais existentes entre os microrganismos e para o fato de que o sucesso do uso de cada material fresco contendo carboidrato depende, em grande parte, da seleção do microrganismo a ser usado. Se um determinado microrganismo cresce bem e sintetiza proteína eficientemente a partir de um substrato fresco não se pode dizer que este mesmo microrganismo terá o mesmo sucesso com outro substrato fresco ou com o mesmo substrato tendo sido processado diferentemente.

BARRIOS e BRESSANI (1967) verificaram que as concentrações de ferro, determinadas, em diversas variedades de mandioca provenientes da zona subtropical seca e tropical seca da Guatemala, apresentaram grandes diferenças mesmo entre as variedades de uma mesma região.

STANTON e WALLBRIDGE (1969), utilizando amido de mandioca como substrato para a produção de proteína por fungos do gênero Rhizopus, observaram que ferro, zinco e manganês podem ser inibitórios ou estimulatórios dependendo da raiz utilizada.

GREGORY, et alii (1977), produzindo proteína fúngica a partir

de mandioca através de um mutante não esporogênico de Aspergillus fumigatus, verificaram que o amido de suas raízes parece suprir quantidades adequadas de todos os elementos minerais exigidos pelo microrganismo, exceto enxofre e, possivelmente, zinco.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo do Material

Raízes de mandioca da variedade IAC-YARA (1416-67) foram fornecidas pela Estação Experimental de Piracicaba, São Paulo. Foram lavadas, descascadas, passadas em ralador de modo a se obter finas tiras semelhantes a talharins para facilitar a secagem, pesadas, colocadas em bandejas e deixadas em estufa com circulação de ar forçada a 45°C até estabilização do peso, sendo desta maneira, determinado o teor de umidade. O tempo decorrido entre a colheita das raízes e seu preparo para desidratação foi cerca de três horas. As tiras bem secas foram moídas e, em seguida, passadas em peneira de 150 mesh para eliminação das fibras. O material foi guardado em frascos âmbar hermeticamente fechados. Foi tomada uma amostra para determinações de ferro e zinco, as quais foram realizadas na Seção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, através do Espectrofotômetro de Absorção Atômica Perkin-Elmer modelo 306.

Toda a vidraria utilizada foi lavada com detergente, água destilada, ácido clorídrico a 20% , água desmineralizada, $(\text{NH}_4)_3 \text{EDTA}$ a 10% com pH 8 (preparado com 100 g de ácido etileno diamino tetracético e cerca de 500 ml de água desmineralizada, acertando-se o pH a 8 com hidróxido de amônio e ajustando-se o volume final a um litro) e, finalmente, com água desmineralizada.

Foram preparadas soluções estoque de ferro e zinco, com água desmineralizada, ambas contendo 500 ppm de cada elemento, respectivamente.

4.2. Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo

Foram ensaiados 3 fungos (Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625, cedidos pela Micoteca do Instituto Zimotécnico do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e Fusarium sp., isolado de raiz de mandioca com cerca de 7 dias após ter sido colhida e deixada, acidentalmente, ao ar livre) e 8 valores de pH (de 2 a 9) seguindo-se o esquema fatorial.

O meio foi preparado contendo por litro 30 gramas de amido de mandioca e uréia na quantidade suficiente para fornecer 1,2 gramas. Foi gelatinizado entre 60-70°C durante 15 minutos, resfriado em água corrente e distribuído em 8 frascos de Erlenmeyer de 500 ml para ajustagem do pH nos valores de 2 a 9 , a qual foi feita com ácido sulfúrico 2 N e hidróxido de sódio 2 N. Em seguida, foi distribuído em 72 frascos de 250 ml, cada um

contendo 50 ml de meio, sendo 9 repetições para cada valor de pH e 3 para cada fungo. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos.

Os inóculos foram obtidos de culturas de 4 dias de idade desenvolvidas em meio de malte agar, em placas de Petri, tomando-se discos de 5 mm de diâmetro da periferia das colônias.

Tendo sido feita a inoculação, os frascos foram colocados num agitador regulado para 120 batidas por minutos. A temperatura foi mantida entre 28-30°C.

Após 4 dias de incubação mediu-se o pH dos meios e, em seguida, o material foi filtrado para a determinação do peso seco em estufa até peso constante, na temperatura de 60°C de modo a garantir que houvesse inalteração no perfil de aminoácidos (SPICER, 1971).

4.3. Ensaio de Duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio) para o Crescimento de Fusarium sp., Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca

Foram preparados 500 ml de dois meios, ambos contendo 3 gramas de amido por cento e uréia ou nitrato de amônio, respectivamente, nas quantidades suficientes para fornecerem 0,12 gramas de nitrogênio por cento. Os meios foram gelatinizados e o pH ajustado para 3. Em seguida, foram distribuídos em 18 frascos de Erlenmeyer de 250 ml, cada um contendo 50 ml de meio, sendo 9 repetições para cada fonte de nitrogênio e 3 para cada fungo, após o que foram esterilizados. Os inóculos foram obtidos de

maneira similar à descrita anteriormente.

Após 4 dias de incubação num agitador regulado para 120 batidas por minuto e numa temperatura de 28-30°C, mediu-se o pH final dos meios e o material foi filtrado para a determinação do peso seco.

4.4. Ensaio de Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro para o Crescimento de Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia

Foram testados níveis de 0 a 4 de zinco e ferro, correspondentes às concentrações de 0,45 - 5,45 - 10,45 - 15,45 e 20,45 ppm e 0,51 - 5,51 - 10,51 - 15,51 e 20,51 ppm, respectivamente, de acordo com o esquema fatorial.

Os meios foram preparados em 25 frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 3 gramas por cento de amido de mandioca e uréia na quantidade suficiente para fornecer 0,12 gramas de nitrogênio por cento. As diferentes doses de ferro e zinco foram adicionadas tomando-se volumes de 0 - 2 - 4 - 6 e 8 ml tanto da solução de sulfato ferroso como da de sulfato de zinco, as quais continham 500 ppm de ferro e zinco, respectivamente, correspondentes aos níveis 0 - 1 - 2 - 3 e 4 de cada elemento, considerando-se que a quantidade de amido utilizada para cada 200 ml de meio possuía 0,45 ppm de zinco e 0,51 ppm de ferro. Após as devidas distribuições das soluções de sulfato de zinco nos 25 frascos, seus volumes foram completados a 200 ml

com água desmineralizada, cujo pH foi previamente ajustado para 3,0 com ácido sulfúrico 2N. Em seguida, os meios foram aquecidos a 60-70°C por 15 minutos para gelatinização do amido. Cada meio foi distribuído em 5 frascos de Erlenmeyer de 250 ml previamente marcados para 50 ml que foi a quantidade de meio utilizada. Assim, foram tomadas 3 repetições para cada tratamento. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos. O inóculo foi obtido como já descrito anteriormente.

A incubação foi realizada num agitador regulado para 120 batidas por minutos e numa temperatura de 28-30°C. Após 4 dias foram determinados os valores do pH final dos meios e o material filtrado para determinação do peso seco e nitrogênio total, a qual foi realizada na Secção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelo método Kjeldahl, através do Analisador Automático II da Technicon, multiplicando-se pelo fator 6,25 para transformação em proteína bruta (American Association of Cereal Chemists, Inc., 1962). O perfil de aminoácidos das produções obtidas com a melhor combinação encontrada foi determinado na Secção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, através do Analisador Automático de Aminoácidos Beckman Modelo 120 C.

4.5. Ensaio de Cinco Níveis de Ferro para o Crescimento de *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca, Uréia e Sulfato de Zinco na Concentração Ótima Encontrada

Foram testados níveis de 0 a 4 de ferro, correspondentes às concentrações de 15,51 - 20,51 - 25,51 - 30,51 e 35,51 ppm do elemento, man -

tendo-se o zinco na concentração ótima encontrada no ensaio anterior.

Os meios foram preparados em 5 frascos de Erlenmeyer de 200 ml contendo 3 gramas de carboidrato por cento, uréia na quantidade suficiente para fornecer 0,12 gramas de nitrogênio por cento e sulfato de zinco suficiente para 5 ppm do metal (a quantidade de amido utilizada forneceu 0,45 ppm). As doses de ferro foram adicionadas tomando-se volumes de 6 - 8 - 10 - 12 e 14 ml da solução de sulfato ferroso contendo 500 ppm do metal, correspondentes aos níveis 0 - 1 - 2 - 3 e 4, considerando que a quantidade de amido utilizada para cada 200 ml de meio possuía 0,51 ppm de ferro. Os volumes foram ajustados para 200 ml com água desmineralizada, cujo pH foi previamente ajustado para 3,0 com ácido sulfúrico 2 N, após o que os meios foram gelatinizados e cada um deles distribuído em 3 frascos de 250 ml previamente marcados para 50 ml, que foi a quantidade de meio utilizada, correspondentes a três repetições para cada tratamento. Após esterilização, os meios foram inoculados, incubados e, após 4 dias, tiveram seus valores de pH determinados e o material foi filtrado para determinação do peso seco, conforme descrito anteriormente.

4.6. Curva de Crescimento do *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca, Ureia, Sulfato de Zinco e Sulfato Ferroso

Tendo sido determinados o melhor microrganismo, o pH ótimo e as concentrações de zinco e ferro necessárias para produzir o maior desenvolvi

vimento do microrganismo, foi feita a sua curva de crescimento dentro das condições ótimas encontradas.

Como nos ensaios anteriores, o meio foi gelatinizado e o pH ajustado para o valor ótimo determinado. Em seguida, foi distribuído em 27 frascos de Erlenmeyer de 250 ml, os quais foram autoclavados, inoculados e incubados a 28-30°C em agitador regulado para 120 batidas por minuto.

As determinações do pH final, peso seco e proteína bruta foram feitas tomando-se três amostras em intervalos de 12 horas num período de 24 a 144 horas.

4.7. Determinação de Aflatoxina

Foi utilizado o método proposto por PONS et alii (1966) para detectar a presença de aflatoxina em micélio de Aspergillus niger IZ-9 desenvolvido em meio de amido de mandioca, uréia, sulfato de zinco e sulfato de ferro.

4.8. Análise Estatística

Na análise de variância foi feito o teste F para se verificar a significância da ação dos tratamentos sobre a produção de biomassa e proteína, assim como das interações e suas decomposições. Pela análise de regressão foram encontradas as equações que melhor se adaptam aos dados obser

vados em cada caso. Foi determinado o coeficiente de correlação linear entre a biomassa produzida por Aspergillus niger IZ-9 em meio de amido de mandioca e uréia, onde foram testados cinco níveis de ferro fixando-se o zinco na concentração ótima encontrada, e o pH final dos meios (GOMES, 1973). A comparação das médias foi feita pelo teste de Student-Newman-Keuls (STEEL e TORRIE, 1960).

5. RESULTADOS

5.1. Determinação do Teor de Micronutrientes no Amido de Mandioca

A análise de micronutrientes mostrou que o amido utilizado possuía 17 ppm de ferro e 15 ppm de zinco.

5.2. Escolha do Microrganismo e Determinação do pH Ótimo

Após a esterilização, observou-se que a viscosidade dos meios foi aumentando gradativamente do pH 2 ao 9.

Dentro da faixa de pH testada, o Fusarium sp. não cresceu em pH 2. Por este motivo, a análise estatística foi feita eliminando-se o tratamento com este valor de pH. Os resultados foram tomados em gramas de micélio (peso seco) por litro de meio (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp, Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 em Meio de Raiz de Mandioca e Uréia na Faixa de pH de 2 a 9 e Determinação do pH Final do Meio (Médias de três repetições)

pH Inicial	<u>Fusarium</u> sp.		<u>A. niger</u> IZ-9		<u>A. wentii</u> IZ-1625	
	pH Final	Peso Seco (g/l)	pH Final	Peso Seco (g/l)	pH Final	Peso Seco (g/l)
2	3,0	-	2,8	8,11	6,0	4,35
3	8,1	2,94	3,9	9,66	6,2	8,28
4	8,4	2,39	3,8	9,33	6,5	6,19
5	8,3	3,02	3,5	7,08	6,3	6,24
6	8,4	2,12	3,8	3,69	7,3	4,92
7	8,3	3,01	6,1	1,26	6,6	6,89
8	8,5	3,36	5,9	1,65	6,1	7,63
9	8,4	3,38	6,5	1,49	6,7	7,74

A análise de variância (Tabela 2), revelou haver diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade, pelo menos, entre duas produções obtidas devido aos microrganismos e aos valores de pH. A interação fungos x pH mostrou-se altamente significativa a nível de 1% de probabilidade, indicando que pelo menos um dos microrganismos se comporta de maneira distinta nos diferentes valores de pH testados.

Tabela 2. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp. , Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 3 a 9

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fungos	2	163,99	81,99	154,71 **
pH	6	88,05	14,68	27,69 **
Int. Fungos x pH	12	191,89	15,99	30,17 **
(Tratamentos)	(20)	(443,93)	(22,20)	(41,88 **)
Resíduo	42	22,14	0,53	
Total	62	466,07		

** - Significativo $p \leq 0,01$

C.V. = 10,88%

Pelo desdobramento da interação (Tabela 3), pode-se observar que apenas o Fusarium sp. não apresentou variações significativas, indicando que a baixa produção observada independe do pH inicial. Tanto o Aspergillus niger IZ-9 como o Aspergillus wentii IZ-1625 apresentaram variações altamente significativas a nível de 1% de probabilidade, sendo o primeiro mais sensível à variação de pH inicial.

A comparação da melhor média obtida com as demais pelo teste de Student - Newman - Keuls (Tabela 4) revelou que a média da maior produção, obtida pelo A. niger IZ-9 em pH 3, não diferiu significativamente apenas aquela dada pelo mesmo fungo em pH 4 e pelo A. wentii IZ-1625 em pH 3.

Tabela 3. Desdobramento da Interação Fungos x pH Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Fusarium sp., A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 3 a 9.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
pH / <u>Fusarium</u>	6	4,02	0,67	1,26 NS
pH / <u>A. niger</u>	6	252,02	42,00	79,25 **
pH / <u>A. wentii</u>	6	23,91	3,98	7,52 **
Resíduo	42	22,14	0,53	

NS - Não significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

Diferiu significativamente a nível de 5% de probabilidade da média produzida pelo A. niger IZ-9 em pH 9 e a nível de 1% de probabilidade, em relação a todas as demais.

Tendo sido estabelecida a superioridade do A. niger IZ-9 e do A. wentii IZ-1625 sobre o Fusarium sp., em relação à produção de biomassa, este fungo foi descartado e nova análise estatística foi feita considerando-se apenas os dois primeiros fungos e incluindo-se o pH 2.

A análise de variância (Tabela 5) revelou diferença altamente significativa a nível de 1% de probabilidade entre pelo menos dois dos valores de pH utilizados. A produção total do Aspergillus niger IZ-9 diferiu a nível de 1% de probabilidade daquela obtida pelo Aspergillus wentii IZ-1625, sendo o último o melhor em produção de biomassa. A interação pH x fungos revelou-se altamente significativa a nível de 1% de probabilidade,

Tabela 4. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) Dadas por Fusarium sp, Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 3 à 9.

Fungo	pH	Médias de Peso Seco (g/l)	Valores do Teste de Student - Newman-Kuels Para a Média 9,66
<u>A. niger</u> IZ-9	7	1,26	20,00 **
<u>A. niger</u> IZ-9	9	1,49	19,45 **
<u>A. niger</u> IZ-9	8	1,65	19,07 **
<u>Fusarium</u> sp.	6	2,12	17,95 **
<u>Fusarium</u> sp.	4	2,39	17,31 **
<u>Fusarium</u> sp.	3	2,94	16,00 **
<u>Fusarium</u> sp.	7	3,01	15,83 **
<u>Fusarium</u> sp.	5	3,02	15,81 **
<u>Fusarium</u> sp.	8	3,36	15,00 **
<u>Fusarium</u> sp.	9	3,38	14,95 **
<u>A. niger</u> IZ-9	6	3,69	14,21 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	6	4,92	11,29 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	4	6,19	8,26 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	5	6,24	8,14 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	7	6,89	6,60 **
<u>A. niger</u> IZ-9	5	7,08	6,14 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	8	7,63	4,83 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625	9	7,74	4,57 *
<u>A. wentii</u> IZ-1625	3	8,28	3,29 NS
<u>A. niger</u> IZ-9	4	9,33	0,79 NS
<u>A. niger</u> IZ-9	3	9,66	-

NS - Não significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

indicando que a variação obtida na produção não ocorreu devido a ação isolada dos dois fatores e que o comportamento de cada fungo é distinto nos diferentes valores de pH.

Tabela 5. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 2 a 9.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fungos	1	18,59	18,59	28,16 **
pH	7	136,17	19,45	29,47 **
Int. Fungos x pH	7	183,29	26,18	39,67 **
(Tratamentos)	15	338,05	22,54	34,15 **
Resíduo	32	21,25	0,66	
Total	47	359,30		

** - Significativo $p \leq 0,01$

C.V. = 11,17%

O desdobramento da interação pH x fungos (Tabela 6) mostrou que a variação do pH inicial afetou o desenvolvimento dos dois fungos, dando diferenças altamente significativas a nível de 1% de probabilidade, pelo menos, entre duas das produções obtidas para cada microrganismo. Percebe-se também que o A. niger IZ-9 é mais sensível à variação do pH inicial que o A. wentii IZ-1625. Isto mostra que a maior estabilidade em produção apresentada pelo A. wentii IZ-1625 foi a responsável pela indicação, dada na análise de variância, deste microrganismo como sendo o de escolha. No en

tanto, numa determinada faixa de pH desejada o Aspergillus niger IZ-9 se comportou, em termos de produção de biomassa, tão bem quanto o A. wentii IZ-1625 e, quanto à estabilidade, melhor do que o mesmo, como mostra a comparação das médias pelo teste de Student - Newman - Keuls (Tabela 7). Esta comparação revelou que entre a melhor média obtida produzida pelo A. niger IZ-9 em pH 3 e aquelas dadas pelo mesmo fungo em pH 2 e 4 e pelo A. wentii IZ-1625 em pH 3 e 9 não houve diferença significativa, porém entre a melhor média e as produzidas pelo A. wentii IZ-1625 em pH 2 e 4 e todas as outras médias foram encontradas diferenças altamente significativas a nível de 1% de probabilidade. Deste modo, foi selecionado o A. niger IZ-9 para o presente trabalho. Em relação à maior produção do A. wentii IZ-1625 foram encontradas diferenças altamente significativas a nível de 1% de probabilidade quando comparada com o A. niger IZ-9 em pH 6, 7, 8 e 9 e o A. wentii IZ-1625 em pH 2 e 6 e nenhuma diferença com as demais produções.

Tabela 6. Desdobramento da Interação Fungos x pH Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 2 a 9.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
pH / <u>A. niger</u>	7	279,32	39,90	60,46 **
pH / <u>A. wentii</u>	7	40,15	5,74	8,69 **
Resíduo	32	21,25	0,66	

** - Significativo $p \leq 0,01$

O pH final do meio foi determinado (Tabela 1). A partir do pH inicial 3, as culturas do Fusarium sp. mostraram elevação do pH para valores em torno de 8,3. Em pH 2, onde não se observou crescimento, o pH final foi 3. Para o A. niger IZ-9 houve elevação do pH nos valores iniciais 2 e 3 e redução nos demais. Finalmente, para o A. wentii IZ-1625 as culturas tiveram o pH elevado em valores iniciais de 2 a 6 e reduzido nos demais.

Tabela 7. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) Dadas por A. niger IZ-9 e A. wentii IZ-1625 na Faixa de pH de 2 a 9.

Fungo	pH	Médias de Peso Seco (g/l)	Valores do Teste Para a Média 9,66	Valores do Teste Para a Média 8,28	Valores do Teste Para a Média 3,69
<u>A. niger</u> IZ-9	7	1,26	17,87 **	14,94 **	5,17 **
<u>A. niger</u> IZ-9	9	1,49	17,38 **	14,45 **	4,68 **
<u>A. niger</u> IZ-9	8	1,65	17,04 **	14,11 **	4,34 **
<u>A. niger</u> IZ-9	6	3,69	12,70 **	9,77 **	-
<u>A. wentii</u> IZ-1625	2	4,35	11,30 **	8,36 **	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	6	4,92	10,09 **	7,15 **	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	4	6,19	7,38 **	4,45 NS	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	5	6,24	7,28 **	4,34 NS	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	7	6,89	5,89 **	2,96 NS	
<u>A. niger</u> IZ-9	5	7,08	5,49 **	2,55 NS	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	8	7,63	4,32 *	1,38 NS	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	9	7,74	4,09 NS	1,15 NS	
<u>A. niger</u> IZ-9	2	8,11	3,30 NS	0,36 NS	
<u>A. wentii</u> IZ-1625	3	8,28	2,94 NS	-	
<u>A. niger</u> IZ-9	4	9,33	0,70 NS		
<u>A. niger</u> IZ-9	3	9,66	-		

NS - Não significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

5.3. Ensaio de Duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio) para o Crescimento de *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* IZ-9 e *Aspergillus wentii* IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca.

Os resultados da produção de biomassa pelos três microrganismos, tomada em peso seco expresso em gramas/litro, assim como os valores do pH final dos meios estão apresentados na tabela 8. *Fusarium* sp. não mostrou nenhum crescimento quando nitrato de amônio foi utilizado como fonte de nitrogênio, enquanto que em uréia produziu crescimento, embora incipiente, quando comparado com os demais fungos em ambas as fontes de nitrogênio. Não tendo o *Fusarium* sp. apresentado crescimento em nitrato de amônio foi feita a análise estatística levando em consideração apenas os resultados produzidos pelo *Aspergillus niger* IZ-9 e pelo *Aspergillus wentii* IZ-1625.

Tabela 8. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* IZ-9 e *Aspergillus wentii* IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca Onde Foram Testadas duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônia) e Valores do pH Final dos Meios (Médias de Três Repetições).

Fungos	Uréia	pH Final	Nitrato de Amônio	pH Final
<i>Fusarium</i> sp.	2,10	8,4	-	3,5
<i>A. niger</i> IZ-9	11,59	4,0	9,63	3,0
<i>A. wentii</i> IZ-1625	9,00	5,8	6,67	2,3

A análise de variância (Tabela 9) revelou que os dois microrganismos se comportaram diferentemente, o mesmo ocorrendo com as fontes de

nitrogênio, tendo o A. niger IZ-9 mostrado melhores resultados que o A. wentii IZ-1625 e a uréia sido superior ao nitrato de amônio. Não houve interação significativa entre fungos e fontes de nitrogênio, o que indica que o A. niger IZ-9 foi melhor que o A. wentii IZ-1625 independentemente da fonte de nitrogênio e, da mesma forma, a uréia foi melhor que o nitrato de amônia independentemente dos fungos. Esses resultados foram confirmados comparando-se as médias pelo teste de Student-Newman-Keuls (Tabela 10), onde ficou demonstrado que a melhor média, produzida pelo A. niger IZ-9 quando a uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio, diferiu significativamente a nível de 1% de probabilidade das demais e a produção obtida pelo A. wentii IZ-1625 em uréia diferiu, também a nível de 1% de probabilidade, da obtida pelo microrganismo em nitrato de amônio.

Tabela 9. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 Apresentada na Tabela 8.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fungos	1	23,10	23,10	84,38 **
Fontes de Nitrogênio	1	13,80	13,80	50,41 **
Interação Fungos x Fontes	1	0,10	0,10	0,37 NS
(Tratamentos)	(3)	(37,00)	(12,33)	(45,05 **)
Resíduo	8	2,19	0,27	
Total	11	39,19		

NS - Não Significativo

C.V. = 5,67%

** - Significativo $p \leq 0,01$

Quanto ao pH final dos meios (Tabela 8) verificou-se que, em relação ao pH inicial, menores alterações ocorreram quando nitrato de amônio foi utilizado.

Tabela 10. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca Onde Foram Testadas duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio).

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 11,59	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 9,00
<u>A. wentii</u> IZ-1625 em nitrato de amônio	6,67	16,40 **	7,77 **
<u>A. wentii</u> IZ-1625 em uréia	9,00	8,63 **	-
<u>A. niger</u> IZ-9 em nitrato de amônio	9,63	6,53 **	
<u>A. niger</u> IZ-9 em uréia	11,59	-	

** - Significativo $p \leq 0,01$

5.4. Ensaio de Cinco Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45 e 20,45 ppm) e Cinco de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51 e 20,51 ppm) para o Crescimento de Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento) e Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento).

Os resultados deste ensaio foram avaliados em relação à produção de biomassa, tomada em peso seco expresso em gramas/litro (Tabela 11), e à produção de proteína bruta (Tabela 12).

Tabela 11. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro (Médias de três repetições).

	Zn ₀	Zn ₁	Zn ₂	Zn ₃	Zn ₄
Fe ₀	10,26	12,01	9,29	9,86	7,47
Fe ₁	10,44	13,49	9,66	8,06	1,47
Fe ₂	11,50	13,19	12,26	9,89	1,66
Fe ₃	12,44	13,82	11,70	11,18	6,73
Fe ₄	13,22	14,10	11,76	12,64	7,42

Zn₀ --- Zn₄ - Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45-20,45 ppm)

Fe₀ --- Fe₄ - Níveis de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51-20,51 ppm)

Tabela 12. Produção de Proteína Bruta (gramas/litros) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro (Média de três repetições).

	Zn ₀	Zn ₁	Zn ₂	Zn ₃	Zn ₄
Fe ₀	2,21	2,27	1,69	2,00	1,52
Fe ₁	2,25	2,90	1,88	1,68	-
Fe ₂	2,23	2,78	2,50	2,06	-
Fe ₃	2,41	2,94	2,35	2,19	1,41
Fe ₄	2,58	2,98	2,47	2,67	1,50

Zn₀ --- Zn₄ - Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45-20,45 ppm)

Fe₀ --- Fe₄ - Níveis de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51-20,51 ppm)

Em relação à produção de biomassa a análise de variância (Tabela 13) revelou que o fungo reagiu tanto aos diferentes níveis de ferro como de zinco, tendo havido um efeito interativo entre os dois elementos, indicando que as variações ocorridas resultaram de uma ação conjunta dos meses.

Tabela 13. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Ferro	4	99,44	24,86	31,87 **
Zinco	4	579,04	144,76	185,59 **
Interação Fe x Zn	16	119,28	7,46	9,56 **
(Tratamentos)	(24)	(797,76)	(33,24)	(42,62 **)
Resíduo	50	38,97	0,78	
Total	74	836,73		

** - Significativo $p \leq 0,01$

C.V. = 8,63%

A decomposição da interação ferro x zinco (Tabela 14) mostrou não haver diferença significativa apenas quando o nível 1 de zinco foi estudado em relação aos diferentes níveis de ferro, porém seu valor de F se aproximou muito do tabelado, razão pela qual foi feita análise de regressão, tendo-se encontrado diferença significativa em relação ao componente de primeiro grau.

Tabela 14. Decomposição da Interação Ferro x Zinco Relativa à Análise de Variância Apresentada na Tabela 13.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fe x Zn	16	119,28	7,46	9,56 **
Fe/Zn ₀	4	19,42	4,86	6,23 **
Fe/Zn ₁	4	7,85	1,96	2,51 NS
Fe/Zn ₂	4	23,17	5,79	7,42 **
Fe/Zn ₃	4	34,83	8,71	11,17 **
Fe/Zn ₄	4	115,44	28,86	37,00 **
Zn/Fe ₀	4	32,34	8,08	10,36 **
Zn/Fe ₁	4	238,60	59,65	76,47 **
Zn/Fe ₂	4	259,76	64,94	83,26 **
Zn/Fe ₃	4	86,01	21,50	27,56 **
Zn/Fe ₄	4	81,62	20,40	26,15 **
Resíduo	50	38,97	0,78	

NS - Não Significativo

** - Significativo $p \leq 0,01$

As equações de regressão que melhor estimam a produção de biomassa pelo microrganismo estão apresentadas na tabela 15 e as respectivas curvas nas figuras 1 e 2. Pela figura 2 verificou-se que, de um modo geral, a produção de biomassa foi esperada ser máxima num nível intermediário entre 0 e 1, ou seja, entre as doses 0,45 e 5,45 ppm do elemento.

Tabela 15. Equações de Regressão que Melhor Estimam a Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 Relativas às Decomposições da Interação Ferro x Zinco Apresentadas na Tabela 14.

Decomposições	Equações de Regressão
Fe/Zn ₀	$\hat{y} = 9,98733 + 0,79200x$
Fe/Zn ₁	$\hat{y} = 12,42200 + 0,45000x$
Fe/Zn ₂	$\hat{y} = 9,49799 + 0,73867x$
Fe/Zn ₃	$\hat{y} = 9,44513 - 0,83993x + 0,42690x^2$
Fe/Zn ₄	$\hat{y} = 7,58476 - 12,26953x + 6,58405x^2 - 0,88000x^3$
Zn/Fe ₀	$\hat{y} = 10,25668 + 10,07087x - 12,52497x^2 + 4,79043x^3 - 0,58304x^4$
Zn/Fe ₁	$\hat{y} = 10,44335 + 13,62923x - 15,51138x^2 + 5,61422x^3 - 0,68209x^4$
Zn/Fe ₂	$\hat{y} = 11,25334 + 3,78333x - 1,52000x^2$
Zn/Fe ₃	$\hat{y} = 12,44334 + 7,47134x - 9,15285x^2 + 3,50025x^3 - 0,44208x^4$
Zn/Fe ₄	$\hat{y} = 13,21672 + 7,96112x - 11,07951x^2 + 4,60392x^3 - 0,60556x^4$

Zn₀ --- Zn₄ - Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45-20,45 ppm)

Fe₀ --- Zn₄ - Níveis de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51-20,51 ppm)

Figura 1. Produção de Biomassa por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(.....), 2(-·-·-·), 3(----) e 4(-x-x-) de Zinco, Respectivamente, 0,45-5,45-10,45-15,45 e 20,45 ppm, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Ferro, Respectivamente, 0,51-5,51-10,51-15,51 e 20,51 ppm.

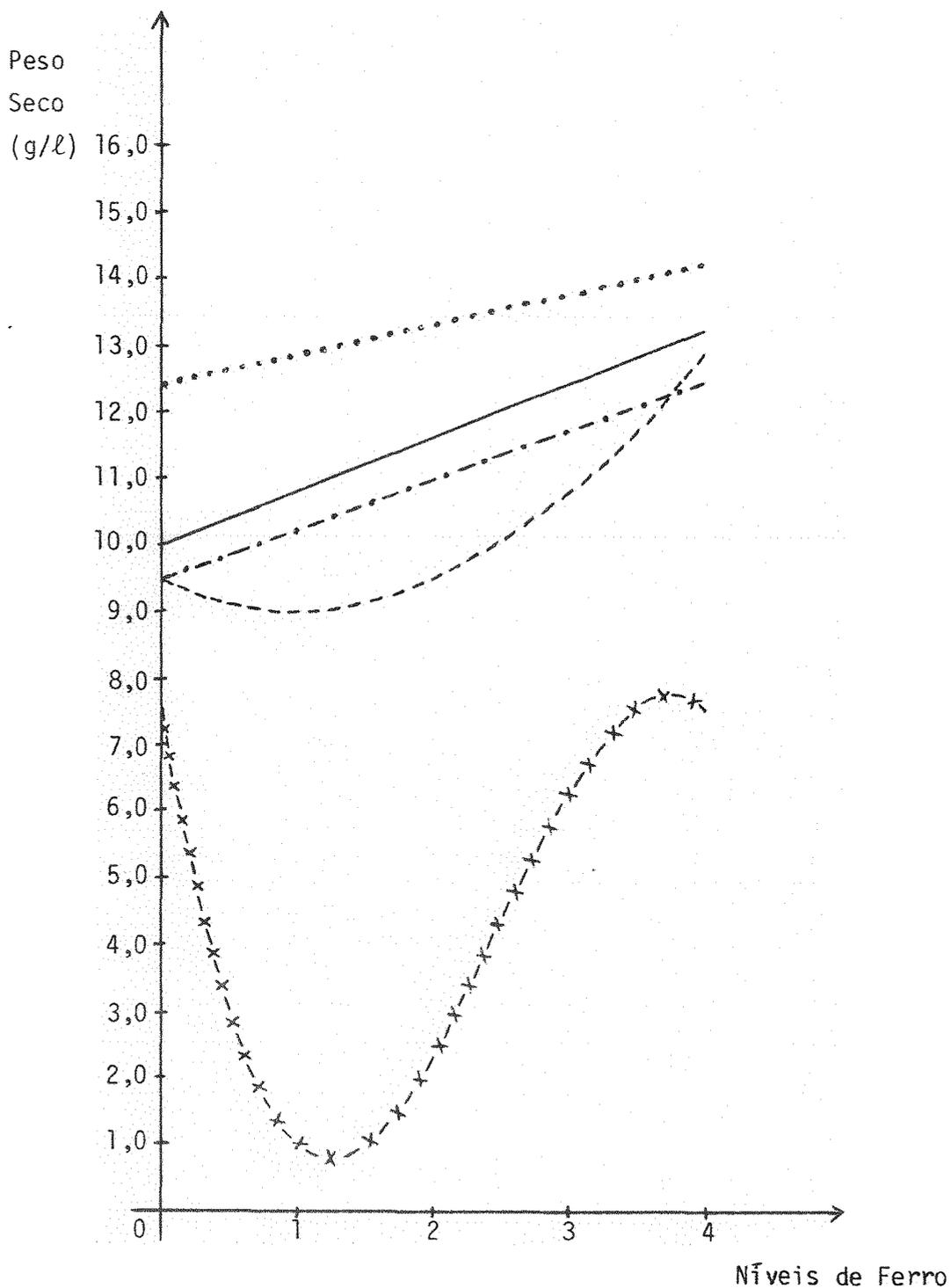
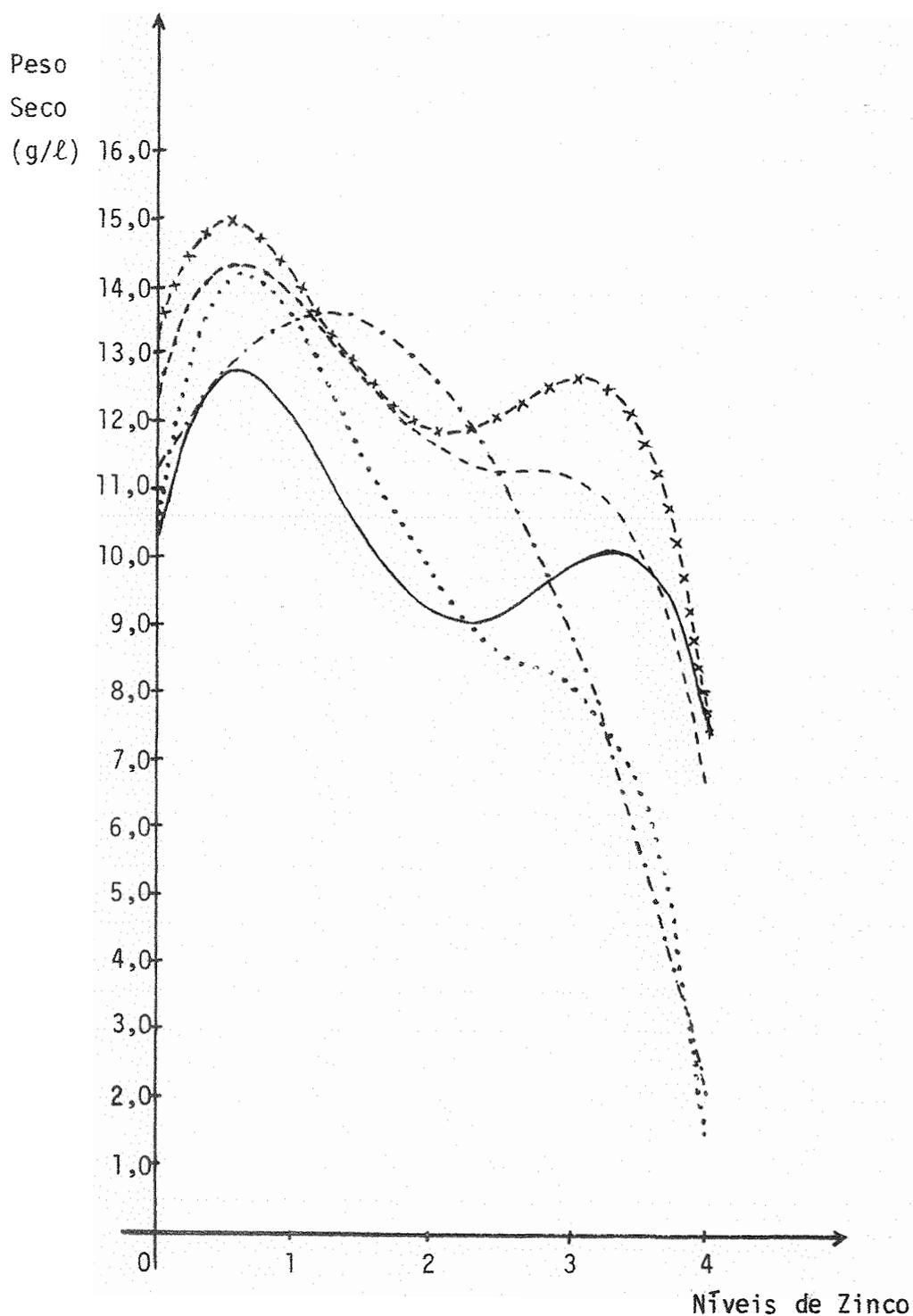


Figura 2. Produção de Biomassa por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(....), 2(-.-.-), 3(----) e 4(-x-x-) de Ferro, Respectivamente, 0,51-5,51-10,51-15,51 e 20,51 ppm, em Função dos Níveis 0-1-2-3 e 4 de Zinco, Respectivamente, 0,45-5,45-10,45-15,45 e 20,45 ppm.



Através da comparação das médias pelo teste de Student - Newman - Keuls (Tabela 16) verificou-se que a maior média, produzida na combinação dos níveis 4 de ferro e 1 de zinco, não diferiu significativamente das obtidas nas combinações dos níveis 1 de zinco com qualquer outro de ferro, zero de zinco com 3 e 4 de ferro, 2 de zinco com 2,3 e 4 de ferro e 3 de zinco com 4 de ferro. Todas as produções de biomassa obtidas com as demais combinações diferiram da maior média, sendo que nas combinações do nível 3 de ferro com 3 de zinco e 2 de ferro com zero de zinco as diferenças foram significativas apenas a nível de 5%, enquanto que as demais diferiram a nível de 1% de probabilidade.

Em relação à produção de proteína bruta foi eliminado o nível 4 de zinco da análise estatística porque nas combinações com os níveis 1 e 2 de ferro a produção de biomassa não foi suficiente para a análise de proteína (Tabela 12).

A análise de variância (Tabela 17) apresentou resultados similares aos obtidos para produção de biomassa. Assim, o fungo reagiu tanto aos níveis de ferro, como de zinco, os quais também mostraram efeito interativo, indicando que não agiram independentemente.

A decomposição da interação ferro x zinco (Tabela 18) mostrou diferença significativa quando os níveis de ferro foram estudados em relação a todos os de zinco, com exceção do nível zero e quando os níveis de zinco foram relacionados com todos os de ferro.

As equações de regressão que melhor estimam a produção de proteína bruta pelo microrganismo estão apresentadas na tabela 19 e as respectivas curvas nas figuras 3 e 4. Pela figura 4 a melhor produção de proteína bruta esperada ficou num nível intermediário entre 0 e 1 de zinco.

Tabela 16. Teste de Student - Newman - Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro.

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 14,10
Fe ₁ Zn ₄	1,47	24,76 **
Fe ₂ Zn ₄	1,66	24,39 **
Fe ₃ Zn ₄	6,73	14,45 **
Fe ₄ Zn ₄	7,42	13,10 **
Fe ₀ Zn ₄	7,47	13,00 **
Fe ₁ Zn ₃	8,06	11,84 **
Fe ₀ Zn ₂	9,29	9,43 **
Fe ₁ Zn ₂	9,66	8,71 **
Fe ₀ Zn ₃	9,86	8,31 **
Fe ₂ Zn ₃	9,89	8,25 **
Fe ₀ Zn ₀	10,26	7,53 **
Fe ₁ Zn ₀	10,44	7,18 **
Fe ₃ Zn ₃	11,18	5,73 *
Fe ₂ Zn ₀	11,50	5,10 *
Fe ₃ Zn ₂	11,70	4,71 NS
Fe ₄ Zn ₂	11,96	4,20 NS
Fe ₀ Zn ₁	12,01	4,10 NS

-Continua-

- Continuação -

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 14,10
Fe ₂ Zn ₂	12,26	3,61 NS
Fe ₃ Zn ₀	12,44	3,25 NS
Fe ₄ Zn ₃	12,64	2,86 NS
Fe ₂ Zn ₁	13,19	1,78 NS
Fe ₄ Zn ₀	13,22	1,73 NS
Fe ₁ Zn ₁	13,49	1,20 NS
Fe ₃ Zn ₁	13,82	0,55 NS
Fe ₄ Zn ₁	14,10	-

Fe₀ --- Fe₄ - Níveis de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51-20,51 ppm)

Zn₀ --- Zn₄ - Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45-20,45 ppm)

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 17. Análise de Variância Referente à Produção de Proteína Bruta (gramas/litro) por *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Ferro	4	2,93	0,73	14,60 **
Zinco	3	3,93	1,31	26,20 **
Interação Fe x Zn	12	1,56	0,13	2,60 **
(Tratamentos)	(19)	(8,42)	(0,44)	(8,86 **)
Resíduo	40	2,00	0,05	
Total	59	10,42		

** - Significativo $p \leq 0,01$

C.V. = 9,5%

Tabela 18. Decomposição da Interação Ferro x Zinco Relativa à Análise de Variância Apresentada na Tabela 17.

Causa de Variação ^o	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Fe x Zn	12	1,56	0,13	2,60 **
Fe/Zn ₀	4	0,30	0,08	1,50 NS
Fe/Zn ₁	4	1,02	0,26	5,10 **
Fe/Zn ₂	4	1,64	0,41	8,20 **
Fe/Zn ₃	4	1,53	0,38	7,60 **
Zn/Fe ₀	3	0,61	0,20	4,07 *
Zn/Fe ₁	3	2,60	0,87	17,40 **
Zn/Fe ₂	3	0,90	0,30	6,00 **
Zn/Fe ₃	3	0,95	0,32	6,35 **
Zn/Fe ₄	3	0,43	0,14	2,87 *
Resíduo	40	2,00	0,05	

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 19. Equações de Regressão que Melhor Estimam a Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 Relativas às Decomposições da Interação Ferro x Zinco Apresentadas na Tabela 18.

Decomposições	Equações de Regressão
Fe/Zn ₁	$\hat{y} = 2,48467 + 0,14500x$
Fe/Zn ₂	$\hat{y} = 1,77399 + 0,20267x$
Fe/Zn ₃	$\hat{y} = 1,94657 - 0,20080x + 0,09595x^2$
Zn/Fe ₀	$\hat{y} = 2,20999 + 0,88617x - 1,08005x^2 + 0,25390x^3$
Zn/Fe ₁	$\hat{y} = 2,25333 + 2,32498x - 2,09332x^2 + 0,41833x^3$
Zn/Fe ₂	$\hat{y} = 2,26367 + 0,66699x - 0,24833x^2$
Zn/Fe ₃	$\hat{y} = 2,41001 + 1,59548x - 1,31994x^2 + 0,25443x^3$
Zn/Fe ₄	$\hat{y} = 2,58000 + 1,38883x - 1,26161x^2 + 0,26943x^3$

Zn₀ --- Zn₃ - Níveis de Zinco (0,45 - 5,45 - 10,45 - 15,45 ppm)

Fe₀ --- Fe₄ - Níveis de Ferro (0,51 - 5,51 - 10,51 - 15,51 - 21,51 ppm)

A comparação das médias pelo teste de Student-Newman - Keuls (Tabela 20) revelou que a maior média, produzida pela combinação dos níveis 4 de ferro e 1 de zinco, não diferiu significativamente das obtidas nas combinações dos níveis 0 de zinco com 3 e 4 de ferro, 1 de zinco com qualquer outro de ferro, exceto o nível zero, 2 de zinco com 2 e 4 de ferro e 3 de zinco com 4 de ferro. Todas as outras combinações mostraram diferença.

Foi determinado o teor de aminoácidos no microrganismo desenvolvido no meio de amido de mandioca e uréia com as doses 4 de ferro (20,51 ppm) e 1 de zinco (5,45 ppm) e comparado com o padrão de aminoácidos essenciais determinado pela FAO (Tabela. 21). Verificou-se que o perfil de aminoácidos essenciais do microrganismo determinado nestas condições foi comparável ao padrão da FAO apenas em relação ao teor de treonina, mostrando-se inferior em relação a todos os demais aminoácidos essenciais.

Figura 3. Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 nos Níveis 1(.....), 2(-·-·-·-) e 3(----) de Zinco, Respectivamente, 5,45-10,45 e 15,45 ppm, em Função dos Níveis 0-1-2-3- e 4 de ferro, Respectivamente, 0,51-5,51-10,51-15,51 e 20,51 ppm.

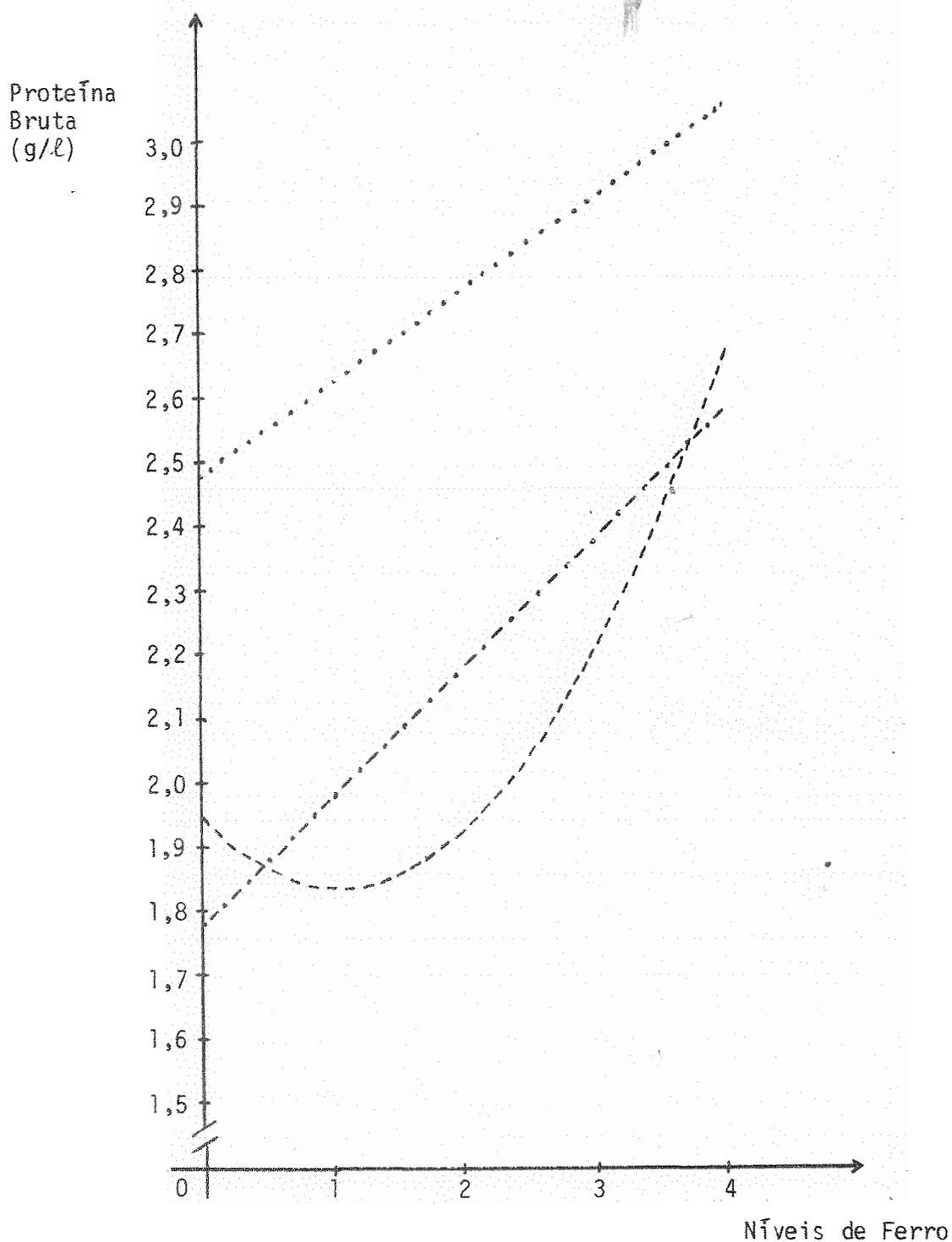


Figura 4. Produção de Proteína Bruta por *Aspergillus niger* IZ-9 nos Níveis 0(—), 1(...), 2(-.-.-), 3(----) e 4(-x-x-) de Ferro, Respectivamente, 0,51-5,51-10,51-15,51 e 20,51 ppm, em Função dos Níveis 0-1-2 e 3 de Zinco, Respectivamente, 0,45-5,45-10,45 e 15,45 ppm.

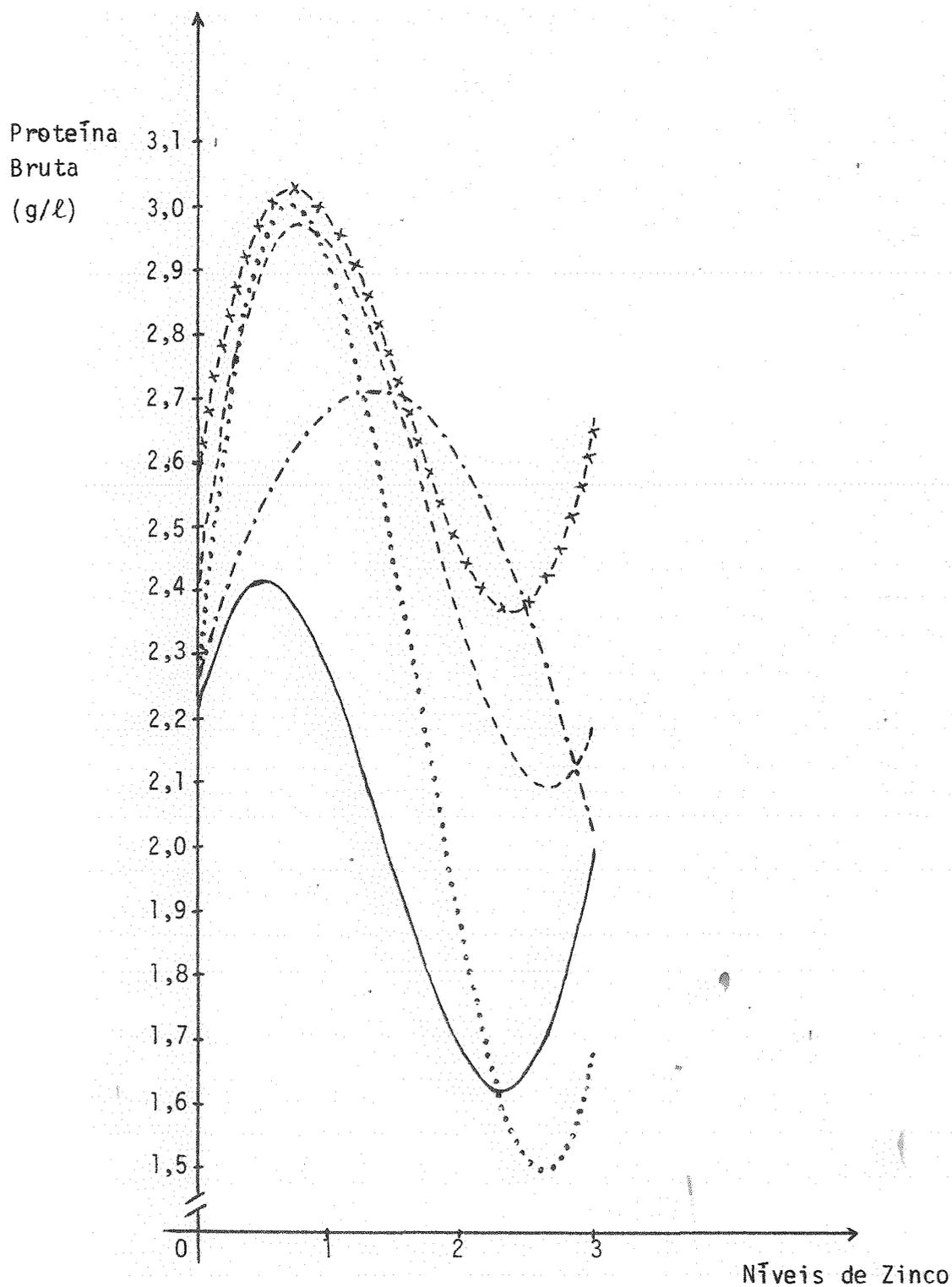


Tabela 20. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Proteína Bruta (Gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro.

Tratamentos	Médias	Valores do Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 2,98
Fe ₁ Zn ₃	1,68	10,00 **
Fe ₀ Zn ₂	1,69	9,92 **
Fe ₁ Zn ₂	1,88	8,46 **
Fe ₀ Zn ₃	2,00	7,54 **
Fe ₂ Zn ₃	2,06	7,08 **
Fe ₃ Zn ₃	2,19	6,08 **
Fe ₀ Zn ₀	2,21	5,92 **
Fe ₂ Zn ₀	2,23	5,77 *
Fe ₁ Zn ₀	2,25	5,62 *
Fe ₀ Zn ₁	2,27	5,46 *
Fe ₃ Zn ₂	2,36	4,77 *
Fe ₃ Zn ₀	2,41	4,38 NS
Fe ₄ Zn ₂	2,47	2,92 NS
Fe ₂ Zn ₂	2,50	3,69 NS
Fe ₄ Zn ₀	2,58	3,08 NS
Fe ₄ Zn ₃	2,67	2,38 NS

- Continua -

- Continuação -

Tratamentos	Médias	Valores de Teste de Student - Newman - Keuls para a Média 2,98
Fe ₂ Zn ₁	2,78	1,54 NS
Fe ₁ Zn ₁	2,90	0,62 NS
Fe ₃ Zn ₁	2,94	0,31 NS
Fe ₄ Zn ₁	2,98	-

Fe₀ --- Fe₄ - Níveis de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51-20,51 ppm)

Zn₀ --- Zn₃ - Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45 ppm)

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $\leq 0,01$

Tabela 21. Teor de Aminoácidos em Aspergillus niger IZ-9 Após Quatro Dias de Incubação em Meio de Amido de Mandioca (3,0g% de Carboidrato), Uréia (0,12g% de Nitrogênio), Sulfato de Zinco (5,45 ppm de zinco) e Sulfato Ferroso (20,51 ppm de Ferro) em Comparação com o Padrão de Aminoácidos Essenciais Determinado pela FAO.

Aminoácido	<u>A. niger</u> IZ-9 (g/100 g proteína)		Aminoácidos Essenciais (FAO) (g/100 g proteína)
	Totais	Essenciais	
Lisina	2,87	2,87	4,2
Histidina	0,84	-	-
Arginina	4,62	-	-
Ácido aspártico	4,32	-	-
Treonina	3,05	3,05	2,8
Serina	1,83	-	-
Ácido glutâmico	7,00	-	-
Prolina	2,33	-	-
Glicina	2,67	-	-
Alanina	3,73	-	-
Cistina	-	-	2,0
Valina	3,44	3,44	4,2
Metionina	0,27	0,27	2,2
Isoleucina	2,39	2,39	4,2
Leucina	3,89	3,89	4,8
Tirosina	2,12	2,12	2,8
Fenilalanina	2,12	2,12	2,8
Triptofano	NA ^a	NA ^a	1,4
Soma total	-	-	31,4
- Triptofano	47,49	20,15	30,0

a - Não analisado

Os valores do pH final dos meios foram determinados e estão a presentados na tabela 22. A estimativa da média foi 4,99 , tendo um desvio padrão de 0,228.

Tabela 22. Valores do pH Final do Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Zinco e Cinco de Ferro para a Produção de Biomassa e Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ9 (Médias de três repetições).

	Zn ₀	Zn ₁	Zn ₂	Zn ₃	Zn ₄
Fe ₀	3,67	4,13	4,13	4,30	4,20
Fe ₁	3,83	5,60	4,03	4,00	7,90
Fe ₂	3,93	5,07	5,17	4,10	7,70
Fe ₃	4,70	5,67	5,13	4,27	4,03
Fe ₄	5,40	5,40	5,63	5,77	4,03

Zn₀ --- Zn₄ - Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45-20,45 ppm)

Fe₀ --- Fe₄ - Níveis de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51-20,51 ppm)

5.5. Ensaio de Cinco Níveis de Ferro (15,51-20,51-25,51-30,51 e 35,51 ppm) para o Crescimento de *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas Carboidrato por Cento), Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento) e Zinco (5,45 ppm).

Os resultados, avaliados em termos de produção de biomassa e proteína bruta, estão apresentados nas tabelas 23 e 24, respectivamente.

Tabela 23. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Ferro Fixando-se o Zinco na Concentração de 5,45 partes por milhão.

Tratamentos (ppm de Fe)	Repetições			Médias ^a	Médias ^b
	I	II	III		
15,51	9,47	8,58	7,82	8,63	8,63
20,51	9,18	9,28	8,60	9,02	9,02
25,51	11,14	0,02	8,88	6,68	10,01
30,51	9,12	8,60	11,15	9,62	9,62
35,51	9,78	8,12	0,01	5,97	8,95

a - Médias levando-se em consideração todas as repetições de todos os tratamentos.

b - Médias eliminando-se as repetições II e III dos tratamentos com 25,51 e 35,51 ppm de ferro, respectivamente.

Tabela 24. Produção de Proteína Bruta (gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Ferro Fixando-se o Zinco na Concentração de 5,45 partes por milhão (Médias de três repetições para os tratamentos com 15,51-20,51 e 30,51 ppm de ferro e duas para os tratamentos com 25,51 e 35,51 ppm do elemento).

Tratamentos (ppm de Fe)	Proteína Bruta (g/l)
15,51	1,74
20,51	1,86
25,51	2,07
30,51	1,96
35,51	1,82

Em relação à produção de biomassa, observou-se uma baixa produção numa das repetições dos tratamentos com 25,51 e 35,51 ppm de ferro. Por este motivo, foi feita uma análise de variância considerando todos os resultados obtidos (Tabela 25), cujo coeficiente de variação foi de 45% e outra desprezando as repetições acima referidas (Tabela 26), na qual foi obtido um coeficiente de variação de 11,64%. Em ambos os casos não foi encontrada diferença entre os tratamentos, indicando que as variações observadas não foram causadas pelos tratamentos, mas por algum fator não controlado.

A produção de biomassa foi correlacionada com o pH final dos meios (Tabela 27), tendo-se encontrado um coeficiente de correlação linear de $r = -0,95$, o qual, pelo teste t, mostrou-se ser altamente significativo

Tabela 25. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 23 Considerando - se Todos os Resultados Obtidos.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	4	29,79	7,45	0,58 NS
Resíduo	10	129,01	12,90	
Total	14	158,80		

NS - Não Significativo

C.V. = 45 %

Tabela 26. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 23 Eliminando-se as Repetições II e III dos Tratamentos com 25,51 e 35,51 partes por milhão de Ferro, Respectivamente.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	4	3,06	0,77	0,67 NS
Resíduo	10	9,19	1,15	
Total	14	12,25		

NS - Não Significativo

C.V. = 11,64 %

a nível de 1% de probabilidade, indicando que 90,3% da redução na produção de biomassa ocorreu onde houve aumento no pH.

Tabela 27. Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca e Uréia Onde Foram Testados Cinco Níveis de Ferro Fixando-se o Zinco na Concentração de 5,45 ppm. Valores do pH Final dos Meios e Coeficiente de Correlação Linear.

Tratamentos (ppm de Fe)	Repetições					
	I		II		III	
	Biomassa (g/l)	pH Final	Biomassa (g/l)	pH Final	Biomassa (g/l)	pH Final
15,51	9,47	3,5	8,59	3,8	7,82	3,7
20,51	9,18	3,3	9,28	3,7	8,60	3,6
25,51	11,14	3,6	0,02	8,0	8,88	3,5
30,51	9,12	3,9	8,60	3,8	11,15	4,0
35,51	9,78	3,7	8,12	3,7	0,01	8,0

Coeficiente de Correlação Linear = - 0,95

Valor do Teste t = 10,97 **

** - Significativo $p \leq 0,01$

A análise de variância relativa à produção de proteína bruta (Tabela 28) mostrou não haver diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 28. Análise de Variância Referente à Produção de Proteína Bruta (gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 24.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	4	0,15	0,038	0,63 NS
Resíduo	8	0,44	0,06	
Total	12	0,59	0,049	

NS - Não significativo

C.V. = 12,77%

5.6. Curva de Crescimento do *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento), Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento), Sulfato de Zinco (5,45 ppm de Zinco) e Sulfato Ferroso (20,51 ppm de Ferro).

Em intervalos de 12 horas, num período de 24 a 144 horas, o crescimento do microrganismo foi paralisado e determinada a produção de biomassa (peso seco), proteína bruta e pH final dos meios. Durante as primeiras 36 horas nenhum crescimento foi observado, tendo sido a primeira medida de peso seco efetuada após 48 horas. As biomassas produzidas após 48 e 60 horas não foram suficientes para permitir a análise de proteína bruta, razão pela qual esta só foi realizada a partir de 72 horas (Tabela 29).

A análise de variância relativa à produção de biomassa mostrou que foram significativos apenas os componentes de primeiro e segundo graus (Tabela 30), enquanto que em relação à produção de proteína bruta não foi encontrada diferença significativa em nenhum dos componentes (Tabela 31).

A equação de regressão que melhor se adaptou aos valores de peso seco obtidos foi a seguinte: $\hat{y} = - 12,07114 + 0,36235x - 0,00146x^2$. A respectiva curva está representada na figura 5.

A comparação das médias de produção de biomassa pelo teste de Student-Newman-Keuls (Tabela 32) mostrou que o máximo de produção foi alcançado a partir de 120 horas.

Os valores do pH final dos meios tiveram uma média de 3,57 com um desvio padrão de 0,241.

Tabela 29. Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) e Proteína Bruta (gramas/litro) por *Aspergillus niger* IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento), Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento), Sulfato de Zinco (5,45 ppm de Zinco) e Sulfato Ferroso (20,51 ppm de Ferro) para Determinação da Curva de Crescimento e Valores do pH Final dos Meios (Médias de três repetições).

Horas	Peso Seco (g/l)	Proteína Bruta (g/l)	pH Final
24	-	-	3,0
36	-	-	3,0
48	2,09	-	5,8
60	3,81	-	3,9
72	6,96	1,39	3,8
84	8,50	1,80	3,3
96	8,76	1,70	3,1
108	10,33	1,62	3,2
120	9,66	1,67	3,2
132	10,97	1,86	3,4
144	9,72	1,45	3,6

Tabela 30. Análise de Variância Referente à Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 29.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Regressão Linear	1	175,25	175,25	312,95 **
Regressão Quadrática	1	40,78	40,78	72,82 **
Desvios da Regressão	6	6,40	1,07	1,91 **
(Tratamentos)	(8)	(222,43)	(27,80)	(49,64 **)
Resíduo	18	10,01	0,56	
Total	26	232,44		

IS - Não significativo

C.V. = 9,51 %

* - Significativo $p \leq 0,01$

Tabela 31. Análise de Variância Referente à Produção de Proteína Bruta por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 29.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Regressão Linear	1	0,01	0,01	0,13 NS
Regressão Quadrática	1	0,21	0,21	2,63 NS
Desvios da Regressão	4	0,32	0,08	1,00 NS
(Tratamentos)	(6)	(0,54)	(0,09)	(1,13 NS)
Resíduo	14	1,14	0,08	
Total	20	1,68		

- Não Significativo

Tabela 32. Teste de Student-Newman-Keuls para Comparação das Médias de Produção de Biomassa (Peso Seco em gramas/litro) por Aspergillus niger IZ-9 Apresentada na Tabela 29.

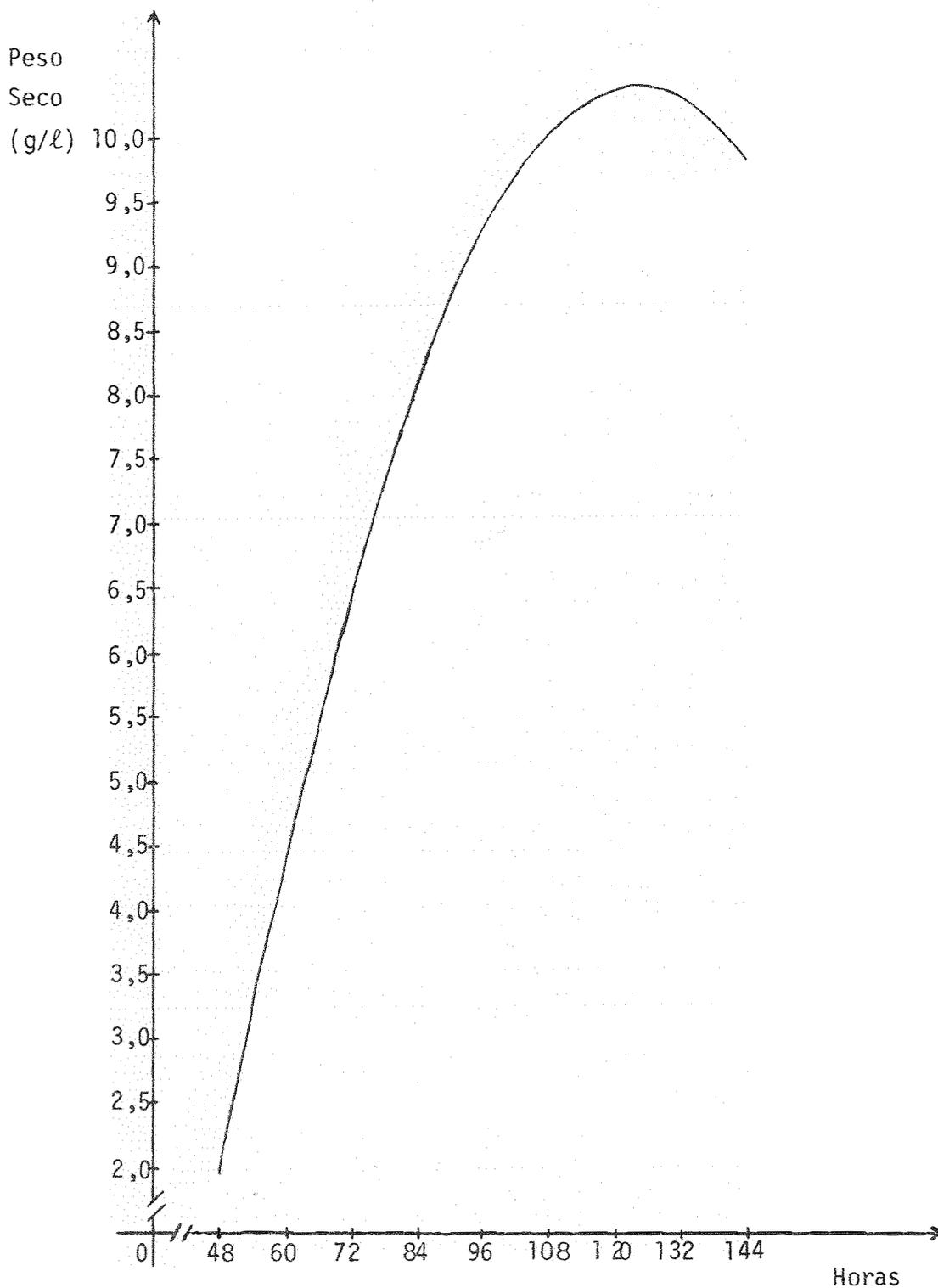
Horas	Médias	Valores do Teste de Student-Newman-Keuls para a Média 10,97
48	2,09	20,65 **
60	3,81	16,65 **
72	6,96	9,33 **
84	8,50	5,74 **
96	8,76	5,14 *
120	9,66	3,05 NS
144	9,72	2,91 NS
108	10,33	1,49 NS
132	10,97	-

NS - Não Significativo

* - Significativo $p \leq 0,05$

** - Significativo $p \leq 0,01$

Figura 5. Produção de Biomassa por Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca, Uréia, 5,45 ppm de Zinco e 20,51 ppm de Ferro Durante o Período de 48 a 144 horas



6. DISCUSSÃO

6.1. Seleção do Micorganismo e Determinação do pH Ótimo

O não crescimento de Fusarium sp em pH 2 pode ter sido devido ao efeito do pH do meio sobre processos fisiológicos, tais como síntese de metabólitos essenciais (fatores de crescimento, ATP e proteínas), inativação de enzimas e permeabilidade da membrana, através da alteração no pH interno da célula ou por simples saturação da membrana celular por íons hidrogênio.

Em relação aos fatores de crescimento, LILLY e BARNETT (1951) relatam o efeito do pH sobre a síntese de tiamina em Sordaria fimicola.

A síntese de ATP pode ser reduzida ou, até mesmo, paralisada pela saturação da superfície externa da membrana mitocondrial externa com íons hidrogênio, carregando sua parte interna negativamente. De acordo com a hipótese quimiosmótica, os gradientes de pH e de potencial elétrico gerados pela cadeia respiratória garantem a inversão do sentido da reação catalisada pela ATPase de modo a realizar síntese de ATP. Esses gradientes são formados pela passagem de íons hidrogênio da matriz para o espaço intermem-

brantar, mediante transportadores, e retenção de elétrons. Desta forma, a superfície externa da membrana interna se carrega positivamente e a matriz, negativamente. Uma vez estabelecidos os dois gradientes, a molécula de água liberada durante a síntese de ATP, ocorrida na membrana interna, se dissocia indo o íon hidrogênio para a matriz e o íon hidroxila para o espaço intermembranar. Se a superfície interna da membrana externa da mitocôndria estiver carregada negativamente as cargas positivas geradas durante o transporte de elétrons serão neutralizadas por cargas negativas restabelecendo o equilíbrio e, portanto, paralisando a síntese de ATP.

A inativação de enzimas decorrente da alteração no pH interno da célula é explicada por um efeito sobre o caráter iônico de proteínas, tais como enzimas, afetando seus sítios catalíticos e conformações estruturais.

A saturação da membrana celular por íons hidrogênio leva a uma alteração na permeabilidade da mesma a cátions essenciais para o desenvolvimento do microrganismo em quantidades adequadas.

Supondo ter havido hidrólise da uréia durante a autoclavagem, ou por ação enzimica, a ausência de crescimento pode ser explicada, ainda, pela alteração nas cargas de proteínas da membrana celular, principalmente daquelas que fazem parte do sistema de transporte de amônio. ROON et alii (1975), analisando o transporte de metilamina e amônia em Saccharomyces cerevisiae, verificaram que pela estimativa da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e constante de Michaelis a amônia era um inibidor competitivo da metilamina. A passagem desta para o interior da célula exigia fonte de energia, sugerindo que o transporte se dava por um mecanismo ativo. Trabalhando com mutantes com pouca capacidade de transportar metilamina os autores observaram a mesma deficiência para o transporte de amônia. Com isto, pretenderam

mostrar que a amônia e a metilamina participam de um sistema comum de transporte.

Se não houve hidrólise da uréia na autoclavagem, ou por ação enzimica, esta fonte de nitrogênio deve ser transportada para o interior da célula a fim de que possa ser utilizada. Quanto ao mecanismo de transporte COOPER e SUMRADA(1975) acharam que em Saccharomyces cerevisiae o transporte de uréia em baixa concentração é dependente de energia e em concentrações externas excessivas se dá por difusão passiva ou facilitada. Em pH 2 o não crescimento do Fusarium sp pode revelar um efeito do pH sobre o mecanismo de transporte de uréia.

A baixa produção observada em toda a faixa de pH entre 3 e 9 parece indicar a presença de uma ou mais substâncias essenciais para o crescimento em quantidades inadequadas e que o pH não exerceu influência sobre o desenvolvimento do microrganismo, como ficou demonstrado pela análise estatística.

O ajustamento do pH em todos os valores iniciais para valores em torno de 8,3 pode significar a presença de íon amônio (NH_4^+), nos casos onde houve elevação de pH, ou ácidos orgânicos, onde houve redução. No primeiro caso, o íon amônio resulta da reação do íon hidrogênio, encontrado na solução, com a amônia liberada, durante a autoclavagem ou por ação enzimica, e pouco utilizada pelo microrganismo.

Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625, tendo crescido em pH 2, mostram ser mais tolerantes a pH ácido que o Fusarium sp. Esta diferença se deve provavelmente às características físico-químicas das enzimas envolvidas nos sistemas de transporte e síntese.

O marcante decréscimo na produção de biomassa ocorrido no A. niger IZ-9 à medida que se eleva o pH pode ser explicado pela exigência de maior quantidade de oxigênio disponível pelo microrganismo, uma vez que em cultura submersa, a quantidade de oxigênio disponível é maior em meio ácido do que em alcalino. Além disso, a redução no crescimento pode ser também devida à deficiência de cátions essenciais que se tornaram insolúveis à medida que o pH foi se tornando alcalino. Um íon, como por exemplo, o íon férrico (Fe^{+++}) ou fosfato ($PO_4^{=}$), em solução alcalina, pode se tornar não disponível por formar compostos insolúveis. Porém, para manter o equilíbrio químico, existem, na solução, para os exemplos dados, ferro e fosfato na forma iônica e, portanto, disponível. À medida que estes íons vão sendo utilizados, o precipitado irá aos poucos se dissolvendo. O A. niger IZ-9 pode necessitar da presença, na solução, de quantidades de íons disponíveis numa concentração mais alta que aquela mantida pelo equilíbrio. Neste caso, só em pH ácido é que ocorrerão as melhores produções. Com base nesta hipótese e pelo menor grau de sensibilidade à variação de pH inicial (Tabela 6) o A. wentii IZ-1625 parece exigir a presença de menor concentração de íons essenciais. A solubilização de certos íons, como ferro, em pH alcalino, segundo LILLY e BARNETT (1951), se dá de modo marcante na presença de ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico, málico e tartárico. Sendo o A. niger um bom produtor de ácido cítrico, a ação evidente deste ácido se fez presente no pH inicial 6, que foi reduzido para 3,8 (Tabela 1) promovendo a solubilização de íons essenciais e, conseqüentemente, favorecendo o crescimento do microrganismo neste valor de pH inicial em relação aos valores 7,8 e 9 (Tabela 7). Apesar de ter havido produção de ácido em pH 7,8 e 9 não foi suficiente para promover a solubilização de íons em proporções adequadas ao crescimento.

A alteração no crescimento pode ter sido influenciada, ainda, pela ação de determinada concentração hidrogeniônica sobre a produção de amilase, necessária à hidrólise do amido, ou transporte de glicose. LINEBACK et alii (1955) encontraram que a atividade da glicoamilase produzida por Aspergillus niger não foi afetada pelo pH, porém relatam que, provavelmente, a concentração hidrogeniônica influiu sobre a capacidade do fungo de sintetizar a enzima. No pH 2, apesar da hidrólise ácida do amido em elevada temperatura, o Fusarium sp não apresentou crescimento. Isto, provavelmente foi devido, entre outros fatores, à ação do pH sobre o transporte de glicose.

Entre os microrganismos testados, o A. niger IZ-9 em pH 2, 3 e 4 e o Fusarium sp em todos os valores de pH foram os mais estáveis em termos de produção de massa micelial. No entanto, a baixa produção do Fusarium sp torna-o não indicado para esta finalidade nas condições de cultura em que foi testado. O A. wentii IZ-1625 em pH 2 e 3 apresentou uma certa instabilidade. Apesar deste fungo no pH 3 não ter apresentado diferença significativa em comparação com as produções do A. niger IZ-9 em pH 2, 3 e 4, o último foi escolhido por sua maior estabilidade na faixa de pH desejável para trabalhos desta natureza, onde problemas de contaminação devem ser minimizados. O pH 3 foi utilizado nos testes subsequentes, pois uma alteração no pH pelo próprio metabolismo do microrganismo numa faixa de 2 a 4 não afeta a produção.

6.2. Ensaio de Duas Fontes de Nitrogênio (Uréia e Nitrato de Amônio) para o Crescimento de Fusarium sp., Aspergillus niger IZ-9 e Aspergillus wentii IZ-1625 em Meio de Amido de Mandioca.

Este ensaio foi elaborado com o intuito de se verificar o efeito da pré-hidrólise da uréia sobre o desenvolvimento dos fungos em estudo, uma vez que sabe-se que, ao ser autoclavada, a uréia sofre hidrólise com conseqüente liberação de amônia. Com base na composição química da uréia, foi escolhido o nitrato de amônio para servir como padrão, pois ambos os compostos possuem dois átomos de nitrogênio em suas moléculas, embora no primeiro caso esses dois átomos estejam sob a forma de amina e no segundo um sob a forma de amônio e o outro sob a forma de nitrato. Além disso, foi encontrado que as duas fontes de nitrogênio mantêm o pH final do meio próximo do inicial não havendo necessidade de reajuste durante o processo e que não há diferença entre as duas fontes quanto à produção de proteína por Aspergillus fumigatus, tendo sido preferida a uréia por apresentar um coeficiente de conversão mais alto que o nitrato de amônio (READE e GREGORY, 1975).

Durante a hidrólise da uréia duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono são formadas. Nos sistemas biológicos esta hidrólise se dá através de enzimas como a uréia carboxilase e alofanato hidrolase. Verificou-se que as moléculas de amônia entram na célula numa taxa mais rápida que sua remoção por assimilação até que se estabeleça um nível de equilíbrio no interior da célula, sendo que a concentração de equilíbrio não depende do metabolismo, mas da concentração externa, e, ainda, sugeriu-se que o transporte da amônia se dá de maneira passiva (MACMILLAN, 1956). Entretanto, HACKETTE et alii (1970) acham que a maioria dos microrganismos utiliza

o íon amônio através de um sistema de transporte altamente específico no lugar da amônia. Não acham provável que a amônia seja transportada porque o valor aparente da constante de Michaelis para o transporte do íon amônio foi muito baixo ($2,5 \times 10^{-7} M$), devendo ser o da amônia ainda cerca de 3 ordens de grandeza mais baixo.

Independentemente do sistema de transporte da amônia ou íon amônio, a uréia parece ser mais adequada ao crescimento de microrganismos que o nitrato de amônio por fornecer duas moléculas de amônia por molécula hidrolisada. Para que o nitrato de amônio desse uma molécula de amônia seria necessário que um sistema de enzimas, ainda não bem determinado, incluindo nitrato, nitrito, hiponitrito e hidroxilamina redutases, fosse mobilizado para realizar reduções sucessivas sobre o nitrato. Nestas reduções seriam necessárias várias moléculas de NAD ou NADP reduzidas como fontes de eletrons. Como para a utilização de cada uma dessas moléculas duas de ATP são deixadas de ser sintetizadas, a célula pode sofrer, durante este processo de redução, um decréscimo na relação $ATP/ADP + P_i$, necessitando, assim, de uma maior velocidade de oxidação de substrato para restaurar ou manter a relação ótima. A hidrólise enzimica da uréia necessita apenas de uma molécula de ATP. Portanto, o simples balanço energético pode explicar a superioridade da uréia em relação ao nitrato de amônio observada no presente ensaio. Além disso, o íon amônio pode inibir a utilização de nitrato de modo que, num determinado tempo, o número de átomos de nitrogênio disponível para a célula seja menor no meio contendo nitrato de amônio que no contendo uréia. MORTON e MACMILLAN (1954), analisando a assimilação de nitrogênio inorgânico por Scopulariopsis brevicaulis, verificaram que a amônia inibe completamente a utilização de nitrato interferindo na redução do nitrato a nitrito. Os autores acreditam que este fenômeno é geral em

fungos, porém em algumas espécies, tais como A. niger, A. oryzae, Fusarium graminearum e Penicillium griseofulvum, o nitrato parece ser utilizado ao mesmo tempo que a amônia, embora numa taxa relativamente baixa. A ação inibitória do íon amônio sobre a utilização do nitrato em fungos, de um modo geral, se deve possivelmente ao fato destes microrganismos reduzirem o nitrato apenas quando seu nitrogênio é exigido. Como o nitrogênio do íon amônio está numa forma mais disponível, o nitrogênio do nitrato é incorporado ao material celular quando todo ou, pelo menos, parte do íon amônio é consumido. COCHRANE (1958) relata que a redução do nitrato em fungos só ocorre durante a incorporação do seu nitrogênio na célula, ao contrário das bactérias que reduzem o nitrato sem que haja assimilação.

Uma vez no interior da célula, a amônia é incorporada a esqueletos carbônicos através de enzimas como desidrogenase glutâmica e aspartase. A primeira, por realizar uma reação reversível que consiste na transformação do ácido L - glutâmico em ácido α -cetoglutárico e amônia, desempenha uma das mais importantes funções nos sistemas biológicos incorporando a amônia ao ácido α -cetoglutárico para a produção de compostos nitrogenados. A segunda catalisa outra reação reversível na qual o ácido L-aspartico se transforma em ácido fumárico e amônia. Do mesmo modo, a amônia pode ser introduzida num esqueleto carbônico. A diferença no crescimento entre as duas fontes pode ser influenciada pela velocidade com que esta incorporação é realizada uma vez que a velocidade de reação depende, até certo ponto, da concentração do substrato.

Em pH ácido, o nitrito resultante da redução do nitrato pode exercer um efeito tóxico sobre microrganismos (COCHRANE, 1958), o que pode ser uma explicação para o não crescimento do Fusarium sp. em nitrato de

amônio. Este efeito tóxico talvez esteja relacionado com a deficiência na síntese ou baixa atividade da nitrito reductase em pH ácido levando, consequentemente, a um acúmulo deste íon no meio. A alteração do pH ocorrida no meio de nitrato onde não foi observado crescimento do Fusarium sp. pode ter sido causada por alguma atividade das enzimas do inóculo na tentativa do microrganismo iniciar seu desenvolvimento em valores de pH mais elevados. Sua sensibilidade ao nitrato de amônio, ou a substâncias resultantes da redução do nitrato, não permitiu uma elevação do pH suficiente para o crescimento.

6.3. Ensaio de Cinco Níveis de Zinco (0,45-5,45-10,45-15,45 e 20,45 ppm) com Cinco de Ferro (0,51-5,51-10,51-15,51 e 20,51 ppm) e de Cinco de Ferro (15,51-20,51-25,51-30,51 e 35,51 ppm) Fixando o Zinco na Concentração de 5,45 ppm para o Crescimento de Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento) e Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento).

Os resultados apresentados no primeiro ensaio indicaram que as quantidades de, pelo menos um dos elementos, zinco ou ferro, presentes no amido de mandioca utilizado não foram suficientes para apresentar uma interação favorável ao máximo crescimento do microrganismo. Para tal, a adição de zinco foi mais favorável no nível 1 (5,45 ppm) enquanto que o ferro produziu melhores resultados nos níveis 3 (15,51 ppm) e 4 (20,51 ppm), mesmo no nível zero de zinco, indicando que a quantidade de ferro, pelo menos dentro de certos limites de zinco, restaura o crescimento máximo quando quantidades, mesmo insuficientes, do último elemento estão presentes. Isto não concorda com dados relatados por LILLY e BARNETT (1951), os quais

indicam que se a concentração de zinco for baixa a adição de ferro ao meio livre do mesmo resulta num efeito pouco expressivo. Esta discrepância pode estar relacionada com diferenças individuais do microrganismo ou com o fato de que a quantidade de 0,45 ppm de zinco não seja suficientemente baixa. (Tabela 16).

A participação mais importante do ferro nos processos de síntese se deve, provavelmente, à presença deste metal em macromoléculas como RNA, citocromos e em muitos sistemas enzimicos. Além de atuar como catalisador de reações enzimicas pode catalisar reações não enzimicas. É possível que os níveis 0-1 e 2 de ferro dentro do nível zero de zinco favoreçam a produção e acúmulo de ácidos intermediários do ciclo de Krebs. Sendo a oxidação total de carboidratos dependente da concentração de citocromos disponível, o acúmulo desses ácidos pode revelar alteração no metabolismo do microrganismo, possivelmente, por falta de ferro suficiente para síntese de tais moléculas. Isto concorda com os dados obtidos por TOMLINSON et alii (1950), segundo os quais, de um modo geral, as quantidades de ferro exigidas para uma alta produção de ácido cítrico são menores que as necessárias para o bom crescimento do microrganismo.

O zinco apresentou um efeito estimulatório em determinados níveis e tóxico em níveis mais elevados (Figuras 2 e 4). O seu papel estimulatório na produção de massa micelial e proteína está relacionado com uma série de fatores, tais como, participação na estrutura de macromoléculas indispensáveis aos dois processos conferindo-lhes estabilidade, utilização mais completa da fonte de carbono, inibição da síntese de determinadas substâncias orgânicas como lipídeos, por exemplo, e participação na síntese de certas enzimas. A integridade e estabilidade dos ribossomos dependem da

presença de íons de zinco (TAL, 1969 e CHVAPIL, 1973). Estando o metal envolvido nos sistemas de polimerização a sua presença em quantidades insuficientes pode comprometer a síntese de RNA, proteína, e outras substâncias celulares. A presença de 2 a 4 átomos-grama de zinco por mol de RNA polimerase no bacteriófago T₇, sua redução em moléculas inativadas e aumento da atividade catalítica em decorrência da sua adição observados por COLEMAN (1974) reforçam a importância do elemento na produção de substâncias celulares, principalmente de RNA e proteína. O envolvimento do metal na síntese proteica e massa celular foi encontrado também na fisiologia do trigo como sendo devido, possivelmente, ao seu estímulo sobre a produção de RNA (SACHDEV e DEB, 1977). Foi observado que a síntese de lipídeos era inibida pela adição de zinco à cultura de Rhodotorula gracilis deficiente neste metal (COUCCI e ROSSI, 1972). A ação do elemento sobre a síntese de lipídeos se dá, provavelmente, pela sua interferência na oxidação de NADP reduzido. Há, desta forma, um aumento na relação NADPH:NADP tão necessária à síntese, porém a forma reduzida não está totalmente disponível para o processo. Esta interferência pode ser de grande importância, uma vez que o material orgânico e a energia gastos para a síntese deste composto podem ser utilizados para a síntese de RNA, proteínas e outros materiais celulares. O zinco atua, ainda, na síntese de muitas enzimas, entre as quais a carboxilase pirúvica (FOSTER e DENISON, 1950), a glutâmico desidrogenase (CANTAROW, 1968) e o sistema enzimático que sintetiza o triptofano (NASON, 1950 e NASON et alii, 1951). Atuando sobre a glutâmico-desidrogenase afeta, pois, o metabolismo do nitrogênio e sobre a síntese de triptofano influencia o sistema de transporte de elétrons, uma vez que este aminoácido é um precursor da nicotinamida, a qual faz parte da molécula do NAD ou NADP. Neste último caso, também

o ferro tem uma participação, pois está presente na molécula de triptofano pirrolase, enzima que oxida o triptofano a formilquinurenina na via da síntese da nicotinamida. Deste modo, pode-se explicar o aumento do efeito estimulatório do zinco quando se adiciona ferro observado sobre o crescimento do microrganismo, tanto em termos de massa micelial como de proteína (Figuras 1 e 3).

A ação tóxica do zinco se fez notória a partir do nível dois tanto sobre a produção de biomassa como proteína. Nos níveis 2 e 3, no entanto, a toxicidade foi inibida pela adição de ferro principalmente no nível 4. Isto pode indicar uma interferência do zinco no metabolismo microbiano por competir com o ferro que desempenha um papel essencial na fisiologia celular ou por afetar a síntese de NAD ou NADP através da redução da atividade do sistema enzimico que sintetiza triptofano. Os átomos de nitrogênio dos núcleos pirrólicos de porfirina podem formar complexos com outros metais além do ferro como, por exemplo, zinco e cobre (CANTAROW, 1968). É possível que à medida que se vá aumentando a concentração de zinco ele passe a ocupar a posição do ferro na estrutura do grupo prostético do citocromo durante sua síntese e, conseqüentemente, altere o mecanismo de formação de ligações de alta energia. O zinco pode, ainda, ser um receptor de elétrons mais forte que o ferro podendo competir com este durante a ligação de ferroproteína não hemínica oxidada com os elétrons na transferência dos mesmos e, desta maneira, reduzir ou, até mesmo, paralisar a síntese de ATP. Isto pode explicar o fato das produções de biomassa e proteína no maior nível de ferro testado não terem diferido nos níveis 0,1,2 e 3 de zinco, não sendo esta quantidade de ferro suficiente para superar o efeito competitivo do zinco no nível 4 (Tabelas 16 e 20). No entanto, esta hipótese parece não

ser satisfatória para os resultados observados no nível 4 de zinco, pois sua combinação com o nível zero de ferro produziu maior biomassa que com os níveis 1 e 2, mostrando que a ação dos dois microelementos na fisiologia celular é muito mais complexa.

O comportamento do microrganismo em relação à produção de biomassa (figuras 1 e 2) foi similar ao observado na produção de proteína (figuras 3 e 4), indicando que a incompatibilidade de certos níveis de ferro e zinco em relação ao crescimento também afeta a síntese de proteína.

Para o microrganismo escolhido, nas condições de cultivo referidas, não foi encontrada uma relação ferro:zinco definida. Assim, por exemplo, as produções tanto de biomassa como de proteína obtidas na combinação dos níveis 4 de ferro (20,51 ppm) com 1 de zinco (5,45 ppm) dando uma relação de 3,76 não diferiram das fornecidas pela combinação dos níveis 4 de ferro (20,51 ppm) com zero de zinco (0,45 ppm) proporcionando uma relação de 45,58. (Tabelas 16 e 20).

Quando doses de ferro abrangendo a faixa de 15,51 a 35,51 ppm dentro do melhor nível de zinco encontrado, ou seja, 5,45 ppm., foram testadas as produções tanto de biomassa como de proteína não diferiram, indicando que o nível de participação do ferro na fisiologia do fungo aumentando o efeito estimulatório do zinco já havia atingido o máximo e que doses do elemento até, pelo menos, 35,51 ppm não foram tóxicas ao microrganismo. Isto é de grande importância prática porque oferece uma ampla faixa de segurança para o emprego do ferro na concentração de 20,51 ppm.

Variando-se os níveis de ferro no nível 4 de zinco é possível que se obtenha um aumento na produção, admitindo-se que o zinco possui efei

to inibitório reversível, atuando, deste modo, como um inibidor competitivo nas reações em que há participação do ferro.

A análise de aminoácidos determinada na biomassa produzida pela combinação dos níveis 4 de ferro com 1 de zinco (Tabela 21) mostrou um perfil de aminoácidos essenciais pobre em comparação com os padrões da FAO. No entanto, deve-se levar em consideração que as condições de cultivo oferecidas ao microrganismo foram também muito pobres e que toda proteína sintetizada derivou de nitrogênio inorgânico, sendo, portanto, um rendimento proteico líquido. A adição de outros nutrientes, tais como fosfato e magnésio, poderá melhorar estes resultados.

Quanto aos valores do pH final (Tabela 27) percebe-se que, de um modo geral, podem ser um indicador de eficiência do processo. Ao atingir a alcalinidade o fungo não se desenvolve bem devendo-se interromper o crescimento. No entanto, a elevação do pH não parece ser a causa do mau desenvolvimento do microrganismo, mas uma consequência da deficiência do inóculo em assimilar bem a fonte de nitrogênio permitindo que se acumule íons amônio no meio. Desta maneira, um reajuste do pH para valores em torno de 3,0 não deverá restaurar o crescimento. A determinação do pH durante o processo evita, portanto, desperdício de tempo com a espera de que o período de incubação se complete sem que haja uma produção adequada.

6.4. Curva de Crescimento do Aspergillus niger IZ-9 em Meio de Amido de Mandioca (3,0 gramas de Carboidrato por Cento), Uréia (0,12 gramas de Nitrogênio por Cento), Sulfato de Zinco (5,45 ppm de Zinco) e Sulfato Ferroso (20,51 ppm de Ferro).

A curva de crescimento mostrou que o microrganismo necessita de um período de 36 horas para iniciar seu desenvolvimento durante o qual, talvez, ocorram as maiores alterações metabólicas, uma vez que estão sendo preparadas enzimas necessárias a adaptação do microrganismo ao novo meio. É possível que tomando-se o inóculo de um meio de mandioca similar ao empregado e em maior quantidade este período seja reduzido e uma produção máxima seja alcançada num espaço de tempo mais curto. A fase adaptativa é tanto maior quanto mais pobre é o meio, exigindo do fungo a elaboração de muitas enzimas para síntese de substâncias, principalmente de crescimento, que poderiam ser dispensadas num meio mais rico como o de malte, de onde proveio o inóculo. A produção de biomassa atingiu estabilidade a partir de 108 horas (Tabela 32 e Fig. 5). Em relação à produção de proteína, o fato de não ter havido diferença significativa entre os resultados obtidos a partir de 72 horas indica que a máxima produção já havia sido alcançada desde este período ou, até mesmo, antes disso, sendo o aumento do peso micelial decorrente do acúmulo de outras substâncias que não proteína, como polissacarídeos e lipídeos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir o seguinte:

- 7.1. O amido de mandioca da variedade utilizada IAC-YARA não possuía concentrações de ferro e zinco em níveis adequados às produções máximas de biomassa e proteína bruta por Aspergillus niger IZ-9, as quais foram atingidas em concentrações de 20,51 ppm de ferro e 5,45 ppm de zinco.
- 7.2. O zinco apresentou efeito tóxico a partir de concentrações em torno de 10 ppm para o Aspergillus niger IZ-9.
- 7.3. Desconhecendo-se os teores de ferro e zinco de raízes de mandioca utilizadas para o crescimento e produção de proteína por Aspergillus niger IZ-9 sugere-se que seja adicionado apenas ferro, na concentração em torno de 20 ppm, uma vez que este não é tóxico em concentrações

mais elevadas, elimina o efeito inibitório do zinco e corrige a deficiência do mesmo, se em concentrações insuficientes.

7.4. Para o Aspergillus niger IZ-9, cultivado nas condições estabelecidas no presente trabalho, o melhor pH do meio foi encontrado estar em torno de 3, sendo os valores de pH final acima de 8 indicadores de mau desenvolvimento do microrganismo.

7.5. Pelo perfil de aminoácidos essenciais encontrou-se que o microrganismo é bom produtor de treonina e que o meio de cultura utilizado deve ser enriquecido com outros componentes, tais como fósforo, potássio, cálcio e magnésio, para que os aminoácidos essenciais restantes sejam produzidos em maiores proporções e/ou estudos genéticos devem ser realizados a fim de que se obtenham linhagens com capacidade de sintetizar tais aminoácidos em maiores quantidades.

8. SUMMARY

The objectives of the present study were:

- 1) to investigate whether cassava root starch contains adequate amounts of zinc and iron to provide maximum growth of a specified fungus selected to utilize this substratum as a source of carbon for protein production;
- 2) to determine the doses of microelements necessary for obtaining such growth, and
- 3) to determine whether the possible inhibiting effect of one of them, in specified concentrations, can be eliminated, or at least reduced, by the addition of the other one.

The microorganisms utilized in this trial were Aspergillus niger IZ-9 , Aspergillus wentii IZ-1625 and Fusarium sp. The best results were obtained with Aspergillus niger IZ-9 grown at pH 3.0 .

The results obtained when different doses of iron and zinc were added showed that starch from cassava of the variety utilized in this trial, i.e. IAC-YARA, did not contain adequate concentration levels of these elements conducive to maximum production of biomass and crude protein by Aspergillus niger IZ-9. Maximum productions were attained at 20.51 ppm and 5.45 ppm concentrations of iron and zinc, respectively. It was also observed that zinc concentrations of 10 ppm and higher have a toxic effect on this microorganism. Not knowing the cassava root contents of iron and zinc utilized for growth and production of protein by Aspergillus niger IZ-9, it was suggested that only iron be added, at around 20 ppm concentration, since iron is not toxic in higher concentrations and also it eliminates the inhibiting effect of zinc and corrects its deficiency, if in insufficient concentrations. The best media pH value for Aspergillus niger IZ-9 grown under the conditions established in the present study, was found to be around 3 ; final pH values higher than 8 were indicative of poor microorganism development. Observation of the essential aminoacid profile revealed that the microorganism is a good producer of treonine and that the culture media should be enriched with other components such as phosphorus, potassium, calcium and magnesium so that the remaining essential aminoacids are produced in higher amounts, and/or that genetic studies should be conducted in order to obtain strains capable of synthesizing greater quantities of such aminoacids.

9. LITERATURA CITADA

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, INC., 1962. Cereal Laboratory Methods. 7^a ed. St. Paul.

BARRIOS, E. A. e R. BRESSANI, 1967. Composición Química de la Raíz y de la Hoja de Algunas Variedades de Yuca Manihot. Turrialba, San José, 17 (3): 314-320.

BLANK, L. M., 1941. Response of Phymatotrichum omnivorum to Certain Trace Elements. Journal of Agricultural Research, Washington, 62(3): 129-159.

CANTAROW, A. e B. SCHEPARTZ, 1968. Biochemistry, 4^a Edição, Philadelphia, W. B. Saunders Company. 898 p.

CHVAPIL, M., 1973. New Aspects in the Biological Role of Zinc: A Stabilizer of Macromolecules and Biological Membranes. Life Sciences, Oxford, 13: 1041-1049.

COCHRANE, V. W., 1958. Physiology of Fungi. New York, John Wiley & Sons, Inc. 524 p.

- COCUCCI, M. C. e G. ROSSI, 1972. Biochemical and Morphological Aspects of Zinc Deficiency in Rhodotorula gracilis. Archiv fur Mikrobiologie, Berlin, 85: 267-279.
- COLEMAN, J. E., 1974. The Role of Zinc (II) in Transcription by T₇ RNA Polymerase. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 60(2): 641-648.
- COOPER, T. G. e R. SUMRADA, 1975. Urea Transport in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology, Washington, 121: 571-576.
- CURRIE, J. N., 1917. The Citric Acid Fermentation of Aspergillus niger. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 31: 15-37.
- FOSTER, J. W., 1939. The Heavy Metal Nutrition of Fungi. The Botanical Review, New York, 5(4): 207-239.
- FOSTER, J. W. e WAKSMAN, S. A., 1939. The Specific Effect of Zinc and Other Heavy Metals on Growth and Fumaric-Acid Production by Rhizopus. Journal of Bacteriology, Baltimore, 37: 599-617.
- FOSTER, J. W. e F. W. DENISON, JUN., 1950. Role of Zinc in Metabolism Nature, London, 166(4228): 833-834.
- GOMES, F. P., 1973. Curso de Estatística Experimental. 5^a ed. Piracicaba, Editora da ESALQ/USP. 430 p.
- GRAY, W. D. e M. D. ABOU-EL-SEUD, 1966. Fungal Protein for Food and Feeds. III. Manioc as a Potential Crude Raw Material for Tropical Areas. Economic Botany, New York, 20: 251-255.

- GREGORY, K. F. , A. G. MEIERING , F. A. AZI , J. A. D. SEDGWICK , J. D. CUNNINGHAM , S. J. MACLEAN , J. SANTOS-NÚÑEZ e G. GOMEZ, 1977. Establishment of a Pilot Plant for the Production of Fungal Protein from Cassava. In: Proceedings of the Fourth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Ottawa, 267-270.
- GUPTA, S. K. , K. K. MAGGON e T. A. VENKITASUBRAMANIAN, 1977. Effect of Zinc on Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates and Enzymes in Relation to Aflatoxin Biosynthesis. Journal of General Microbiology, New York, 99: 43-48.
- HACKETTE, S. L. , G. E. SKYE , C. BURTON e I. H. SEGEL, 1970. Characterization of an Ammonium Transport System in Filamentous Fungi with Methylammonium-¹⁴C as the Substrate. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 245(17): 4241-4250.
- LILLY, V. G. e H. L. BARNETT, 1951. Physiology of the Fungi. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 464 p.
- LINEBACK, D. R. , C. E. GEORGI e R. L. DOTY, 1966. Glucoamylase (α -1,4-Glucan Glucohydrolase) Production by Aspergillus niger as influenced by Medium Composition. The Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo, 12(1): 27-29.
- MACMILLAN, A., 1956. The Entry of Ammonia into Fungal Cells. Journal of Experimental Botany, Oxford, 7(19): 113-126.
- MCHAN, F. e G. T. JOHNSON, 1970. Zinc and Amino Acids: Important Components of a Medium Promoting Growth of Monascus purpureus. Mycologia, New York, 62: 1018-1031.
- McHARGUE, J. S. e R. K. CALFEE, 1931. Effect of Manganese, Copper and Zinc on the Growth of Yeast. Plant Physiology, Baltimore, 6: 559-566.

- McHARGUE, J. S. e R. K. CALFEE, 1931. Effect of Manganese, Copper, and Zinc on Growth and Metabolism of Aspergillus flavus and Rhizopus nigricans. Botanical Gazette, Chicago, 91: 183-193.
- MORTON, A. G. e A. MACMILLAN, 1954. Assimilation of Nitrogen from Ammonium Salts and Nitrate by Fungi. Journal of Experimental Botany, Oxford, 5(14): 232-252.
- MOSSERAY, R., 1932. Influence du Zinc sur les Aspergillus de la Série "niger" et sur Quelques Autres. Cellule, Louvain, 41: 113-128.
- NASON, A., 1950. Effect of Zinc Deficiency on the Synthesis of Tryptophan by Neurospora Extracts. Science, Washington, 112(2900): 111-112.
- NASON, A. , N. O. KAPLAN e S. P. COLWICK, 1951. Changes in Enzymatic Constitution in Zinc-Deficient Neurospora. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 188(1): 398-406.
- PATTERSON, D. S. P., 1960. Influence of Cobalt and Zinc Ions on the Growth and Porphyrin Production of Mycobacterium tuberculosis avium. Nature, London, 185(4705): 57.
- PEČIULIS, J. , E. AUGUSTAITIENĖ , K. PAKARSKYTĖ e J. VALAVIČIUS, 1969. The Role of Microelements on the Accumulation of Proteins and some Vitamins in Yeast Cells. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 35: G 13.
- PERLMAN, D. , W. W. DORRELL e M. J. JOHNSON, 1946. Effect of Metallic Ions on the Production of Citric Acid by Aspergillus niger. Archives of Biochemistry, New York, 11: 131-143.
- PONS, W. A. Jr. , A. F. CUCULLU , L. S. LEE , J. A. ROBERTSON , A. O. FRANZ e L. A. GOLDBLATT, 1966. Determination of Aflatoxins in Agricultural Products: Use of Aqueous Acetone for Extraction. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, 49(3): 554-562.

- ORGES, N., 1932. Citric Acid Production by Aspergillus niger. American Journal of Botany, New York, 19: 559-567.
- PRICE, C. A. e B. L. VALLEE, 1962. Euglena gracilis, a Test Organism for Study of Zinc. Plant Physiology, Washington, 37(1): 428-433.
- READE, A. E. e K. F. GREGORY, 1975. High-Temperature Production of Protein-Enriched Feed from Cassava by Fungi. Applied Microbiology, Washington, 30: 897-904.
- RICHARDS, H. M., 1899. The Effect of Chemical Irritation on the Economic Coefficient of Sugar. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, 26(9): 463-479.
- ROON, R. J. , H. L. EVEN , P. DUNLOP e F. L. LARIMORE, 1975. Methylamine and Ammonia Transport in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology, Washington, 122: 502-509.
- SACHDEV, P. e D. L. DEB, 1977. Effect of Zinc on Protein and RNA Content in Wheat Plant. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 28: 959-962.
- SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A. , R. CARREÑO e M. LEDEZMA, 1970. Effect of Trace Elements on Citric Acid Fermentation by Aspergillus niger. Applied Microbiology, Baltimore, 20(6): 888-892.
- SHU, P. e M. J. JOHNSON, 1948. Citric Acid Production by Submerged Fermentation with Aspergillus niger. Industrial and Engineering Chemistry, Washington, 40(7): 1202-1205.
- SHU, P. e M. J. JOHNSON, 1948. The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation. Journal of Bacteriology, Baltimore, 56(5): 577-585.

- STANTON, W. R. e A. WALLBRIDGE, 1969. Fermented Food Processes. Process Biochemistry, 4: 45-51.
- STEEL, R. G. D. e J. H. TORRIE, 1960. Principles and Procedures of Statistics. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 481 p.
- STEINBERG, R. A., 1919. A Study of Some Factors in the Chemical Stimulation of the Growth of Aspergillus niger. American Journal of Botany, New York, 6 (8 e 9): 330-372.
- STEINBERG, R. A., 1919. A Study of Some Factors Influencing the Stimulative Action of Zinc Sulphate on the Growth of Aspergillus niger. II. A Comparison of Two Strains of the Fungus. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, 46(1): 1-20.
- STEINBERG, R. A., 1936. Some Effects of the Heavy Metals Essential for the Nutrition of Aspergillus niger upon its Growth. American Journal of Botany, New York, 23: 227-231.
- STEINBERG, R. A., 1936. Relation of Accessory Growth Substances to Heavy Metals, Including Molybdenum, in the Nutrition of Aspergillus niger. Journal of Agricultural Research, Washington, 52(6): 439-448.
- STEINBERG, R. A., 1937. Role of Molybdenum in the Utilization of Ammonium and Nitrate Nitrogen by Aspergillus niger. Journal of Agricultural Research, Washington, 55(12): 891-902.
- STEINBERG, R. A., 1939. Effects of Nitrogen Compounds and Trace Elements on Growth of Aspergillus niger. Journal of Agricultural Research, Washington, 59(10): 731-748.
- STEINBERG, R. A., 1939. Relation of Carbon Nutrition to Trace-Element and Accessory Requirements of Aspergillus niger. Journal of Agricultural Research, Washington, 59(10): 749-763.

- TAL, M., 1969. Metal Ions and Ribosomal Conformation. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 195: 76-86.
- TOMLINSON, N. , J. J. R. CAMPBELL e P. C. TRUSSELL, 1950. The Influence of Zinc, Iron, Copper and Manganese on the Production of Citric Acid by Aspergillus niger. Journal of Bacteriology, Baltimore, 59(2): 217-227.
- TRUMPY, B. H. e N. F. MILLIS, 1963. Nutritional Requirements of an Aspergillus niger Mutant for Citric Acid Production. Journal of General Microbiology, New York, 30: 381-393.
- VALLEE, B. L. e H. NEURATH, 1955. Carboxypeptidase, a Zinc Metalloenzyme. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 217(1): 253-261.
- VEGA, R. R. e D. LE TOURNEAU, 1974. The Effect of Zinc on Growth and Sclerotial Formation in Whetzelinia sclerotiorum. Mycologia, New York, 66(2): 256-263.
- WACKER, W. E. C. e B. L. VALLEE, 1959. Nucleic Acids and Metals: 1. Chromium, Manganese, Nickel, Iron and Other Metals in Ribonucleic Acid from Diverse Biological Sources. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 234(12): 3257-3262.
- WACKER, W. E. C., 1962. Nucleic Acids and Metals. III. Changes in Nucleic Acid, Protein, and Metal Content as a Consequence of Zinc Deficiency in Euglena gracilis. Biochemistry, Washington, 1(5): 859-865.
- WATTERSON, A., 1904. The Effect of Chemical Irritation on the Respiration of Fungi. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, 31: 291-304.
- WEGENER, W. S. , J. E. SCHELL e A. H. ROMANO, 1967. Control of Malate Synthase Formation in Rhizopus nigricans. Journal of Bacteriology, Washington, 94(6): 1951-1956.

- WEGENER, W. S. e A. H. ROMANO, 1973. Zinc Stimulation of RNA and Protein Synthesis in Rhizopus nigricans. Science, Washington, 142: 1669-1670.
- WHITE, J. P. e G. T. JOHNSON, 1971. Zinc Effects on Growth and Cynodontin Production of Helminthosporium cynodontis, Mycologia, New York, 63(3): 548-561.
- WOLD, W. S. M. e I. SUZUKI, 1976. The Citric Acid Fermentation by Aspergillus niger: Regulation by Zinc of Growth and Acidogenesis. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 22(8): 1083-1092.