



LÍVIA MARTINEZ ABREU SOARES COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Aspergillus niger QUANTO À PRODUÇÃO DE
ÁCIDO CÍTRICO E À EXPRESSÃO DE GENES
DA CITRATO SINTASE**

LAVRAS – MG

2011

LÍVIA MARTINEZ ABREU SOARES COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Aspergillus niger* QUANTO À
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E À EXPRESSÃO DE GENES DA
CITRATO SINTASE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Costa, Livia Martinez Abreu Soares.

Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase / Livia Martinez Abreu Soares Costa. – Lavras : UFLA, 2011.

92 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Enzima. 3. Sequenciamento. 4. Micro-organismo. 5. Solubilização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.024

LÍVIA MARTINEZ ABREU SOARES COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Aspergillus niger* QUANTO À
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E À EXPRESSÃO DE GENES DA
CITRATO SINTASE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2011.

Dr. Carlos José Pimenta UFLA

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho EPAMIG

Dra. Suelli Ciabotti CEFET

Dra. Sara Maria Chalfoun
Orientadora

**LAVRAS – MG
2011**

OFEREÇO

Aos meus pais, Luiz Alberto e Maria da Boa Morte, à tia Dorinha, tia Mundinha, ao tio Maurício e à tia Ângela, pela confiança, carinho e preocupação.

*Aos meus irmãos, **Stella, Rinaldi e Lilian**, e aos primos Louizi e Armando, pela compreensão, apoio e força nas horas mais difíceis desta caminhada.*

À minha querida sobrinha Sophia por ser a luz das nossas vidas.

A todos os meus familiares, pelo incentivo, carinho e amor.

À Carla Lima (Kaka), pelo apoio, carinho e pelas horas de companhia.

Aos grandes amigos Janine Carvalho, Lucy, Lalá, Jam, Aline Carioca, Marilza e Deila pelo apoio, carinho e ajuda.

DEDICO

**A “todos” que me deram apoio e me ajudaram a crescer, a lutar e a chegar a mais uma conquista, entre as várias que a vida nos impõe.
Muito obrigada, Mãe!!!**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, vida e por todas as suas bênçãos.

À Nossa Senhora de Fátima por iluminar e proteger minha vida.

À professora, Sara Maria Chalfoun, pela orientação, credibilidade, amizade, liberdade e confiança durante o Doutorado.

Aos professores Carlos José Pimenta, Maria Emília, Suelli Ciabotti e Deila pelo apoio, orientação, amizade, crescimento profissional e por toda ajuda e atenção.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos e do Departamento de Fitopatologia, pela formação acadêmica e apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos “amigos” e familiares, em especial à Sabrina e a Luana, pelo grande auxílio e dedicação durante a condução do experimento e pela valiosa amizade, que contribuíram para a realização deste trabalho. Especialmente aos “amigos” para os quais qualquer hora é hora, seja no trabalho ou na descontração. E aos amigos distantes, porém, amigos (Francine e Joelma).

Aos funcionários e estudantes do Departamento de Ciência dos Alimentos, Departamento de Solos, Departamento de Química e Patologia de Sementes, pela paciência e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Central de Alimentos do DCA/UFLA, pelo companheirismo e colaboração nas análises químicas e bioquímicas.

Ao pessoal da EPAMIG, pela ajuda, busca de conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O ácido cítrico é o principal constituinte das frutas cítricas, atualmente um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via microbiana. Por causa de suas características, é amplamente utilizado na indústria de alimentos como acidulante, flavorizante, antioxidante e, também, na indústria farmacêutica. O fungo *Aspergillus niger* exerce muitas funções na indústria da biotecnologia, este micro-organismo possui um vasto leque de enzimas hidrolíticas e enzimas oxidativas. Quase todas as enzimas do ciclo de Krebs estão presentes em extratos de células de micélio de *Aspergillus niger*, tal como a citrato sintase que é uma enzima transferase essencial. Tendo em vista os benefícios da utilização da biologia molecular na detecção e caracterização dos micro-organismos, os objetivos deste estudo foram isolar e selecionar cepas do gênero *Aspergillus*, examinar a solubilização de fosfato destes isolados, verificar o nível de expressão de genes envolvidos na identificação de isolados e eficiência da citrato sintase com a produção de ácido cítrico visando à seleção de isolados superiores para produção industrial. Para verificar o mecanismo dos micro-organismos em solubilizar fosfato ao meio na produção de ácido cítrico, foi utilizado o fosfato de Araxá. Avaliou-se ainda o ácido cítrico em dois meios de cultura BD e SA. A amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando primer para região ITS e para citrato sintase (P1/P2). Os isolados de *Aspergillus niger* foram eficientes em solubilizar o fosfato de Araxá. O isolado A. niger 00118 se destacou na eficiência de solubilização com aumento de cinco vezes a quantidade de fósforo solúvel quando comparado ao tratamento controle. Os resultados da produção de ácido cítrico evidenciaram uma melhor influência das condições do meio de cultura SA sobre sua produção. O sequenciamento de bases da região ITS foi um eficiente método para auxiliar a identificação de isolados de *Aspergillus niger*. O par de primer P1/P2 foi sensível para diferenciar os isolados A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098 e A. niger 00118 na expressão de genes da enzima citrato sintase.

Palavras-chave: Biotecnologia. Enzima. Micro-organismo.

ABSTRACT

Citric acid is the chief constituent of citric fruits, at present one of the most important organic acids produced by microbial pathway. Because of its characteristics, it is widely used in the food industry as an acidulant, flavoring, antioxidant and also in the pharmaceutical industry. The fungus *Aspergillus niger* play a great deal of functions in the biotechnology industry, this microorganism possesses a wide array of hydrolytic enzymes and oxidative enzymes. Almost all the krebs cycle enzymes are present in extracts of *Aspergillus niger* cell mycelia such as citrate synthase which is an essential transferase enzyme. Having in mind the benefits of the use of molecular biology in both the detection and characterization of microorganisms, the objectives of this study were isolating and selecting strains of the genus *Aspergillus*, investigating the solubilization of phosphate of these isolates, verifying the expression rate of genes involved in the identification of isolates and efficiency of citrate synthase with citric yield aiming at the selection of superior isolates for industrial production. To verify the mechanisms of the microorganisms to solubilize phosphate to the medium in the citric acid production, Araxá phosphate was utilized. Further, citric acid was evaluated in two culture media, namely, BD and SA. The amplification by the polymerase chain reaction (PCR) was done by using primer for ITS region and for citrate synthase (P1/P2). The isolates of *Aspergillus niger* were efficient to solubilize Araxá phosphate. The isolate A. niger 00118 stood out in the solubilization efficiency with increase five times as high as the amount of soluble phosphorus when compared with the control treatment. The results of citric acid production stressed a better influence of the conditions of the culture medium SA on its production. The base sequencing of the ITS region was an effective method to aid the identification of isolates of *Aspergillus niger*. The pair of P1/P2 primer was sensitive to distinguish the isolates of A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098 and A. niger 00118 in the expression of citrate synthase enzyme genes.

Keywords: Biotechnology. Enzyme. Microorganism.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 Etapas do ciclo de Krebs..... 27
- Figura 2 Citrato Sintase catalisando a reação de condensação reversível 29

Capítulo 2

- Figura 1 Avaliação da solubilização do fosfato de Araxá e pH final do meio de cultura líquido inoculados com isolados de *Aspergillus niger*..... 64
- Figura 2 Avaliação do ácido cítrico e pH final em dois tipos de meio de cultura líquido inoculados com diferentes isolados de *Aspergillus niger*..... 67
- Figura 3 Avaliação e comparação da quantificação de ácido cítrico e solubilização de fosfato dos isolados de *Aspergillus niger*..... 69

Capítulo 3

- Figura 1 Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose dos isolados de *Aspergillus niger*. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 representam respectivamente a amplificação DNA genômico de culturas puras dos isolados (A. niger 00116, A. niger 00108, A. niger 00107, A. niger 00104, A. niger 00106, A. niger 00114, A. niger 00119, A. niger 00100, A. niger 00102, A. niger 00098, A. niger 00118, A. niger 00124) e Linha 13 que representa o controle, utilizando o primer ITS1/ITS4. Linha M – Marcador molecular 1 Kb AMRESCO..... 84
- Figura 2 Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose dos isolados de *Aspergillus niger*. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 representam respectivamente a

amplificação DNA genômico de culturas puras dos isolados (A. niger 00116, A. niger 00108, A. niger 00107, A. niger 00104, A. niger 00106, A. niger 00114, A. niger 00119, A. niger 00100, A. niger 00102, A. niger 00098, A. niger 00118, A. niger 00124) e Linha 13 que representa o controle, utilizando o par de primers específico (P1/P2) da citrato sintase de *Aspergillus niger*. Linha M – Marcador molecular 1 Kb AMRESO.....

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
A. niger	<i>Aspergillus niger</i>
CoA	Coenzima A
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FSM	Fermentação submersa ou líquida
FES	Fermentação no estado sólido
HBV	Vírus da Hepatite B
HPV	Vírus do Papiloma Humano
MG	Minas Gerais
NAD ⁺	Dinucleotídio de Nicotinamida Adenina (forma oxidada)
PE	Pernambuco
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico

LISTA DE SIGLAS

Eco Centro	Centro de Pesquisa em Manejo Ecológico de Pragas e Doenças de Plantas
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Geralmente reconhecido como um produto seguro
INS	Sistema Internacional de Numeração
SISVAR	Sistema para análise de variância

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Adenina
≤	Menor ou igual
%	Porcentagem
°C	Centígrados
C	Citosina
cm	Centímetros
g	Gramas
G	Guanina
L	Litros
ml	Mililitros
ng	Nanogramas
P	Fósforo
SP	Uma espécie do gênero
Spp	Várias espécies do gênero
T	Timina

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	15
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Ácido cítrico	18
2.1.1	Aplicações do ácido cítrico	19
2.1.2	Produção do ácido cítrico	21
2.1.3	Ciclo do ácido cítrico	26
2.1.3.1	Citrato sintase	28
2.2	Micro-organismos	29
2.2.1	Micro-organismos solubilizadores de fosfatos	31
2.2.1.1	Mecanismos de solubilização de fosfatos	32
2.2.2	<i>Aspergillus niger</i>	33
2.3	Biologia molecular	35
2.3.1	PCR – Reação em cadeia polimerase	36
2.3.1.1	Aplicações	37
2.3.1.2	Procedimentos	38
2.3.1.3	Eletroforese em gel	39
2.3.1.3.1	Eletroforese em gel de agarose	41
	REFERÊNCIAS	42
	CAPÍTULO 2 Bioprospecção de isolados de <i>Aspergillus niger</i> e estudo do mecanismo e obtenção de ácido cítrico	52
1	INTRODUÇÃO	55
2	MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1	Bioprospecção de isolados	57
2.2	Micro-organismos e método de inoculação	57
2.3	Eficiência de solubilização dos isolados	59
2.4	Determinação da concentração de ácido cítrico em cultivo submerso	59
2.5	Delineamento experimental e análise estatística	60
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1	Eficiência de solubilização de fosfato	62
3.2	Determinação da produção de ácido cítrico	65
4	CONCLUSÃO	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72
	CAPÍTULO 3 Análise da expressão de genes relacionados a citrato sintase e identificação de isolados de <i>Aspergillus niger</i>	75
1	INTRODUÇÃO	78

2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
2.1	Origem dos isolados e manutenção das culturas.....	80
2.2	Extração de DNA.....	80
2.3	Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)....	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4	CONCLUSÃO.....	88
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é o principal constituinte das frutas cítricas, atualmente um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via microbiana. Por causa de suas características, é, amplamente, utilizado na indústria de alimentos (acidulante, flavorizante, antioxidante), na indústria farmacêutica (tamponante, sequestrante, quelante) e outros. Sua importância deve-se a características como baixa toxicidade, palatabilidade e ser facilmente assimilado pelo organismo. Com o emprego de técnica de processos microbiológicos foi possível obter esse ácido reduzindo o custo de obtenção e possibilitando um grande aumento do uso em escala industrial.

Muitos micro-organismos desempenham papel importante na produção industrial de bebidas, produtos alimentícios, substâncias químicas, suplementos, antibióticos e biomassa. A principal razão para utilizar micro-organismos na produção de compostos, os quais podem ser isolados de solos, plantas e animais, é a facilidade em seu melhoramento. Com isso tem sido registrados aumentos de até mil vezes na produção de metabólitos de interesse biotecnológico.

Uma aplicação considerável da microbiologia está na indústria biotecnológica em que os micro-organismos são utilizados como fábricas para produção de proteínas, surfactantes, adoçantes e ácidos orgânicos, e, como um membro comum dos micro-organismos encontrados, o fungo *Aspergillus niger* exerce muitas funções na indústria da biotecnologia. Este micro-organismo produz um vasto leque de enzimas hidrolíticas e enzimas oxidativas, modelo para várias áreas de investigação, incluindo o estudo de secreção proteica, em geral, os efeitos de diversos fatores ambientais sobre a supressão ou a exportação de várias enzimas degradantes e processos de desenvolvimento de fermentação.

O acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é acompanhado pela ação e ativação ou desaparecimento e redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do ácido cítrico ou TCA) tal como aconitase, citrato sintase, isocitrato desidrogenase e succinato desidrogenase. Quase todas as enzimas do ciclo de Krebs estão presentes em extratos de células de micélio de *Aspergillus niger*, tal como a citrato sintase que é uma enzima transferase essencial, que desempenha um papel importante na produção de ácido cítrico, pois, controla o primeiro passo do ciclo do ácido tricarboxílico catalisando a entrada de carbono para formar citrato.

Apesar do interesse na regulação da biossíntese de ácido cítrico com a utilização do micro-organismo *Aspergillus niger*, os mecanismos moleculares responsáveis pelos seus efeitos na produção de ácido cítrico não foram estudados em detalhe. O conhecimento das enzimas e seus genes envolvidas no complexo processo de produção de metabólitos secundários é um pré-requisito para a aplicação da engenharia genética na caracterização, seleção e controle de diferentes fungos para produção de ácidos. O estudo da biologia molecular representa, hoje, uma das áreas de maior potencial para a realização de pesquisas, considerando-se não apenas sua grande relevância em eficiência, mas também pela possibilidade de aplicação.

Tendo em vista os benefícios da utilização da biologia molecular na detecção e caracterização dos micro-organismos, os objetivos deste estudo foram isolar e selecionar cepas do gênero *Aspergillus*, examinar a solubilização de fosfato destes isolados, verificar o nível de expressão de genes envolvidos na identificação de isolados e eficiência da citrato sintase com a produção de ácido cítrico visando à seleção de isolados superiores para produção industrial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido cítrico

O ácido cítrico é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, principalmente, por fermentação submersa de meios à base de sacarose ou amido, usando o fungo filamentosos *Aspergillus niger* (VANDENBERGHE, 2000). Apresenta-se na forma de cristais translúcidos brancos, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico (CARGILL, 2000). Está presente em todas as células vivas que necessitam de compostos de carbono como fonte de energia; é um metabólito normal no organismo humano sendo quase completamente metabolizado quando consumido (ABOU-ZEID; ASHY, 1984; RODRIGUES, 2006).

Em bioquímica, é importante como intermediário do ciclo do ácido cítrico. O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, $C_3H_5O(COOH)_3$, é um ácido fraco, que se pode encontrar nos citrinos, de massa molecular 192,13 Kg/Kmol, ponto de fusão 153° C e temperatura de decomposição térmica de 175° C (ARAÚJO, 2009). É usado como conservante natural, sendo conhecido, também, como acidulante INS 330 pela *Internacional Numbering System* (Sistema Internacional de Numeração), sistema numérico elaborado pelo *Codex Committee on Food Additives and Contaminants* (CCFAC) divisão Codex Alimentarius para identificação de contaminantes e aditivos alimentícios, em vez de utilizar o próprio nome do aditivo (MORAIS, 2007).

O ácido cítrico é um acidulante versátil, tendo como características alta solubilidade, ação sequestrante de íons metálicos, que previne reações indesejáveis de oxidação, formação de cor e aromas em produtos alimentícios (FERREIRA, 1987). A acidez do ácido cítrico é em virtude dos três grupos

carboxilas-COOH que podem perder um próton em soluções, formando, como consequência um íon citrato. Os citratos são bons controladores de pH de soluções ácidas. O citrato de cálcio é uma importante substância, que se utiliza, geralmente, na preservação e condimentação dos alimentos (COLUMBIA..., 2001).

Em temperaturas entre 20° C e 35° C, o ácido cítrico puro se encontra na forma cristalina. Pode existir na forma anidra ou como monohidrato. A temperatura média de transição da forma de monohidrato para a forma anidra é 36,6° C. Os cristais de ácido cítrico anidro são classificados, de acordo com os sete sistemas cristalográficos, como ortorrômnicos, onde as dimensões L1, L2 e L3 são diferentes e os ângulos φ , γ e θ são de 90° (MULLIN, 1972).

Atualmente, o ácido cítrico é quase que exclusivamente produzido industrialmente por meio de processos de biossíntese, utilizando como agente biológico o fungo *Aspergillus niger*. Dois processos são utilizados na biossíntese deste ácido, o de superfície e o submerso, que se diferenciam essencialmente pelo modo de crescimento do micro-organismo (LEONEL; CERADA, 1995; MORAIS, 2007).

2.1.1 Aplicações do ácido cítrico

O ácido cítrico é considerado “GRAS” (geralmente reconhecido como um produto seguro) pela *United States Food and Drug Administration* e aditivo alimentício seguro pelo “Experts Committee de FAO/WHO”, sem restrições à quantidade usada (CARGILL, 2000). Assim, além da grande quantidade utilizada em alimentos, bebidas e fármacos, também, é empregado em uma vasta quantidade de processos industriais (NOTHENBERG, 1983; PANDEY et al., 2001; RODRIGUES, 2006; SOCCOL et al., 2003).

Na indústria de alimentos é utilizado em larga escala como acidulante por apresentar sabor agradável, baixíssima toxicidade e alta solubilidade (KAPOOR; CHAUDHARY; TAURO, 1982; SOCCOL et al., 2003). O ácido cítrico compete diretamente no mercado de acidulantes com o ácido láctico, ácido fumárico e ácido fosfórico, sendo o setor alimentício responsável pela utilização de 22%, 15% de refrigerantes carbonatados e 10% de bebidas em pó. O setor de cosméticos responde por cerca de 8% (RODRIGUES, 2006).

Além disso, esse ácido tem a capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa propriedade tem conduzido à crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada por esses metais. Também, essa propriedade aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais tem permitido seu uso na limpeza de caldeiras e instalações especiais. O emprego de ácido cítrico como desincrustador de equipamentos industriais, como caldeiras e trocadores de calor, conta com 4% do consumo, como tendência a aumento na sua participação (NOTHEMBERG, 1983). Em alguns casos, o citrato substitui o fosfato nos detergentes para aumentar sua potência. Essa propriedade é usada não só para limpeza de metais, mas também para utilização doméstica. Pelo fato de ser facilmente biodegradável, o seu uso vem sendo ampliado em substituição aos polifosfatos (RODRIGUES, 2006).

Na indústria farmacêutica, o ácido cítrico é usado como estabilizante de ácido ascórbico por causa de sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com carbonatos e bicarbonatos para gerar gás carbônico. É, ainda, usado como aniônios para preparo de medicamentos onde é requerida a administração de catiônios específicos como ferro e cálcio. Sais de citrato, como citrato trissódico e citrato tripotássico, são usados na medicina para evitar a coagulação do sangue e na indústria alimentícia

como emulsificante para fabricação de certos produtos como queijo (RODRIGUES, 2006).

Sais sódicos de ácido cítrico são, também, usados nas indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos e de higiene para conferir o poder tampão. Ésteres de ácido cítrico, como trietil, tributil e acetildibutil, são usados como plastificante não tóxico nas películas plásticas de embalagem de alimentos. Monoestearil-citrato é usado como antioxidante de óleos e gorduras no lugar do ácido cítrico por ser mais facilmente incorporado ao produto (RODRIGUES, 2006).

2.1.2 Produção do ácido cítrico

A produção de ácido cítrico, apesar de conhecida há mais de cem anos, é relativamente recente em relação a outros processos fermentativos. Wehmer, em 1893, descobriu que linhagens de fungos *Citromyces* (hoje identificado como *Penicillium* sp.) e *Mucor* possuíam a capacidade de acumular quantidades consideráveis do ácido durante o seu cultivo (RÖHR; KUBICEK; KOMINEK, 1983). Mas a sua transferência para a escala industrial não teve sucesso, principalmente, por causa da contaminação já que o tempo de fermentação era muito longo (várias semanas) e o pH de operação era próximo da neutralidade (RODRIGUES, 2006).

Somente em 1917 foi construída a primeira planta de produção desse ácido na Bélgica, graças a estudos de Currie que estabeleceu algumas condições de produção. Esta fábrica já utilizava o fungo *Aspergillus niger*, cujo desenvolvimento se dava em pH 2,5 a 3,5. Isso possibilitou o controle mais simples da contaminação com um tempo de fermentação de 1 a 2 semanas (RODRIGUES, 2006).

O trabalho pioneiro de Currie mostrou algumas bases para adequação do processo fermentativo tais como: necessidade de concentração elevada de açúcar e a constatação de que as condições de melhor produção do ácido coincidem com a restrição do crescimento micelial. Logo após a fábrica da Bélgica surgiram outras fábricas, nos Estados Unidos, Inglaterra, Checoslováquia, União Soviética e Alemanha, que começaram a produzir ácido cítrico por fermentação (YOKOYA, 1992). Com a descoberta da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) na década de 50, foi possível elucidar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose (RODRIGUES, 2006).

Desde 1920, a fermentação é o processo mais econômico e mais utilizado na produção industrial de ácido cítrico, representando mais de 90% da produção mundial. Este processo apresenta como vantagens operações simples, baixo consumo de energia e não requer um controle do sistema muito sofisticado (RODRIGUES, 2006; TECHNOLOGY INNOVATION MANAGEMENT AND ENTREPRENEURSHIP INFORMATION SERVICE - TIMEIS, 2000). Para a produção de ácido cítrico podem ser usados os métodos: submerso, em superfície líquida ou por estado sólido e, também, pelo processo chamado de Koji.

O processo em superfície foi o primeiro método de produção em larga escala, sendo introduzido por volta de 1920. Técnicas mais sofisticadas foram desenvolvidas com um custo de mão-de-obra menor. Apesar disso, este método, ainda, é bastante utilizado em decorrência dos custos com energia serem menores (MATTEY, 1992). Este processo consiste em inocular os fungos em um grande número de bandejas rasas que são empilhadas em estantes em câmaras de fermentação. As fontes de carbono mais utilizadas são sacarose refinada ou crua, xarope de cana "high test" ou melaços de beterraba. A incubação é feita, inoculando-se os esporos, adicionados como uma suspensão ou introduzidos com uma injeção de ar sobre as bandejas. Usa-se, normalmente,

um grande número de esporos para a inoculação, enquanto a temperatura é mantida em torno dos 28-30 °C e a umidade relativa entre 40-60 %. A aeração é um fator importante, pois, além de fornecer oxigênio para os micro-organismos, também, controla a umidade relativa e a temperatura da fermentação. A duração da fermentação pode ser de 8 a 15 dias, dependendo da variedade e dos níveis iniciais de açúcar. O rendimento do processo é profundamente influenciado por fatores como aeração, umidade, profundidade do meio, pH, traços de metais e temperatura (ARMILIATO, 2004; GREWAL; KALRA, 1995; MATTEY, 1992; RÖHR; KUBICEK; KOMINEK, 1983).

O processo Koji é semelhante ao processo de superfície. Foi desenvolvido no Japão e é o processo mais simples para a obtenção do ácido cítrico. Farelo de arroz, resíduos fibrosos de batata doce e resíduos de frutas são as matérias primas mais utilizadas. O pH é mantido na faixa de 5,5, com temperatura em torno de 19 a 30 °C. O processo é completado entre 4 e 5 dias e a inoculação é feita por meio de pulverização dos esporos. Neste processo os rendimentos são relativamente baixos, por causa da dificuldade de se controlar os parâmetros de fermentação e traços de metais (ARMILIATO, 2004; GREWAL; KALRA, 1995; MATTEY, 1992; RÖHR; KUBICEK; KOMINEK, 1983).

O processo submerso está aumentando consideravelmente uma vez que, dentre as vantagens, destacam-se as altas taxas de produção alcançadas, a necessidade de menos mão-de-obra para operação e utilização de um espaço menor para produção (MATTEY, 1992). No processo submerso existe a possibilidade de uma faixa maior de concentração de substrato e de um melhor controle de fermentação. Neste processo o micélio do fungo fica submerso e disperso por toda a fase líquida. Os substratos utilizados nesse processo incluem glicose, sacarose, melaços de cana e de beterraba (MILSON, 1988). Podem ser utilizados reatores sob agitação ou fermentadores em torre. As fermentações são

realizadas em batelada, batelada alimentada ou em processos contínuos (ARMILIATO, 2004).

No cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de bioresíduos, entre os quais podem ser citados como exemplo o bagaço de cana e de mandioca, a casca do coco de babaçu, a palha de cereais, o bagaço da laranja, a polpa da maçã, o caule e o sabugo do milho, a serragem, diversos tipos de papéis recicláveis e outros resíduos de atividades florestais. Os resíduos de processos agrícolas, gerados em abundância além de ser uma alternativa em termos de substrato em processos fermentativos, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental (SOCCOL et al., 2003).

Sendo o ácido cítrico um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, há um grande incentivo à procura de soluções para a sua produção. O uso de resíduos em fermentação é economicamente importante, pois, fornece alternativa biotecnológica para a valorização dos resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais. Para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário utilizar matérias primas baratas e baixar os custos da produção, sem prejuízo à qualidade do produto final.

Processos biotecnológicos alternativos foram desenvolvidos para a produção de ácido cítrico produzido por fermentação em estado sólido (FES) a partir de bagaço de mandioca (KOLICHESKI, 1995; PRADO, 2002; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR, 1999; VANDENBERGHE, 2000), enquanto Kumar et al. (2002) produziram ácido cítrico por FES usando como substrato o bagaço de cana. Rodrigues (2006) produziu ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Santos (2005) obteve ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico.

A fermentação em estado sólido é definida como um processo de fermentação que ocorre na ausência de água livre entre as partículas e na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido (PANDEY et al., 2000). A fermentação submersa ou líquida (FSM), por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente, água (MITCHELL et al., 2000).

Na FSM a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, fácil inoculação, processo contínuo, fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato, elevado consumo energético, elevado custo tecnológico (HOLKER; LENZ, 2004; MITCHELL; MEIEN; KRIEGER, 2002).

O processo de FES apresenta como vantagens em relação a FSM, como maior concentração de produtos formados, fácil aeração, menor espaço requerido para equipamentos, baixo consumo de energia, facilidade de extração do produto desejado e diminuição de problemas de contaminação microbiana. Por outro lado, as limitações da técnica, ainda, impedem sua ampla utilização industrial: dificuldade de remoção de calor em virtude da baixa condutividade térmica da matéria, tipos de substratos limitados, condições estáticas e a dificuldade de se medir parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido (HOLKER; LENZ, 2004).

2.1.3 Ciclo do ácido cítrico

O ciclo do ácido cítrico foi postulado primeiramente por Hans Krebs, em 1937, sob o nome original de “Ciclo do Ácido Cítrico”. Essa importante descoberta rendeu a Krebs o Prêmio Nobel, em 1953. Já em 1936, Krebs, com base em estudos prévios, começou a estudar as inter-relações no metabolismo oxidativo dos vários ácidos di e tricarboxílico em suspensões de músculos triturados de pombos. A partir de uma série de experimentos simples e argumentos inteligentes, Krebs postulou o Ciclo do Ácido cítrico como a via principal para a oxidação dos carboidratos no músculo. Em decorrência da incerteza, durante muitos anos, de ser ou não o ácido cítrico o primeiro ácido tricarboxílico, formado na reação entre piruvato e o oxaloacetato, o nome do ciclo foi mudado para ciclo do Ácido tricarboxílico. Atualmente são usados como sinônimos os nomes “Ciclo do Ácido Tricarboxílico, Ciclo do Ácido Cítrico”, ou “Ciclo de Krebs” (LEHNINGER, 1976; PUNTEL, 2008).

O ciclo de Krebs é a mais importante via metabólica celular. O ciclo compreende uma série de reações químicas de importância central para todas as células que utilizam oxigênio durante o processo de respiração celular (organismos aeróbicos). Nesses organismos, O Ciclo de Krebs é parte central das vias metabólicas envolvidas na conversão química de carboidratos, ácidos graxos e proteínas em dióxido de carbono, água e energia útil para as células (CAMPBELL, 1999; NELSON; COX, 2002; PUNTEL, 2008; STYER, 1988).

O ciclo está associado à cadeia respiratória, ou seja, um complexo de compostos transportadores de prótons e elétrons que consomem o oxigênio absorvido por mecanismos respiratórios, sintetizando água e gerando ATP por meio do processo de fosforilação oxidativa (CAMPBELL, 1999; NELSON; COX, 2002; PUNTEL, 2008; STYER, 1988).

A base bioquímica do processo envolve três etapas: (a) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA por meio da glicólise, (b) formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO_2 e (c) acúmulo do ácido cítrico no ciclo de Krebs (KUBICEK; RÖHR, 1986; PANDEY et al., 2001; RODRIGUES, 2006).

Esses processos ocorrem dentro das mitocôndrias, com as enzimas do Ciclo de Krebs dispersas na matriz e os transportadores de elétrons fixos nas cristas mitocondriais. O ciclo de Krebs pode ser dividido em oito etapas consecutivas (Figura 1). Seu início ocorre com a condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato, gerando citrato (catalisada pela citrato sintase) e seu término tem a desidrogenação do malato com a regeneração do oxaloacetato (catalisada pela enzima malato-desidrogenase, utiliza o NAD^+ como transportador de dois elétrons liberados na reação) (PUNTEL, 2008).

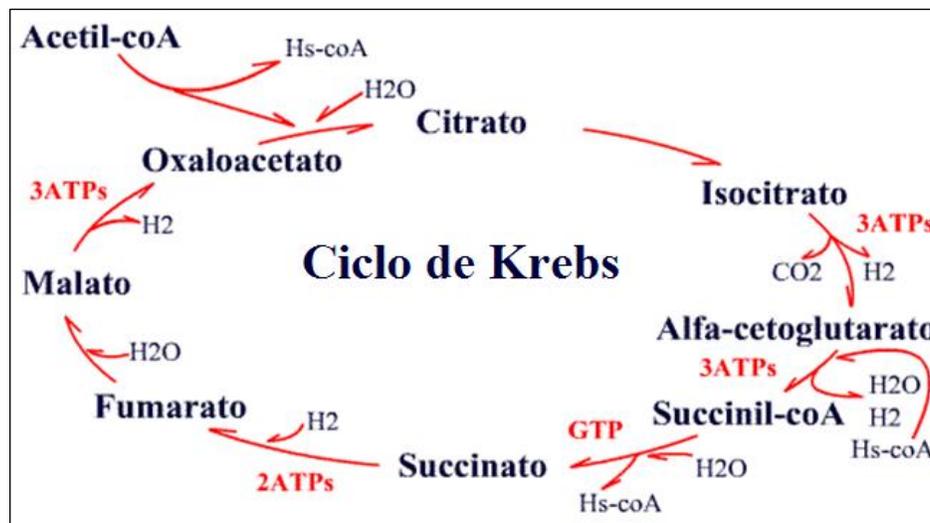


Figura 1 Etapas do Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs fornece, ainda, precursores para uma série de moléculas, como certos aminoácidos e glicose. Sendo assim, algumas das reações do ciclo de Krebs, também, são importantes para organismos anaeróbicos (por exemplo, aqueles que fazem fermentação) (PUNTEL, 2008).

2.1.3.1 Citrato sintase

A enzima citrato sintase (E.C 2.3.3.1) é uma enzima transferase e controla o primeiro passo do ciclo de Krebs, também, conhecido como "ciclo do ácido cítrico". A citrato sintase está localizada no interior das células, mais especificamente na matriz mitocondrial, mas é codificada pelo DNA nuclear em vez do mitocondrial. É sintetizada utilizando-se dos ribossomos do citoplasma e, então, transportada para a matriz mitocondrial. É comumente utilizada como marcador quantitativo de enzima pela presença intacta da mitocôndria, como exemplo as miopatias mitocondriais em que a deficiência da atividade da citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo acarretando em transtornos musculares atróficos. A enzima cataliza a reação de condensação de um resíduo de acetato contendo 2 carbonos de uma acetil coenzima A com uma molécula de oxaloacetato contendo quatro carbonos para formar um citrato de seis carbonos (Figura 2). O oxaloacetato será regenerado após completada uma série do ciclo de Krebs (USHER et al., 1994).

Esta reação de equilíbrio favorece a produção de citrato em consequência da tioéster que ocorre como parte da reação (LOWENSTEIN, 1969). A taxa de reação é controlada "in vivo" pela disponibilidade do substrato e não por qualquer inibidor. O oxaloacetato tem o maior efeito sobre a taxa de reação porque a concentração de oxaloacetato afeta o valor de K_m da enzima para o substrato acetil-CoA (KUBICEK; RÖHR, 1980).

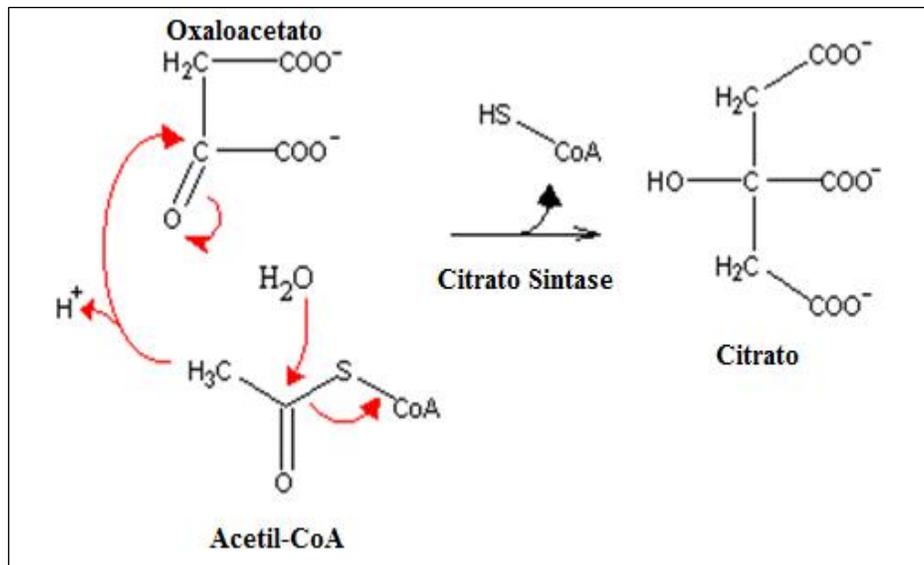


Figura 2 Citrato Sintase catalisando a reação de condensação reversível

A reação segue um mecanismo ordenado, com oxaloacetato vinculado para a primeira enzima e acetil-CoA. “In vitro”, tanto ATP e coenzima A inibem a enzima que catalisa a reação acima, estes dois compostos competem com a acetil-CoA para o sítio ativo. Não há nenhuma ou pouca inibição da reação nas concentrações de metabólitos vista “in vivo” (PAPAGIANNI; MATTEY, 2007).

2.2 Micro-organismos

Os micro-organismos provaram ser uma fonte excepcionalmente rica de produtos úteis e tais produtos variam enormemente em termos de sua atividade biológica e complexidade estrutural. A maioria das reações bioquímicas necessárias, para sintetizar uma nova célula foi elucidada, então, o conhecimento do metabolismo primário está quase completo. Adicionalmente a estas reações

essenciais, diretamente associadas ao crescimento celular balanceado, muitos micro-organismos possuem capacidade de sintetizar uma grande variedade de compostos não essenciais, denominados de metabólitos secundários. Entretanto, os micro-organismos exerceram um papel muito importante como fonte de metabólitos primários conhecidos como aminoácidos e vitaminas. O foco atual é pela procura de novos compostos que são produtos do metabolismo secundário. Os dois principais fatores que determinam a eficácia da seleção destes compostos são a avaliação do micro-organismo produtor e o teste de seleção empregado. O micro-organismo de interesse deve ser convenientemente isolado e selecionado para a produção do metabólito desejado (RODRIGUES, 2006).

Os micro-organismos produtores de enzimas hidrolíticas são geralmente encontrados em toda biota onde há acúmulo de resíduo e ocorrem em populações mistas compreendendo espécies celulolíticas e não celulolíticas, as quais agem muitas vezes em associação. Além disso, os ecossistemas microbianos são comunidades com enorme potencial de aquisição de diversidade genética (SANTOS, 2010; WHITMAN; WYMAN; GROHMANN, 1998).

Conforme Menezes (2006), a denominação fungos filamentosos abrange os fungos formados por hifas, uni ou pluricelulares, que formam revestimentos esbranquiçados ou coloridos, sobre o substrato onde crescem. São descritas mais de 100.000 espécies, distribuídas em, aproximadamente, 3.000 gêneros. As células são ricas em exo e endoenzimas. Um emaranhado de hifas constitui o micélio.

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* destacam-se como importantes micro-organismos produtores de enzimas. Os fungos filamentosos constituem, atualmente, materiais biológicos ideais para produção de substâncias de interesse biotecnológico, possuindo crescimento rápido e baixo custo de

cultivo, possibilitando cultivos sob condições controladas em laboratório (SANTOS, 2010; SIMÕES; TAU-K-TORNISIELO, 2005).

Dessa forma, apesar dos avanços da biologia molecular e da genética, a seleção de cepas selvagens hiper-produtoras, ainda, é importante principalmente nos casos onde a utilização de micro-organismos geneticamente modificados não é recomendada por questões de biossegurança.

2.2.1 Micro-organismos solubilizadores de fosfatos

A inoculação de micro-organismos solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações têm sido sugeridos como forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis (GOLDSTEIN, 1986; KIM; JORDAN; MCDONALD, 1998). Para serem utilizados num programa de inoculação controlada, os micro-organismos devem apresentar, entre outras características, grande capacidade e alto potencial de solubilização de fosfatos (SILVA FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002).

Micro-organismos do solo, inclusive bactérias e fungos, solubilizam formas inorgânicas não disponíveis de P (SON et al., 2006; XIN et al., 2002). Esses micro-organismos utilizam estratégias bioquímicas, como a produção de ácidos orgânicos, ou um mecanismo que envolve o crescimento microbiano e que favorece a secreção de prótons (H⁺) (BARROSO; NAHAS, 2008; ILLMER; SCHINNER, 1995).

Dentre os fungos solubilizadores de fosfatos, merecem destaque os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A eficiência de solubilização difere entre gêneros e famílias de micro-organismos. Foi observado muitos casos em que a

eficiência dos fungos é mais evidente, apesar de bactérias solubilizadoras serem encontrados em maior número (ALEXANDER, 1980; DALCIN, 2008).

Os micro-organismos envolvidos na solubilização de fosfatos, também, podem auxiliar o crescimento da planta por outros mecanismos, além daquele advindo da solubilização, como por exemplo, pelo aumento da eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Verifica-se que o fósforo é o fator limitante para fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosas, aumentando a disponibilidade de outros elementos ou produzindo substâncias promotoras de crescimento de plantas (CHABOT et al., 1998; GYANESHWAR et al., 2002).

2.2.1.1 Mecanismos de solubilização de fosfatos

A solubilização decorre da diminuição do pH ou da secreção de metabólitos como ácidos orgânicos e inorgânicos (NAHAS, 1996; NAUTIYAL, 1999). A produção de ácidos orgânicos tem sido considerada um dos principais mecanismos, contudo, não somente a quantidade como a natureza do ácido produzido influenciam a solubilização de fosfatos inorgânicos (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992).

Os ácidos orgânicos secretados pelos micro-organismos podem diminuir o pH ou atuam como agentes quelantes dos metais dos fosfatos inorgânicos liberando fosfato solúvel para a solução do solo (WHITELAW, 2000). De acordo com Illmer e Schinner (1995), pode ocorrer solubilização, ainda, sem a produção de ácidos, pela liberação de prótons resultantes da assimilação de NH_4^+ (BARROSO, 2006).

Existem mecanismos de ação exercida pelos micro-organismos sobre o meio, que contribuem para a solubilização do fósforo insolúvel. O primeiro é por meio da atividade enzimática específica das enzimas fosfatases que hidrolisam o P-orgânico, como fitatos, fosfolipídios e ácidos nucleicos, liberando o fósforo

em formas de assimilação fácil e imediata, conhecido como mineralização (DALCIN, 2008; NAHAS; TERENCEZI; ROSSI, 1982).

De acordo com Nahas (1999), aumentando a acidez titulável ocorre diminuição nos valores de pH final, e um aumento da acidez titulável ou uma diminuição nos valores de pH final correspondem a um aumento do teor de fosfato solúvel. Inúmeros fatores influenciam a diminuição do pH ou a produção de ácidos pelos micro-organismos como o tipo de micro-organismo, a fonte de carbono, nitrogênio e micronutrientes (BARROSO, 2006; REYES et al., 1999; SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

Chabot et al. (1998) introduziram a capacidade de solubilização em micro-organismos que não expressavam essa característica, obtendo resultados positivos em relação ao crescimento vegetal. Mas, não se pode esperar que a solubilização de fosfatos seja expressa por um único gene ou por um grupo de genes e que seja comum a todos os micro-organismos solubilizadores (DALCIN, 2008; NARLOCH et al., 2002).

2.2.2 *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* apresenta mais de 185 espécies encontradas nos mais diversos habitats. O grupo é caracterizado por possuir cabeças conidiais escuras, geralmente, negros com conidióforos hialinos a acinzentados e cabeças globosas. O conidióforo apresenta cabeça conidial radiada, com métulas e fiálides ou somente fiálides, os conídios são escuros unicelulares e globosos. São fungos saprófitas, cosmopolitas e tem como hospedeiros uma variedade de espécies vegetais tais como arroz, trigo, milho, algodão, sorgo, soja, café. (ELIZEI, 2009).

O *Aspergillus niger* faz parte dos fungos filamentosos que constituem um grupo de micro-organismos aeróbios fisiologicamente diversos. Estes fungos

podem se desenvolver em meios líquidos e sólidos. Em seu ambiente natural são encontrados frequentemente em superfície de líquidos e sólidos de tal maneira que uma grande parte de suas hifas são aéreas (RODRIGUES, 2006).

É um fungo ascomiceto imperfeito (classe dos Fungos mitospóricos), possui coloração preta (*niger*: preto em latim), tendo uma grande variedade de cepas e subespécies. Durante a vida de um fungo imperfeito existem quatro etapas fisiológicas importantes que são a dormência, a germinação, a multiplicação vegetativa e a conidiogênese. Um esporo de *Aspergillus niger* em um meio favorável deixa seu estado de dormência e passa por uma etapa de germinação. Esta consiste em um conjunto de fenômenos morfológicos e metabólicos, permitindo ao esporo germinar, desenvolver-se formando hifas e, em seguida, o micélio. A germinação do esporo não pode começar se a umidade ambiente for insuficiente. O esporo, também, deve encontrar no seu meio todos os elementos necessários para o crescimento da hifa. Neste instante a atividade metabólica é intensa (síntese de constituintes celulares, ácidos amínicos, nucleotídeos) quando comparado com o crescimento vegetativo (RODRIGUES, 2006).

Esse fungo atende diversas exigências para a produção comercial de enzimas, dentre as quais, destacam-se a capacidade de crescer em substratos de baixo custo e a produção, em velocidade elevada, de enzimas estáveis a variações de temperatura e pH, além de serem de fácil recuperação (SANTOS, 2010; SLIVINSKI, 2007).

O fungo *Aspergillus niger* é utilizado, principalmente, na produção das enzimas amilase, celulase, invertase, pectinase, xilanase, naringinase, β -galactosidase e α -galactosidase. Do ponto de vista industrial são valorizados em decorrência de suas aplicações na indústria de alimentos (sucos, gomas, confeitos, doces e leite deslactosado), na indústria têxtil, na produção de papel,

celulose, etanol e rações (BAILEY; OLLIS, 1986; COUTO; SANROMAN, 2006; SHANKAR; MULIMANIA, 2007).

As principais vantagens no seu uso são as facilidades de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de ácido cítrico (YOKOYA, 1992). Além disso, o *Aspergillus niger* é considerado “GRAS” (geralmente reconhecido como um produto seguro) pela FAO, o que é bastante importante na produção de ácido cítrico utilizando este micro-organismo (RODRIGUES, 2006).

2.3 Biologia molecular

O estudo dos tecidos vivos baseava-se quase que exclusivamente em observações de natureza morfológica, fossem estas a nível macroscópico ou microscópico. Desta forma, a análise das alterações ocorridas destes tecidos poderia ser identificada apenas mediante a constatação de seus efeitos sobre sua estrutura, a qual iria apresentar modificações em sua forma, tamanho, aparência e outras variáveis. O grande e acelerado desenvolvimento da tecnologia permitiu que estes mesmos tecidos fossem, posteriormente, analisados em seu conteúdo submicroscópico, ou seja, por intermédio da identificação das moléculas que os compõem pela aplicação de métodos químicos ou físicos (PINHO, 2008).

O grande salto de conhecimento ocorrido nesta área foi proporcionado pelos trabalhos pioneiros de Watson e Crick, na década de 50, os quais, ao definir a estrutura química da molécula de DNA, estabeleceram a principal diferença entre os seres vivos e a matéria inanimada. A partir deste achado, sucedeu-se uma sequência de descobertas que demonstrou que esta molécula representava o elemento primordial, a partir do qual poderíamos compreender as principais características dos seres vivos. Nascia a biologia molecular e a identificação da molécula de DNA, a qual seria o elemento básico das

transformações morfológicas observadas de forma peculiar em cada ser vivo no reino animal ou vegetal (PINHO, 2008).

Nas últimas décadas, verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Avanços, nos estudos de biologia molecular, propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos de tipagem molecular. Técnicas genotípicas referem-se à caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um micro-organismo, características estas relativamente estáveis (DESTRO, 1995; GANDRA et al., 2008).

Marin et al. (2006) descrevem que os métodos tradicionais de detecção de micro-organismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, requerem de vários dias a semanas antes dos resultados serem obtidos. Os mesmos autores ressaltam que as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém, não-cultiváveis.

As técnicas moleculares têm aplicação direta na detecção e caracterização de micro-organismos em alimentos. Dentre essas, destacam-se as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (BOER; BEUMER, 1999; GANDRA et al., 2008; MALORNY et al., 2003).

2.3.1 PCR- Reação em cadeia da polimerase

A reação, em cadeia da polimerase, é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas

milhões de cópias da sequência alvo (GANDRA et al., 2008; KONEMAM et al., 2001).

Na última década, o PCR tornou-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (BOER; BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2003). Mesmo com o aumento da utilização das técnicas moleculares, em estudos de microbiologia de alimentos, escassas são as publicações em português que relacionem estas técnicas com esta área (GANDRA et al., 2008).

É um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo vivo, por meio de uma reação enzimática, a partir de diminutas quantidades de sequências de DNA ou de RNA específicas. Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (GANDRA et al., 2008; KONEMAM et al., 2001).

2.3.1.1 Aplicações

O PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Em teoria, é possível amplificar qualquer DNA. Uma das principais aplicações do PCR é na medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime (pedaços de cabelo, gotas de sangue ou saliva, pedaços de pêlo ou até mesmo a minúscula quantidade de DNA deixada em uma impressão digital) são amplificadas para serem analisadas

pelo método de *fingerprinting* (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

O PCR, também, é rotineiramente utilizado em procedimentos científicos de Biologia Molecular como amplificação para gerar mutagênese, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem (inserção em plasmídeo, por exemplo) como também pode ser utilizado para identificação de patógenos que estão presentes em amostras como por exemplo identificação de agentes como *Cândida sp*, *Chlamydia trachomatis*, HPV (Vírus do papiloma humano) e seus genótipos, HBV (Vírus da Hepatite B). O PCR, também, é utilizado na paleontologia para o sequenciamento gênico de animais pré-históricos (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

A introdução da PCR, em diagnóstico microbiano, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY et al., 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens, em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH; NITSCHKO, 1999; GANDRA et al., 2008).

2.3.1.2 Procedimentos

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. Em primeiro lugar, deve-se extrair o material genético da célula ou outro material a ser estudado

(exemplo: vestígios de crimes) sem danificá-lo (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

Normalmente o material extraído é o DNA (ADN), mas pode-se trabalhar com o RNA (ARN) em uma RT-PCR que é um desdobramento da PCR e possui outras aplicações. Depois de extraído o DNA, a este é adicionada uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com um três fosfato, os *primers*, também, chamados de oligonucleotídeos (ou iniciadores) e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado) (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada de 94 a 96 °C por pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 a 60 °C dependendo da quantidade de citosina (C) e guanina (G) encontrada no primer, para que os primers se anelem (pareiem) com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72 °C, para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação e o resultado é analisado, por meio de uma eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida seguido de interpretação (SAIKI et al., 1988).

2.3.1.3 Eletroforese em gel

Eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas, de acordo com o seu

tamanho, pois, as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato da moléculas, também, influi, pois, algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel. A eletroforese normalmente é utilizada para separar proteínas e moléculas de DNA e RNA (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma voltagem é aplicada. As proteínas do mesmo tamanho tendem a migrar por meio do gel com velocidades similares, pois, sua estrutura nativa será completamente desdobrada pelo SDS, de maneira a que elas se liguem a uma mesma quantidade de SDS tendo, portanto, a mesma quantidade de cargas negativas. As proteínas maiores, com mais carga, são submetidas a forças elétricas maiores e, também, a um retardamento maior. Livres em solução, os dois efeitos seriam anulados, mas nas malhas do gel poliacrilamida, que age como uma peneira molecular, as proteínas maiores são retardadas muito mais do que as menores (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular. As proteínas majoritárias são facilmente detectadas, corando-se as proteínas do gel com um corante como o azul Coomassie e, mesmo as proteínas menos abundantes são visualizadas em géis tratados com coloração de prata ou ouro (com o qual pequenas quantidades, como 10 ng de proteína, podem ser detectadas em uma banda) (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

2.3.1.3.1 Eletroforese em gel de agarose

Nesse caso, a agarose é utilizada como gel para a eletroforese. A agarose é um polissacarídeo e forma uma rede que prende as moléculas durante a migração. Dependendo da concentração de agarose, há uma diferença no gradiente de separação. Para preparar um gel de agarose, faz-se a mistura entre o pó de agarose e a solução-tampão (TBE). Após fundir, coloca-se brometo de etídio, que fará o DNA ou RNA "brilhar" quando exposto ao UV. A menores temperaturas o gel ganha consistência. Um detalhe importante é a colocação do pente no gel durante o endurecimento. O pente cria poços que serão utilizados para a colocação das amostras. Podemos ver este processo como uma corrida. Cada um é colocado numa pista e na presença de uma corrente elétrica vai deixando o seu rasto ou brilho (VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION, 1997).

REFERÊNCIAS

ABOUD-ZEID, A.; ASHY, M. A. Production of citric acid: a review. **Agriculture Wastes**, Barking, v. 9, n. 1, p. 51-76, June 1984.

ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo**. México: Libros y Editoriales, 1980. 491 p.

ARAÚJO, C. L. **Desenvolvimento de sensor potenciométrico baseado em eletrodos de carbono grafite para determinação de ácido cítrico em bebidas**. 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

ARMILIATO, L. **Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095**. 2004. 98 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamental**. New York: McGraw-Hill, 1986. 928 p.

BARROSO, C. B. **Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger***. 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 529-535, abr. 2008.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 119-130, Sept. 1999.

BUSH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 722, n. 1/2, p. 263-278, Feb. 1999.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. 752 p.

CARGILL. **Produtos cítricos: ácido cítrico anidro**. Uberlândia, 2000. 183 p. Catálogo.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorous on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, Mar. 1998.

COLUMBIA encyclopedia. New York: Columbia University, 2001. 1025 p.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, n. 3, p. 291-302, Mar. 2006.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, Sept. 1992.

DALCIN, G. **Seleção de microrganismos promotores da disponibilidade de nutrientes contidos em rochas, produtos e rejeitos de mineração**. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

DESTRO, M. T. **Listeria monocytogenes em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. 1995. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

ELIZEI, V. G. **Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas.** 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FERREIRA, A. F. S. Acidulantes na indústria de alimentos. In: SIMPÓSIO ADITIVOS PARA ALIMENTOS, 1., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, 1987. p. 9-11.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, Greenbelt, v. 1, n. 2, p. 51-57, Apr. 1986.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, New York, v. 12, n. 2, p. 209-234, June 1995.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 83-93, Jan. 2002.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 5, p. 175-186, Aug. 2004.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 27, n. 3, p. 265-270, Mar. 1995.

KAPOOR, K. K.; CHAUDHARY, K.; TAURO, P. Citric acid. In: REED, G. (Ed.). **Prescott e dunn s industrial microbiology.** Westport: AVI, 1982. p. 709-746.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 79-87, Dec. 1998.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando como substrato bagaço de mandioca**. 1995. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

KONEMAM, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001. 494 p.

KUBICEK, C. P.; RÖHR, M. Citric acid fermentation. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 3, n. 4, p. 331-373, Aug. 1986.

_____. Regulation of citrate synthase from the citric acid producing fungus *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 615, n. 2, p. 449-457, Aug. 1980.

KUMAR, D. et al. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, London, v. 18, n. 1, p. 1-8, Aug. 2002.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: E. Blücher, 1976. v. 2, 960 p.

LEONEL, M.; CERADA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 299-308, 1995.

LOWENSTEIN, J. M. **Citric acid cycle: control and compartmentation**. London: Dekker, 1969. 488 p.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, Jan. 2003.

MARIN, V. A. et al. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 12, n. 1/2, p. 87-132, Apr. 1992.

MENESES, G. D. G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

MILSON, P. E. Organics acids by fermentation, especially citric acid. **Food Biotechnology**, New York, v. 1, n. 5, p. 273-307, June 1988.

MITCHELL, D. A. et al. New developments insolid state fermentation: II., rational approaches to the design, operation and scale-up of bireactors. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, May 2000.

MITCHELL, D. A.; MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. **Bioreactor design and operation for solid state fermentation**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2002. 102 p.

MORAIS, A. S. **Cristalização de ácido cítrico: otimização operacional**. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MULLIN, J. W. The measurement of supersaturation. **The Chemical Engineering**, London, v. 261, p. 186-193, 1972.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 567-572, June 1996.

_____. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: INTERRELAÇÃO FERTILIDADE BIOLOGIA DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 1., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. p. 467-486.

NAHAS, E.; TERENCE, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 128, n. 9, p. 2017-2021, Sept. 1982.

NARLOCH, C. et al. Resposta da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 841-845, Sept. 2002.

NAUTIYAL, C. S. Na efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 265-270, May 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

NOTHENBERG, M. Novos mercados reativam a produção. **Química e Derivados**, São Paulo, v. 205, n. 5, p. 38-43, out. 1983.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Aug. 2000.

_____. Production of organic acids by solid state fermentation. In: _____. **Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asistech, 2010. p. 113-126.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 244-263, July 2007.

PINHO, M. S. L. Biologia molecular do câncer colorretal: uma revolução silenciosa em andamento. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 353-368, 2008.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

PUNTEL, R. L. **Caracterização da atividade pró-oxidante de diferentes agentes e estudo do potencial antioxidante de intermediários do ciclo de Krebs sobre alterações oxidativas induzidas in vitro**. 2008. 93 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

REYES, I. et al. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 281-290, Feb. 1999.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 2006. 107 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RÖHR, M.; KUBICEK, C. P.; KOMINEK, J. Citric acid. In: REED, G.; REHM, H. J. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. p. 419-454.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, New York, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SANTOS, R. R. M. **Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido**. 2010. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. 2005. 63 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

SHANKAR, S. K.; MULIMANIA, V. H. β -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 4, p. 958-961, Aug. 2007.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, jun. 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 311-319, mar./abr. 2000.

SIMÕES, M. L. G.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 5, n. 2, p. 94-96, 2005.

SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SOCCOL, C. R. et al. General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. In: _____. **Encyclopedia on bioresource technology**. New York: Haworth, 2003. p. 652-664.

SON, H. J. et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 1, p. 204-210, Feb. 2006.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 881 p.

TECHNOLOGY INNOVATION MANAGEMENT AND ENTREPRENEURSHIP INFORMATION SERVICE. **Citric acid**. New Delhi, 2000. Disponível em: <<http://www.technopreneur.net/timeis/index.htm>>. Acesso em: 18 out. 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Curitiba). Carlos Ricardo Soccol, Luciana Porto de Souza Vandenberghe. **Processo de produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando o fungo *A. niger***. BR n. DEINPI/PR 00175, 5 jun. 1999.

USHER, K. C. et al. A very short hydrogen bond provides only moderate stabilization of an enzyme-inhibitor complex of citrate synthase. **Biochemistry**, New York, v. 33, n. 2, p. 7753-7759, Mar. 1994.

VANDEBERGHE, L. **Développement d'un procédé pour la production d'acide citrique par fermentation en milieu solide à partir de résidus de l'agro-industrie du manioc**. 2000. 205 p. Thèse (Doctorat en Biotecnologie) - Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 2000.

VP MOLECULAR BIOLOGY VYREX CORPORATION (La Jolla). Kary Banks Mullis. **System for automated performance of the polymerase chain reaction**. US n. PI 5.656.493, 12 Aug. 1997.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances Agronomy**, Madison, v. 96, n. 5, p. 99-151, Nov. 2000.

WHITMAN, W. B.; WYMAN, C. E.; GROHMANN, K. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v. 95, n. 4, p. 65-78, Dec. 1998.

XIN, C. et al. Phosphate-solubilizing microbes in rhizosphere soils of 19 weeds in Southeastern China. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 3, n. 3, p. 355-361, June 2002.

YOKOYA, F. **Fermentação cítrica**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1992. 79 p.

CAPÍTULO 2

BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Aspergillus niger* E ESTUDO DO MECANISMO E OBTENÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

RESUMO

O ácido cítrico é um ácido orgânico importante, multifuncional com uma ampla gama de utilizações, versátil em aplicações domésticas e industriais como acidulante, flavorizante, antioxidante, tamponante e sequestrante. Apesar de muitos micro-organismos poderem ser usados para produzir ácido cítrico, o *Aspergillus niger* continua ser o principal produtor industrial. Apesar de extensa pesquisa realizada, a compreensão dos eventos relevantes para a produção de ácido cítrico não está completamente compreendida. Diversos micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, possuem capacidade para solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos. Portanto, este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar cepas do gênero *Aspergillus* produtoras de ácido cítrico e examinar a solubilização de fosfato a partir destes isolados. Para verificar o mecanismo dos micro-organismos em solubilizar fosfato ao meio na produção de ácido cítrico foi utilizado o fosfato de Araxá. Avaliou-se, ainda, o ácido cítrico em dois meios de cultura BD e SA. Os isolados de *Aspergillus niger* foram eficientes em solubilizar o fosfato de Araxá. O isolado A. niger 00118 se destacou na eficiência de solubilização com aumento de cinco vezes a quantidade de fósforo solúvel quando comparado ao tratamento controle. Os resultados da produção de ácido cítrico evidenciaram uma melhor influência das condições do meio de cultura SA sobre sua produção.

Palavras-chave: Fosfato. Fungo. Solubilização.

ABSTRACT

Citric acid is an important organic acid, multifunctional with a wide array of uses, versatile in domestic and industrial applications as an acidulant, flavoring, antioxidant, buffering and sequestering. In spite of a great deal of microorganisms being able to be used to produce citric acid, *Aspergillus niger* continues being the main industrial producer. Despite the extensive research conducted, the understanding of the events relevant to citric acid production is not completely understood. Several microorganisms, including both bacteria and fungi, possess a capacity to solubilize phosphates by means of different mechanisms. Therefore, this work was intended both to isolate and select strains of the genus *Aspergillus* producing citric acid and investigate the phosphate solubilization from these isolates. To verify the mechanisms of microorganisms to solubilize phosphate to the medium in the citric acid production, Araxá phosphate was utilized. Further, citric acid in two culture media BD and SA was evaluated. The isolates of *Aspergillus niger* were efficient to solubilize Araxá phosphate. The isolate of *A. niger* 00118 stood out in the solubilization efficiency with increase of up to five times the amount of soluble phosphorus when compared with the control treatment. The results of citric acid production stressed a better influence of the conditions of the culture SA medium upon its production.

Keywords: Phosphate. Fungus. Solubilization.

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um ácido orgânico importante, multifuncional com uma ampla gama de utilizações, versátil em aplicações domésticas e industriais, que é produzido industrialmente desde o início do século 20. Muitas toneladas de ácido cítrico são produzidos mundialmente a cada ano.

Apesar de muitos micro-organismos poderem ser usados para produzir ácido cítrico, o *Aspergillus niger* continua ser o principal produtor industrial. O mecanismo bioquímico pelo qual o *Aspergillus* acumula ácido cítrico continua a atrair interesse, embora sua produção comercial já tenha sido estabelecida há décadas. Apesar de extensa pesquisa realizada, a compreensão dos eventos relevantes para a produção de ácido cítrico não está completamente compreendida.

Muitos eventos bioquímicos em conjunto contribuem para a produção de ácido cítrico. A influência dos fatores individuais na produção nem sempre podem ser avaliados sozinhos sem ligar a outros fatores. Isso faz com que a comparação dos dados seja difícil e prejudica as perspectivas para a criação de uma melhor visão global da fermentação do ácido cítrico comercial (PAPAGIANNI; MATTEY, 2007).

A capacidade de obter e manter linhagens particulares é um dos parâmetros fundamentais para o desenvolvimento produtivo biotecnológico. Condições deste processo, como substrato, meio, agitação, concentração de nitrogênio, fósforo, micronutrientes, pH, concentração de inóculo e segurança do micro-organismo têm demonstrado efeitos sobre a qualidade e capacidade de produção, que difere entre os vários tipos de fungos.

Diversos micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, possuem capacidade para solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos. A solubilização de fosfatos inorgânicos ocorre graças à diminuição do valor de pH

ou pela quelatização do metal proporcionada pela produção microbiana de ácidos orgânicos ou inorgânicos liberando fosfato solúvel (BARROSO, 2006; BARROSO; NAHAS, 2005; SPERBER, 1958). Assim para tentar encontrar a relação do mecanismo de solubilização de fosfato e produção de ácido cítrico, este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar cepas do gênero *Aspergillus* produtoras de ácido cítrico e examinar a solubilização destes isolados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras – UFLA, no Laboratório de Central de Análise, do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microbiologia no Eco Centro da EPAMIG.

2.1 Bioprospecção de isolados

Pelo método de plaqueamento direto, amostras de solos, frutos, grãos e pães foram distribuídos em meio Batata Dextrose-Agar (BDA), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e mantidas a 25°C. Após o crescimento dos micro-organismos nas placas coletavam-se esporos de *Aspergillus niger* para uma posterior purificação. A caracterização e a identificação das espécies do gênero *Aspergillus* foi realizada com base na taxonomia usada por Pitt e Hocking (1997). Foram obtidos 30 isolados de *Aspergillus niger* provenientes destas diferentes fontes e origens (Tabela 1). Destes foram selecionados 12 isolados com melhor desempenho quanto à capacidade de solubilização de fosfato e produção de ácido cítrico. Existe uma coleção desses isolados no Laboratório de Microbiologia do Eco Centro da EPAMIG (Lavras-MG). O método de preservação dos fungos utilizados foi o de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

2.2 Micro-organismos e método de inoculação

Para inoculação dos isolados selecionados, suspensões de esporos não germinados, obtida de culturas cultivadas em BDA entre 5 a 7 dias, foram utilizadas como inóculo. Após contagem de esporos em câmara de Neubauer, foi procedida a diluição destas suspensões. Para análises posteriores, cada suspensão dos diferentes isolados foi utilizada com concentração inicial de 1 x

10⁸ esporos/mL. Frascos de erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio BD foi inoculado com 1 mL de suspensão de cada um dos 12 isolados de *Aspergillus*.

Tabela 1 Procedência dos isolados de *Aspergillus niger* – Brasil - 2011

Identificação	Origem	Espécie	Fonte
A. niger 00096	Três Corações -MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café
A. niger 00097	Perdões - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café
A. niger 00098	Perdões - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café - P1
A. niger 00099	Perdões - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café - P2
A. niger 00100	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Rosca
A. niger 00101	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Pão de sal
A. niger 00102	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Pão Integral 1
A. niger 00103	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Pão Integral 2
A. niger 00104	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Uva 1
A. niger 00105	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Uva 2
A. niger 00106	Petrolina - PE	<i>Aspergillus niger</i>	Solo
A. niger 00107	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo - Couve
A. niger 00108	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo - Rosa
A. niger 00109	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo - UFLA
A. niger 00110	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo 2 - UFLA
A. niger 00111	Nepomuceno - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café
A. niger 00112	Ibituruna - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo
A. niger 00113	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo - Alecrim
A. niger 00114	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café 2
A. niger 00115	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café 3
A. niger 00116	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café
A. niger 00117	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café 1
A. niger 00118	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Amendoim
A. niger 00119	São Paulo - SP	<i>Aspergillus niger</i>	ITAL
A. niger 00120	Perdões - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café 2
A. niger 00121	Campanha - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café
A. niger 00122	Perdões - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo
A. niger 00123	Lavras - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo - Café
A. niger 00124	Ijaci - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Fruto Café
A. niger 00125	Campanha - MG	<i>Aspergillus niger</i>	Solo

2.3 Eficiência de solubilização dos isolados

Para verificar o mecanismo de solubilização de fosfato dos microorganismos em solubilizar fosfato para o meio, foi utilizado o fosfato de Araxá. Foi adicionado fosfato de Araxá em dose 3g diretamente para 100 mL de meio de cultura GL líquido (glicose, extrato de levedura). Alíquotas de 1 mL de suspensão dos fungos 10^8 UFC (células mL^{-1}) foram transferidas, individualmente, para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido e 3g de fosfato como fonte de fósforo (P). Estabeleceu-se como controles o meio de cultura mais o fosfato sem inóculo (Controle 1) e o meio de cultura (Controle 2).

Os tratamentos foram incubados a 28°C sob agitação de 190 rpm, por oito dias, sendo utilizadas três repetições para cada tratamento. Após o período de incubação de 8 dias, as culturas foram centrifugadas (5.000g x 10 minutos) e o sobrenadante filtrado em papel filtro Whatman nº42. Para quantificar o fósforo (P) solúvel foi utilizado o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962). Determinou-se, também, o pH, segundo técnica da Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (1992), no sobrenadante filtrado de todas as amostras, incluindo os controles. Avaliou-se o potencial de solubilização do fosfato pelos 12 isolados de *Aspergillus niger* (A. niger 00098, A. niger 00100, A. niger 00102, A. niger 00104, A. niger 00106, A. niger 00107, A. niger 00108, A. niger 00114, A. niger 00116, A. niger 00118, A. niger 00119, A. niger 00124) em meio de cultura líquido.

2.4 Determinação da concentração de ácido cítrico em cultivo submerso

O ácido cítrico foi determinado em dois tipos de meios de cultura:

- Sabouraud - SA (10g peptona, glicose 40g, 1L H₂O q. s. p., pH 7) (MEDVEDEFF et al., 2001).
- Batata dextrose - BD (200 g L⁻¹ batata, 20g L⁻¹ dextrose) (TUIITE, 1969).

Foi inoculado alíquotas de 1 mL de suspensão a 10⁸ UFC (células mL⁻¹) de cada um dos 12 isolados de *Aspergillus niger* (A. niger 00098, A. niger 00100, A. niger 00102, A. niger 00104, A. niger 00106, A. niger 00107, A. niger 00108, A. niger 00114, A. niger 00116, A. niger 00118, A. niger 00119, A. niger 00124) nos dois tipos de meios de cultura (BD e SA) em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura.

Os tratamentos foram incubados a 28°C, sob agitação de 140 rpm, por sete dias, sendo utilizadas três repetições para cada tratamento. Após o período de incubação, o ácido cítrico do meio com os diferentes isolados de *Aspergillus niger* foi determinado pelo método titulométrico com NaOH/fenolftaleína padronizada segundo técnica estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) e fundamentado no peso molecular do ácido cítrico. Para isto, as amostras foram preparadas filtrando-se o meio de cultivo em papel de filtro e coletando-se alíquotas de 10 mL necessárias. As amostras foram transferidas para erlenmeyer de 250 mL para titular com solução padrão de NaOH 0,1 N usando fenolftaleína 0,1% (m/v) como indicador. Determinou-se, também, o pH de todas as amostras, utilizando-se um pHmetro Schott Handylab, segundo técnica da AOAC (1992).

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Para a análise de fósforo solúvel, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 14 tratamentos e três repetições. Para o ácido cítrico o experimento, também, foi conduzido segundo um delineamento experimental inteiramente casualizado, no entanto, os tratamentos foram arrançados segundo um esquema fatorial 12x2 com doze isolados de *Aspergillus*

niger e dois meios de cultura (BD e SA) totalizando 24 tratamentos. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eficiência de solubilização de fosfato

Em meio líquido, todos os 12 isolados de *Aspergillus niger* apresentaram acréscimos na quantidade de fósforo solúvel com o fosfato de Araxá. Os isolados reduziram o pH do meio líquido em relação aos controles sem inoculação (Tabela 2). Essa solubilização do fosfato relacionado à diminuição de pH demonstra o possível mecanismo de solubilização e produção de ácidos.

Tabela 2 Eficiência de solubilização do fosfato de Araxá por isolados de *Aspergillus niger* em meio líquido. UFLA, Lavras, MG, 2011

Tratamentos	Fósforo Solúvel (mg/Kg)	pH
A. niger 00118	77,23 a	1,87 a
A. niger 00104	66,41 b	1,91 a
A. niger 00114	56,84 c	2,01 b
A. niger 00116	51,12 d	2,11 c
A. niger 00098	47,66 e	2,27 d
A. niger 00119	42,04 f	2,33 e
A. niger 00107	35,24 g	2,41 f
A. niger 00108	33,94 h	2,52 g
A. niger 00124	28,54 i	2,97 i
A. niger 00106	26,42 j	3,04 i
A. niger 00100	25,37 l	2,97 h
A. niger 00102	19,29 m	3,21 j
Controle 1	14,69 n	6,85 l
Controle 2	1,13 o	7,02 m

CV (%): 0,93

Erro Padrão: 0,018

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O estudo de Chuang et al. (2007) indicou a correlação significativa e positiva entre fosfato e acidez. Para haver solubilização há necessidade da produção de ácidos. Esse mesmo mecanismo, também, foi relatado na literatura de Vassilev et al. (2006) sendo o ácido cítrico considerado como forte agente solubilizador.

De acordo com Barroso e Nahas (2005), aumentando a acidez titulável, ocorre diminuição nos valores de pH final, e um aumento da acidez titulável ou uma diminuição nos valores de pH final correspondem a um aumento do teor de fosfato solúvel.

A solubilização do fosfato decorreu da diminuição do pH, pois, os tratamentos com as maiores quantidades de fósforo solúvel (*A. niger* 00118, *A. niger* 00104 e *A. niger* 00114) tiveram os menores valores de pH e os tratamentos com as menores quantidades de fósforo solúvel (*A. niger* 00102, *A. niger* 00100 e *A. niger* 00106) apresentaram os maiores valores de pH (Figura 1). Este resultado mostra uma relação inversa entre a quantidade de fósforo e os valores de pH no meio de cultura para os isolados testados. Barroso e Nahas (2008), também, obtiveram essa relação inversa em seu trabalho de solubilização de FePO_4 com *Aspergillus niger*.

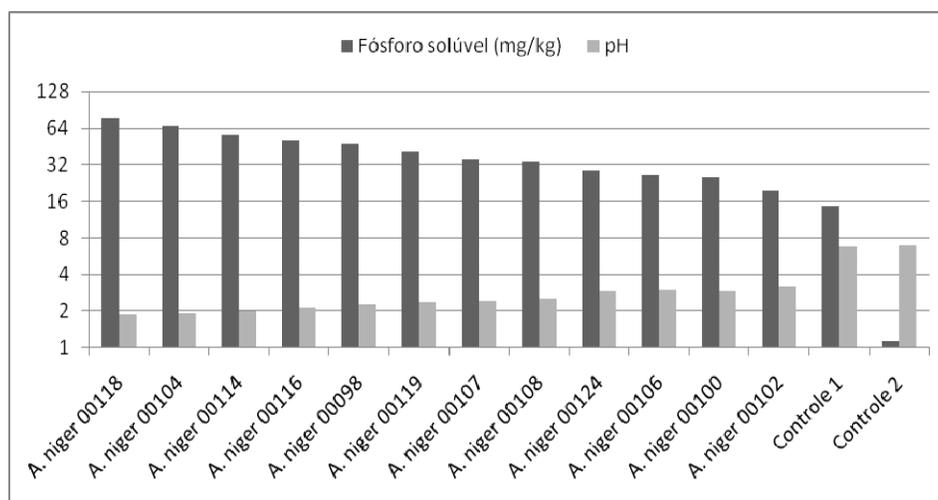


Figura 1 Avaliação da solubilização do fosfato de Araxá e pH final do meio de cultura líquido inoculados com isolados de *Aspergillus niger*

De modo geral, o isolado A. niger 00118 destacou-se dos demais tratamentos com a maior quantidade de fósforo solúvel e menor pH, aumentando em média cerca de cinco vezes a quantidade de fósforo solúvel no meio quando comparado ao Controle 1. Este resultado pode ser atribuído à melhor adaptação do isolado ao meio de cultura evidenciando uma maior habilidade em produzir metabólitos acidificantes para solubilização de fosfato. Isso indica que a capacidade de solubilização difere entre os diferentes isolados e que um pode ser melhor que o outro.

No tratamento Controle 2 (apenas meio de cultura) foi observada uma pequena quantidade de fósforo solúvel, possivelmente, o meio de cultura utilizado GL que tem extrato de levedura tem uma quantidade mínima de fósforo. De acordo com Santucci et al. (2003), o extrato de levedura contém todo o material solúvel de autolisado (auto digestão das células), incluindo proteínas, peptídios, aminoácidos livres, nucleotídeos, vitaminas, oligossacarídeos e

minerais, incluindo macroelementos (Ca, P, Mg, K, Na, Al e Fe) e microelementos (Mn, Cu, B, Zn, Mo, Cd, Cr, Ni, Pb, Si e Se) e carboidratos entre 25-35%.

3.2 Determinação da produção de ácido cítrico

Com relação à produção de ácido cítrico verifica-se, pela Tabela 3, variação entre os isolados e que o *A. niger* 00118 foi o mais eficiente chegando a uma concentração de 18,42 g/100g de ácido cítrico em meio SA e 8,62 g/100g em meio BD, sendo superior à produção obtida entre os isolados estudados. A menor produção de ácido cítrico no meio SA foi 6,65g/100g do *A. niger* 00124 e no meio BD foi 1,97g/100g do *A. niger* 00100. No trabalho de Santos (2005), a produção de ácido cítrico por fermentação submersa de hidrolisado hemicelulósico utilizando cepas de *Aspergillus niger* e controle de concentração de açúcares, metais e oxigênio obteve concentrações de, aproximadamente, 14,98 g/L de ácido cítrico.

Tabela 3 Produção de ácido cítrico por isolados de *Aspergillus niger* em cultivo submerso. UFLA, Lavras, MG, 2011

Tratamentos	Ácido cítrico meio BD (g/100g)	Ácido cítrico meio SA (g/100g)
A. niger 00098	7,81 Ba	12,34 Eb
A. niger 00100	1,97 La	7,56 Hb
A. niger 00102	2,02 La	7,15 Ib
A. niger 00104	7,69 Ca	12,83 Cb
A. niger 00106	3,06 Ia	10,15 Gb
A. niger 00107	4,72 Ga	11,25 Fb
A. niger 00108	4,02 Há	11,21 Fb
A. niger 00114	6,47 Da	13,63 Bb
A. niger 00116	6,33 Ea	12,82 Cb
A. niger 00118	8,62 Aa	18,42 Aa
A. niger 00119	5,25 Fa	12,47 Db
A. niger 00124	2,24 Já	6,65 Jb
CV (%): 0,21		
Erro Padrão: 0,007		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em pesquisa de biossíntese de ácido cítrico em resíduo líquido de manipueira Leonel e Cereda (1995) utilizando apenas uma cepa de *Aspergillus niger* atingiu 2,56 g/L de ácido cítrico em meio sintético e 2,86 g/L em resíduo de manipueira. Prado et al. (2005), com a fermentação no estado sólido do bagaço de mandioca, utilizando, também, *Aspergillus niger* conseguiu um acúmulo de ácido cítrico correspondente a 26,9 g/100g.

Os resultados apresentados evidenciaram a influência das condições do meio sobre a produção de ácido cítrico (Figura 2). No meio SA os isolados apresentaram maior produção de ácido cítrico do que no meio BD. O fato pode ser explicado pela diferença da concentração de açúcares e de proteínas presente no meio SA como a glicose e peptona, disponibilizando maior energia para os

isolados com as melhores fontes de carbono e nitrogênio. Esta ocorrência está de acordo com Santos (2005), que observou baixo rendimento de ácido cítrico em decorrência do fato da baixa concentração de açúcar no meio.

A estimativa de ácido cítrico na literatura é bem variável, mas essas diferenças são em virtudes dos tipos de processos utilizados. A escolha do isolado utilizado na produção de ácido cítrico, também, é de grande importância. Embora, em geral, todas as cepas de *Aspergillus niger* apresentem capacidade de produzir ácido cítrico, cada cepa pode apresentar particularidades quanto à quantidade de ácido cítrico produzido e sua adaptação ao meio.

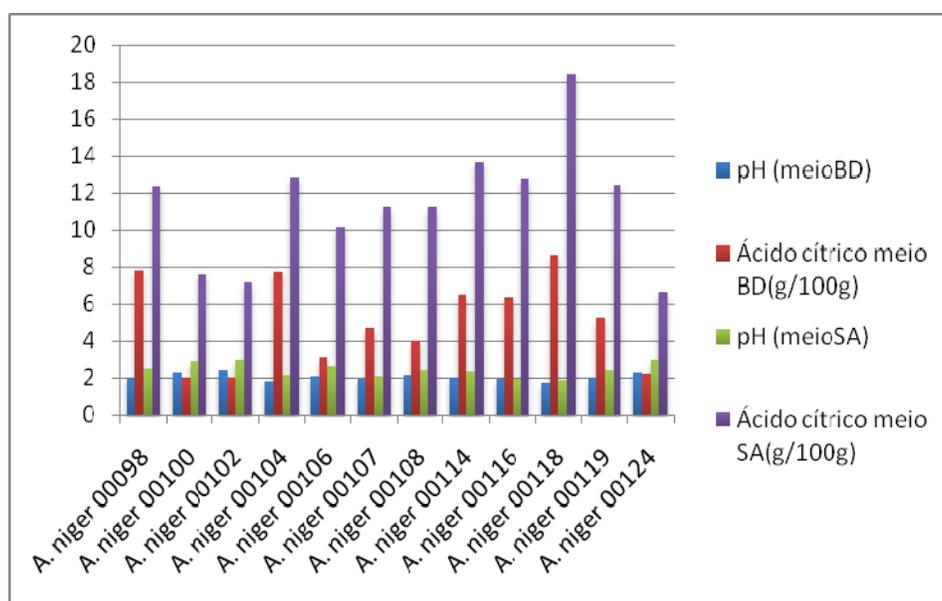


Figura 2 Avaliação do ácido cítrico e pH final em dois tipos de meio de cultura líquido inoculados com diferentes isolados de *Aspergillus niger*

O melhor desempenho de ácido cítrico do isolado *A. niger* 00118 de 18,42 g/100g pode ser considerado como satisfatório, pois, nenhum fator do meio, que poderia afetar o metabolismo do ácido cítrico e produção dos fungos, tais como efeito de metais, aeração, quantidade de açúcar, transferência de calor e oxigênio, foi controlado. Este isolado selecionado como produtor de ácido cítrico, pode ser utilizado em escalas maiores de produção em biorreatores de fermentação, porém, um estudo detalhado deve ser realizado a fim de testar cada fator e suas influências em seu processo específico de produção e potencializar seu uso.

Os valores de pH dos dois meios estudados tiveram pouca diferença, sendo os mais baixos para os do meio BD e os valores mais altos para os do meio SA. Os resultados da Tabela 4 não implicam na ligação entre pH e produção de ácido cítrico. As observações de Rodrigues (2006) sugerem que variações nos valores de pH não apresentam efeito significativo para produção de ácido cítrico com cepas de *Aspergillus niger*. Da mesma forma Armiliato (2004), em estudo com *Candida lipolytica*, também, verificou que o pH não promove alterações significativas na quantidade de ácido cítrico acumulada.

Baseado nos resultados observa-se (Figura 3) que, apesar de todos os 12 isolados solubilizarem fosfato, pode-se perceber uma produção de ácido cítrico um pouco mais elevada nos isolados (*A. niger* 00118, *A. niger* 00104, *A. niger* 00114, *A. niger* 00098, *A. niger* 00116) que apresentaram maior quantidade de fósforo solúvel e os isolados (*A. niger* 00124, *A. niger* 00102 e *A. niger* 00100) que tiveram menor produção de ácido cítrico mostrou menor eficiência em solubilizar o fosfato. Esses dados demonstram a relação entre a eficiência da solubilização do fósforo e a produção de ácido cítrico. Portanto, uma maior compreensão da diversidade, eficiência e capacidade dos micro-organismos em solubilizar fosfato pode favorecer a seleção e identificação de isolados potencialmente úteis para produzir ácido cítrico.

Tabela 4 Influencia do pH na produção de ácido cítrico por isolados de *Aspergillus niger* em cultivo submerso. UFLA, Lavras, MG, 2011

Tratamentos	pH (meioBD)	pH (meioSA)
A. niger 00098	1,99 Da	2,47 Gb
A. niger 00100	2,30 Ga	2,96 Ib
A. niger 00102	2,44 Ha	3,02 Jb
A. niger 00104	1,81 Ba	2,16 Db
A. niger 00106	2,04 Ea	2,61 Hb
A. niger 00107	1,90 Ca	2,07 Cb
A. niger 00108	2,14 Fa	2,41 Fb
A. niger 00114	2,03 Ea	2,33 Eb
A. niger 00116	1,92 Ca	1,91 Ba
A. niger 00118	1,74 Aa	1,85 Ab
A. niger 00119	2,01 Da	2,45 Gb
A. niger 00124	2,32 Ga	2,97 Ib

CV (%): 0,44
Erro Padrão: 0,003

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

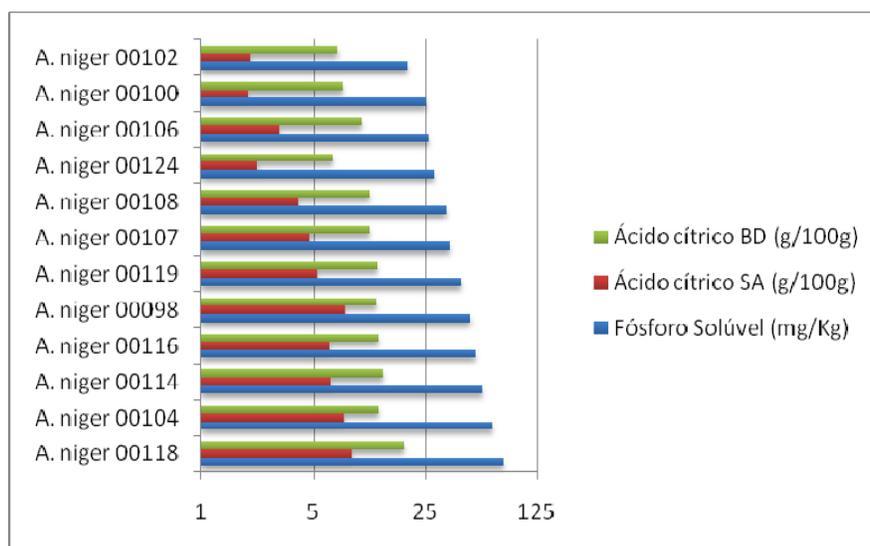


Figura 3 Avaliação e comparação da quantificação de ácido cítrico e solubilização de fósforo dos isolados de *Aspergillus niger*

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, conclui-se que:

- a) dos 30 isolados de *Aspergillus niger* estudados apenas 12 foram eficientes em solubilizar o fosfato de Araxá;
- b) o isolado A. niger 00118 se destacou na eficiência de solubilização com aumento de cinco vezes a quantidade de fósforo solúvel do controle;
- c) os resultados da produção de ácido cítrico evidenciaram uma melhor influência das condições do meio de cultura SA sobre sua produção;
- d) o isolado A. niger 00118 foi o mais eficiente na produção de ácido cítrico nos dois meios estudados;
- e) a produção de ácido cítrico foi um dos mecanismos de solubilização do fosfato pelos isolados de *Aspergillus niger*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de micro-organismos e espécies, que permitem alto rendimento de ácido cítrico, é de interesse industrial por ser amplamente explorado na biotecnologia, sendo, assim, uma área em plena expansão em decorrência de seu grande potencial aplicativo. Entretanto, algumas análises se tornam bastante restritas, apresentando limitações com relação à sensibilidade e à especificidade do micro-organismo. Alguns desafios precisam ser superados para o desenvolvimento de estratégias e procedimentos inovadores a partir de estudos centrados em bases moleculares e celulares na promoção do entendimento de enzimas, mecanismos e vias reguladoras do ácido cítrico e na prospecção da diversidade microbiana em escala estrutural e funcional.

REFERÊNCIAS

ARMILIATO, L. **Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095**. 2004. 98 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. Washington, 1992. 1015 p.

BARROSO, C. B. **Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger***. 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 529-535, abr. 2008.

_____. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 11, p. 73-83, Sept. 2005.

CHUANG, C. C. et al. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 575-584, June 2007.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, abr. 1967.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de Alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, 533 p.

LEONEL, M.; CERADA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 299-308, 1995.

MEDVEDEFF, M. G. et al. Comparación *in vitro* de la acción fungicida de solución saturada de azúcar y nitrato de econazol. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 42, n. 7, p. 203-207, Sept. 2001.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Analytical Chemistry Acta**, Washington, v. 27, p. 31-36, 1962.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 244-263, July 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Relation between citric acid production by solid-state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 29-36, 2005. Special Issue.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 2006. 107 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. 2005. 63 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

SANTUCCI, M. C. C. et al. Efeito do enriquecimento de biscoitos tipo água e sal, com extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 441-446, set. 2003.

SPERBER, J. I. The incidence of apatite: solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 9, n. 4, p. 778-781, Apr. 1958.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

VASSILEV, N. et al. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, n. 1, p. 77-84, Aug. 2006.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A CITRATO
SINTASE E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Aspergillus niger***

RESUMO

A utilização da expressão genética permite diversas formas de abordagem que promovem respostas para algumas questões básicas que incluem, se o gene é expresso, suas interações e identificação de grupos de genes que implicam na ativação ou repressão de diversas vias reguladoras. Como o acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é acompanhado pelo desaparecimento, redução ou aumento de algumas enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, a utilização de técnicas moleculares pode ser uma alternativa viável para a caracterização e identificação do gene que codifica a citrato sintase na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. O objetivo do presente trabalho foi verificar o nível de expressão de genes envolvidos na identificação de isolados de *Aspergillus niger* e citrato sintase com a produção de ácido cítrico. A extração de DNA das amostras provenientes de 12 isolados de *Aspergillus niger* foi feita, por meio do WizardTM Genomic DNA Purification Kit (Promega). A amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando primer para região ITS e primer específico para citrato sintase (P1/P2). O sequenciamento de bases da região ITS foi um método simples, rápido e eficiente para auxiliar na identificação de isolados de *Aspergillus niger*. O par de primer P1/P2 foi sensível para diferenciar os isolados A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098 e A. niger 00118 na expressão de genes da enzima citrato sintase.

Palavras-chave: Enzima. Extração. Sequenciamento.

ABSTRACT

Use of the genetic expression allows several approach forms which promote responses to some basic issues which include, whether the gene is expressed, its interactions and identification of groups of genes which imply either in the activation or repression of several regulatory pathways. As the accumulation of citric acid by *Aspergillus niger* is accompanied by the disappearance, reduction or increase of some tricarboxylic acid cycle enzymes, the use of molecular techniques may be a alternative viable to the characterization and identification of the gene codifying for citrate synthase in citric acid production by *Aspergillus niger*. The aim of the present work was verifying the expression rate of genes involved in the identification of *Aspergillus niger* isolates and citrate synthase with citric acid production. The DNA extraction of the samples coming from 12 isolates of *Aspergillus niger* was done by means of *WizardTM Genomic DNA Purification Kit* (Promega). The amplification by the polymerase chain reaction (PCR) was performed by using primer for ITS region and primer specific to citrate synthase (P1/P2). The base sequencing of the ITS region was a simple, fast and efficient method to aid in identifying isolates of *Aspergillus niger*. The pair of P1/P2 primer was sensitive to distinguish the isolates A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098 and A. niger 00118 in the expression of citrate synthase enzyme genes.

Keywords: Enzyme. Extraction. Sequencing.

1 INTRODUÇÃO

Técnicas moleculares apresentam grande potencial para estudos de identificação e de diversidade de fungos filamentosos, sem os problemas de variações nos caracteres morfológicos que dificultam a taxonomia tradicional.

Nas últimas décadas verificaram-se avanços, nos estudos de biologia molecular, que propiciaram o desenvolvimento e emprego de técnicas moleculares para obtenção, detecção, identificação e caracterização de genes. A utilização da expressão genética permite diversas formas de abordagem que promovem respostas para algumas questões básicas que incluem, se o gene é expresso, suas interações e identificação de grupos de genes que implicam na ativação ou repressão de diversas vias reguladoras.

Dentre as técnicas moleculares que se destacam, incluem as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). A reação, em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, por meio da qual pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo (BOER; BEUMER, 1999; GANDRA et al., 2008; KONEMAM et al., 2001; MALORNY et al., 2003).

O DNA ribossomal (rDNA) é uma região do DNA nuclear codificante de ribossomos e suas sequências têm sido muito utilizadas em sistemáticas de fungos, para identificar espécies e para determinar raças ou origem geográfica. Os ribossomos são organelas responsáveis pela síntese de proteínas nas células e consistem de duas subunidades, uma pequena e outra grande. Um único gene codifica a subunidade pequena, *the small subunit* (SSU), a subunidade grande *the large subunit* (LSU) e a região 5.8s. O gene é interrompido pelas regiões espaçadoras internas do rDNA – Internal Transcribed Spacer (ITS), que se

repetem por várias vezes no cromossomo e que, geralmente, são bem conservadas entre os fungos e podem identificar sequências do DNA de certos organismos específicos, como determinadas espécies (BARROCAS, 2008; GARDES; BRUNS, 1993). As regiões ITS e IGS são utilizados para realizar estudos filogenéticos em população de fungos filamentosos (HENRY; IWEN; HINRICHS, 2000) e desenvolver ensaios específicos de PCR para identificar espécies importantes tal como *Fusarium* e *Aspergillus* (PATIÑO et al., 2004).

A via metabólica estabelecida envolvida na biossíntese do ácido cítrico inclui a citrato sintase e esta enzima é, muitas vezes, considerada como fundamental no ciclo do ácido cítrico, talvez, porque pode ser considerada como o primeiro passo do ciclo. A enzima cataliza a reação de condensação de acetato e acetil coenzima A com uma molécula de oxaloacetato para formar citrato (PAPAGIANNI; MATTEY, 2007).

Como o acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é acompanhado pelo desaparecimento, redução ou aumento de algumas enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, a utilização de técnicas moleculares pode ser uma alternativa viável para a caracterização e identificação do gene que codifica a citrato sintase na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. E com a utilização de primers específicos para espécie do gênero é possível aprimorar as técnicas de detecção ao ponto desejável de realizar esta operação diretamente em isolados selecionados, agilizando o processo.

Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi verificar o nível de expressão de genes envolvidos na identificação de isolados de *Aspergillus niger* e eficiência da citrato sintase com a produção de ácido cítrico visando à seleção de isolados superiores para produção industrial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras – UFLA, no Laboratório de Microbiologia no Eco Centro da EPAMIG e no Laboratório de Biologia Molecular (Bio LAPS) na Patologia de Sementes no Departamento de Fitopatologia.

2.1 Origem dos isolados e manutenção das culturas

Foram utilizados 12 isolados de *Aspergillus niger* (A. niger 00098, A. niger 00100, A. niger 00102, A. niger 00104, A. niger 00106, A. niger 00107, A. niger 00108, A. niger 00114, A. niger 00116, A. niger 00118, A. niger 00119, A. niger 00124) provenientes de diferentes fontes e origens da coleção do Eco Centro do Laboratório de Microbiologia da EPAMIG. Estes isolados foram caracterizados por produzir ácido cítrico em meio de cultura BD e SA tendo como mecanismo de produção a solubilização de fosfato de Araxá. Colônias dos fungos foram mantidas e transferidas para meio de batata dextrose Agar (BDA) e mantidas em incubação, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O micélio de cada isolado, crescido superficialmente, foi raspado, lavado com água estéril. Foram utilizadas suspensões destes micélios de 1 mL com concentração inicial de 1×10^8 esporos/mL para inocular em frascos de erlenmeyer de 125 mL com meio de cultura BD. Os isolados em meio líquido BD foram incubados a 28°C sob agitação de 140 rpm, por três dias para posterior extração de DNA.

2.2 Extração de DNA

As amostras dos isolados foram maceradas em nitrogênio líquido e foram retirados, aproximadamente, 1 grama de cada amostra/isolado e, para cada

repetição usada, foram pesados 0,04 gramas para extração de DNA. A extração de DNA das amostras provenientes dos 12 isolados de *Aspergillus niger* foi feita por meio do *WizardTM Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo o protocolo do fabricante e segundo Bartlett e Stirling (2003). A qualidade dos DNAs foi observada em gel agarose 0,8% em tampão 1Xtbe (40mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0), sendo corados com gel red e visualizados sob luz UV. O DNA foi quantificado no Spectrophotometer ND 1000 Nano Drop.

2.3 Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os pares de primers (iniciadores) das sequências ITS 1 e ITS 4 (TCCGTAGGTGAACCT GCGG/ TCC TCCGCTTATTGATATGC) descritos por Mirhendi et al. (2007) foram utilizados para amplificar regiões do rDNA dos 12 isolados de *Aspergillus niger*. E para expressão do gene da citrato sintase nos isolados, foi utilizado os pares de *primer* (GCGAATTCATGTCTACCGCAAGGCCAAGTCC/GCCCCGGGTCATTT ACAGCTTAGCACC), descritos por Kirimura et al. (1999). A amplificação foi realizada em 25µl da reação contendo tampão da PCR (tampão IB – Phoneutria, Brasil) 500 mM KCl, 100mM Tris-HCL pH 8,4, 1% Triton X-100, 15 MgCl), dNTPs (2,5 mM de cada dNTP), *primers* (10 µM de cada primer *forward* ou *reverse*) e 25u/µl unidades *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Brasil). Para a amplificação dos isolados utilizou-se 2µl do DNA concentrado. Água milique autoclavada foi utilizada como controle negativo da PCR. A amplificação constou, inicialmente, de desnaturação de 95 ° C por 2 minutos no início, mais 94 ° C por 45 segundos, anelamento de 55 ° C por 45 segundos com extensão final de 72 ° C por 150 segundos, num total de 30 ciclos. Uma alíquota de 10µl foi utilizada para separar os produtos da PCR submetidos à eletroforese em gel

de agarose 1,5% em tampão TBE a 150V por, aproximadamente, 2 horas. O gel foi corado com gel red e os produtos da PCR foram observados em transluminador UV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *Aspergillus niger* tiveram amplificados somente fragmentos do DNA genômico correspondentes à região ITS 1 e ITS 4 com bandas de, aproximadamente, 600 pares de base. Os *primers* ITS 1 e ITS 4 foram utilizados, também, para assegurar a qualidade do DNA.

Segundo Barrocas (2008) e Phan et al. (2002) as regiões *internal transcribed spacer* (ITS) do rDNA têm sido amplamente utilizadas para diferenciar e detectar espécies fúngicas proximamente relacionadas. E, de acordo com White et al. (1990), a região ITS é facilmente amplificada, já que está compreendida entre 600 e 800 pares de base.

O DNA dos isolados foram extraídos e amplificados eficientemente (Figura 1), no entanto, o controle (Linha 13) não foi amplificado para região ITS. O tamanho dos fragmentos amplificados foi de, aproximadamente, 600 pares de bases (pb) para todos os isolados e foram visualizados na mesma posição no gel de agarose considerados de mesmo tamanho (Figura 1). A região ITS provou ser uma ferramenta útil para auxiliar na identificação dos isolados de *Aspergillus niger* assim, os resultados sugerem que técnicas moleculares por meio do sequenciamento direto do produto do PCR-ITS rDNA, combinado com características morfológicas são eficientes para a separação e identificação de espécies uma vez que a taxonomia somente pela morfologia pode não ser suficiente para a caracterização e confirmação de espécies, além de ser um método confiável que proporciona uma identificação mais adiantada do que os métodos de cultivo padrão.

Tais resultados corroboraram os trabalhos de Accensi et al. (1999) e Menezes (2010), onde mediante métodos moleculares de análise do DNA foi possível diferenciar espécies, uma vez que esses detectam o polimorfismo existente entre as sequências de nucleotídeos dos organismos. Menezes (2010)

expuseram, também, em seus resultados, a ideia de que a identificação de espécies, baseada somente em características morfológicas e culturais tem limitações, uma vez que essas são influenciadas pelo ambiente, alterando o fenótipo de isolados fúngicos. Segundo Hinrikson et al. (2005) além disso, os testes de morfologia são geralmente trabalhosos e necessitam de pessoal especialista em micologia.

González-Salgado et al. (2005), em trabalho de discriminação de *Aspergillus niger* com outras espécies de *Aspergillus*, determinaram que seus ensaios por PCR com base na região ITS foram altamente sensíveis e específicos e representam uma boa ferramenta para a detecção de espécies.

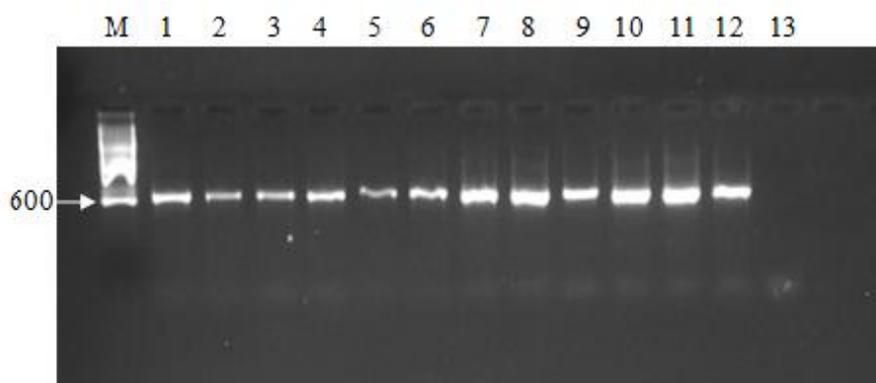


Figura 1 Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose dos isolados de *Aspergillus niger*. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 representam respectivamente a amplificação DNA genômico de culturas puras dos isolados (*A. niger* 00116, *A. niger* 00108, *A. niger* 00107, *A. niger* 00104, *A. niger* 00106, *A. niger* 00114, *A. niger* 00119, *A. niger* 00100, *A. niger* 00102, *A. niger* 00098, *A. niger* 00118, *A. niger* 00124) e Linha 13 que representa o controle, utilizando o primer ITS 1/ITS 4. Linha M – Marcador molecular 1 Kb AMRESCO

O par de primer P1/P2 da citrato sintase foi específico para diferenciar isolados de *Aspergillus niger* na atividade da enzima. Somente o DNA genômico dos isolados A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098 e A. niger 00118 foram amplificados com os primers P1/P2. O tamanho dos fragmentos foi de aproximadamente 920 pares de bases (pb) e foram visualizados na mesma posição no gel de agarose considerados de mesmo tamanho sendo o controle (Linha 13) negativo para a amplificação (Figura 2).

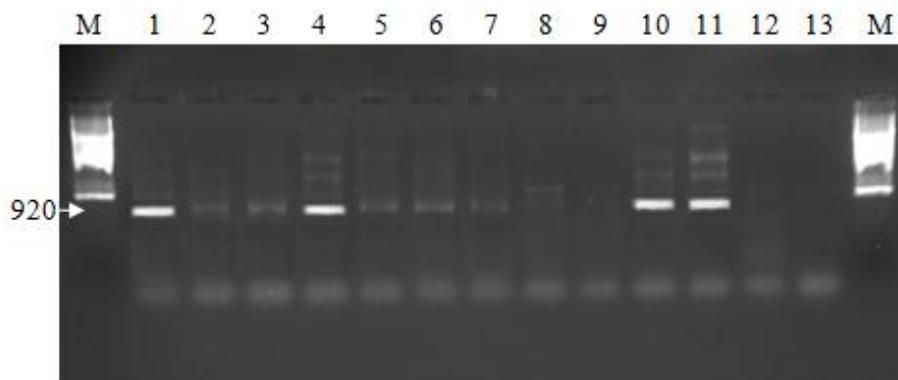


Figura 2 Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose dos isolados de *Aspergillus niger*. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 representam respectivamente a amplificação DNA genômico de culturas puras dos isolados (A. niger 00116, A. niger 00108, A. niger 00107, A. niger 00104, A. niger 00106, A. niger 00114, A. niger 00119, A. niger 00100, A. niger 00102, A. niger 00098, A. niger 00118, A. niger 00124) e Linha 13 que representa o controle, utilizando o par de primers específico (P1/P2) da citrato sintase de *Aspergillus niger*. Linha M – Marcador molecular 1 Kb AMRESCO

Há poucos trabalhos na literatura que definem uma correlação certa da citrato sintase de *Aspergillus niger* com a produção de ácido cítrico.

Jaklitsch, Kubfcek e Scrutton (1991), em estudo com enzimas envolvidas na produção de citrato por *Aspergillus niger* avaliaram cepas produtoras de ácido cítrico e todas apresentaram atividade da citrato sintase.

O ciclo do ácido tricarbóxico desempenha papel importante na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. E, segundo Kirimura et al. (1999), não há nenhuma evidência direta ou indireta de que o gene (s) de codificação da citrato sintase está relacionada com os aspectos normativos da produção de ácido cítrico.

A biossíntese de citrato envolve pelo menos uma etapa mitocondrial, ou seja, a citrato sintase, está localizada exclusivamente na mitocôndria. Com base na atividade das enzimas presentes em extratos de fungo, a reação parece ter capacidade natural suficiente para o acúmulo de ácido cítrico (RATLEDGE, 2000); e uma superexpressão do gene correspondente a citrato sintase, portanto, não tem efeito sobre o taxa de acúmulo de ácido cítrico (RUIJTER et al., 2000). Portanto, as alterações na atividade da citrato sintase, que ocorrem ao longo da fermentação, não deve ter consequência sobre a produção de ácido cítrico (KARAFFA; KUBICEK, 2003).

Todos os 12 isolados de *Aspergillus niger* analisados para a expressão de genes da enzima citrato sintase, foram selecionados por produzir ácido cítrico em meio líquido e apenas 4 destes isolados amplificaram seus fragmentos para a citrato sintase (A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098, A. niger 00118) demonstrando uma variação na presença da enzima entre eles, essa diferença pode estar relacionada ao fato dos isolados consistirem de diferentes fontes e origens. Se a atividade da citrato sintase e sua expressão de gene fosse natural no acúmulo e produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* consequentemente sua amplificação teria que ser positiva para todos os isolados em estudo de DNA

genômico. Dessa forma para obter a expressão de genes da citrato sintase e uma relação com a produção de ácido cítrico e sua distinção entre isolados, é necessário que novos estudos sejam desenvolvidos, empregando uma indução da produção de ácido cítrico que se utilize de metodologias para quantificar a expressão da citrato sintase com o aumento de produção de ácido cítrico.

4 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, conclui-se que:

- a) o sequenciamento de bases da região ITS foi um método simples e rápido para auxiliar na identificação dos isolados de *Aspergillus niger* estudados;

- b) o par de primer P1/P2 foi sensível para diferenciar os isolados A. niger 00116, A. niger 00104, A. niger 00098 e A. niger 00118 na expressão de genes da enzima citrato sintase;

- c) a expressão de genes da citrato sintase entre os isolados de *Aspergillus niger* não foi suficiente para uma relação com a produção de ácido cítrico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os recursos da biologia molecular que auxiliam no estabelecimento da correlação dos genomas à sua função biológica pelo estudo das moléculas ou proteínas que estão expressando, aceleram o entendimento de interação micro-organismo e produção biotecnológica. Também permite identificar grupos de genes que implicam na ativação ou repressão de diversas vias metabólicas. Em etapas subsequentes é importante considerar novas tentativas metodológicas, como o uso da RFLP, BIO-PCR e o exame da técnica de PCR em tempo real para melhor identificar, quantificar material desejado ou fazer uso de seu de fragmentos de DNA de interesse.

REFERÊNCIAS

ACCENSI, F. et al. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 2, p. 191-196, Nov. 1999.

BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas.** 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. Methods in molecular biology. **Biochemistry**, New York, v. 226, n. 6, p. 3-6, Mar. 2003.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 119-130, Sept. 1999.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 113-118, Apr. 1993.

GONZÁLEZ-SALGADO, A. et al. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p. 353-361, Apr. 2005.

HENRY, T.; IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1510-1515, Apr. 2000.

HINRIKSON, H. P. et al. Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 2092-2103, May 2005.

JAKLITSCH, W. I. M.; KUBFCEK, C. P.; SCRUTTON, M. C. Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 10, p. 823-827, Nov. 1991.

KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, n. 3, p. 189-196, Mar. 2003.

KIRIMURA, K. et al. Cloning and sequencing of the chromosomal DNA and cDNA encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus niger*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 88, n. 3, p. 237-243, Mar. 1999.

KONEMAM, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001. 494 p.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, Jan. 2003.

MENEZES, J. P. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, jan./fev. 2010.

MIRHENDI, H. et al. Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 11, p. 1568-1570, Nov. 2007.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 244-263, July 2007.

PATIÑO, B. et al. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 6, p. 1278-1283, Dec. 2004.

PHAN, H. T. T. et al. A rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Ascochyta rabiei*, the cause of ascochyta blight of chickpea. **Australasian Plant Pathology**, Victoria, v. 31, n. 1, p. 31-39, Mar. 2002.

RATLEDGE, C. Look before you clone: a comment on 'properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of citA overexpression on citric acid production' by Ruijter, Panneman, Xu and Visser. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 317-319, Dec. 2000.

RUIJTER, G. J. G. et al. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of citA overexpression on citric acid production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 184, n. 4, p. 35-40, Aug. 2000.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequences of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.