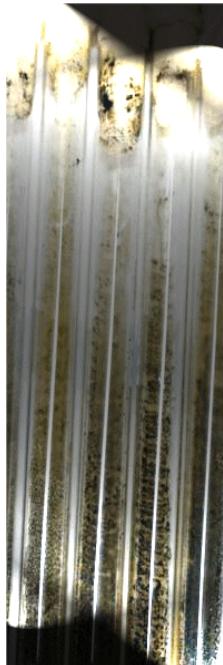


**Fungos Filamentosos de Interesse  
em Agroenergia: Avaliação de  
Diferentes Metodologias de  
Preservação do Fungo  
*Aspergillus niger***





ISSN 1678-0434

Outubro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Instrumentação  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 37***

## **Fungos Filamentosos de Interesse em Agroenergia: Avaliação de Diferentes Metodologias de Preservação do Fungo *Aspergillus niger***

Cristiane Sanchez Farinas  
Daiane Carla Barboza

São Carlos, SP  
2012

**Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:**

**Embrapa Instrumentação**  
Rua XV de Novembro, 1452  
Caixa Postal 741  
CEP 13560-970 - São Carlos-SP  
Fone: (16) 2107 2800  
Fax: (16) 2107 2902  
[www.cnpdia.embrapa.br](http://www.cnpdia.embrapa.br)  
E-mail: [sac@cnpdia.embrapa.br](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: João de Mendonça Naime  
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,  
Sandra Protter Gouvea  
Washington Luiz de Barros Melo  
Valéria de Fátima Cardoso  
Membro Suplente: Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso  
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso  
Imagen Capa: Daiane Carla Barboza  
Editoração eletrônica: Foco Comunicação

**1ª edição**

1ª impressão (2012): tiragem 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.**

**Embrapa Instrumentação**

---

F225f Farinas, Cristiane Sanchez

Fungos filamentosos de interesse em agroenergia: avaliação de diferentes metodologias de preservação do fungo *Aspergillus niger* / Cristiane Sanchez Farinas, Daiane Carla Barboza. -- São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2012.

17 p. -- (Embrapa Instrumentação. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 37; ISSN: 1678-0434).

1. Fungos. 2. Celulase. 3. Xilanase. 4. Enzimas. 5. Preservação.  
6. Microbiologia. I. Barboza, Daiane Carla. II. Título. III. Série.

CDD 21 ED. 579.5  
660.62

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
1. Introdução .....	7
2. Metodologia .....	8
3. Resultados .....	11
Conclusão .....	16
Referências .....	16



# **Fungos Filamentosos de Interesse em Agroenergia: Avaliação de Diferentes Metodologias de Preservação do Fungo *Aspergillus niger***

---

Cristiane Sanchez Farinas<sup>1</sup>

Daiane Carla Barboza<sup>2</sup>

## **Resumo**

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Isso tem propiciado ao homem explorar algumas linhagens fúngicas que apresentam capacidade de produzir enzimas com diversas aplicações industriais. No entanto, a preservação adequada desses microrganismos visando à manutenção das suas características originais por longos períodos de tempo é de suma importância para sua aplicação em pesquisas e desenvolvimento dos processos biotecnológicos, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. A escolha adequada do método mais apropriado deve ser baseada nas suas vantagens e desvantagens, assim como na natureza das linhagens fúngicas. Neste trabalho foram avaliadas diferentes metodologias de preservação de uma linhagem do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, um excelente produtor de enzimas. Os métodos de preservação avaliados foram o armazenamento em solo estéril, água destilada, congelamento em criotubos, óleo mineral e as repicagens periódicas. Os esporos obtidos a partir das diferentes metodologias de preservação foram avaliados durante o período de um ano. A comparação das metodologias foi realizada com base na produção das enzimas xilanase e endoglucanase em fermentação em estado sólido (FES). Os resultados deste estudo indicaram que todas as metodologias de preservação avaliadas foram similares no sentido de garantir a manutenção das características do fungo de produção das enzimas celulases e xilanases.

**Palavras-chave:** fungos, celulase, xilanase, enzimas, preservação.

---

<sup>1</sup>Engenharia Química, Dra, Pesquisadora, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP.  
cristiane.farinhas@embrapa.br

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, UFSCar, Estagiária, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. daibio19@hotmail.com

# **Filamentous fungi of interest in agroenergy: assessment of different preservation methods for *Aspergillus niger***

---

Cristiane Sanchez Farinas  
Daiane Carla Barboza

## **Abstract**

The filamentous fungi make up the group with the largest number of microbial species and have a huge variety in terms of morphology as well as physiological and biochemical attributes. This has allowed exploration of some fungal strains which have the capacity to produce enzymes of various industrial applications. However, the proper preservation of these microorganisms in order to maintain their unique characteristics for long periods of time is very important for their application in research and development of biotechnology processes, ensuring reproducibility of results. The proper choice of the preservation method must be based upon their advantages and disadvantages as well as the nature of the fungal strains. In this study we evaluated different methods of preserving a strain of filamentous fungus *Aspergillus niger*, an excellent producer of enzymes. The preservation methods evaluated were storage in sterile soil, distilled water, cryogenic, mineral oil and the periodic transfers. The spores obtained from the different methods of preservation were evaluated during one year period. Comparison of methodologies was based on the production of xylanase and endoglucanase enzymes under solid state fermentation (SSF). The results of this study indicate that all preservation methods evaluated were similar in terms of ensuring the maintenance of the characteristics of the fungus for producing the enzyme cellulases and xylanases.

Index terms: fungi, cellulases, xylanase, enzymes, preservation.

## 1. Introdução

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Essa diversidade tem propiciado ao homem explorar racionalmente algumas linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, sejam capazes de produzir substâncias ou capazes de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos comerciais (COLEN, 2006). Há séculos os fungos filamentosos vêm sendo utilizados pela humanidade na produção de alimentos, bebidas, fármacos e outros bioprodutos. Entretanto, a exploração do imenso potencial desses microrganismos como produtores de uma vasta gama de enzimas extracelulares de aplicação industrial (catalases, amilases, celulases, xilanases, peroxidases, invertases, pectinases, queratinases, lipases e proteases, entre outras) somente se tornou possível com o avanço do conhecimento de sua fisiologia, bioquímica e genética (TORRES et al., 2008). Devido às elevadas taxas de crescimento e a capacidade de realizar modificações pós-tradicionais, os fungos filamentosos estão entre os organismos mais utilizados em processos industriais. Dentre os fungos mais empregados na produção de enzimas destacam-se os do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* e *Penicillium* (TORRES et al., 2008).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são fungos saprófitos, mesofílicos e no que tange à sua morfologia, produzem micélios septados e ramificados, cujas porções vegetativas encontram-se submersas ao nutriente, quando cultivados estaticamente (PELCZAR et al., 1980). Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* destacam-se como importantes microrganismos produtores de enzimas celulolíticas, ácidos orgânicos e outros produtos com alto valor agregado especialmente através de processos de fermentação em estado sólido (CASTRO, 2006). Esse fungo atende diversas exigências para a produção comercial de enzimas, dentre as quais, destacam-se a capacidade de crescer em substrato de baixo custo e a produção, em velocidade relativamente elevada, de enzimas estáveis a variações de temperatura e pH.

Nos laboratórios e indústrias em que se utilizam processos biotecnológicos é freqüente a necessidade da manutenção de um banco de microrganismos, de forma a mantê-los em condições adequadas, pois eles são muito susceptíveis a variações. A manutenção de um banco de cultura representa uma questão de extrema importância para assegurar a reproduzibilidade dos bioprocessos. Durante a conservação dos fungos, devem ser preservadas suas características morfológicas e biológicas (estabilidade genética), além disso, a conservação deverá manter também, especificamente no caso do trabalho em questão, a capacidade de produção de substâncias fisiologicamente ativas. A escolha adequada do método mais apropriado para a preservação dos fungos filamentosos irá depender do tipo e grau da esporulação. Não existe nenhum método universal para armazenar as culturas fúngicas. A seleção do método deve ser baseada na natureza do fungo e nas suas vantagens e desvantagens de cada método (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Considera-se uma preservação eficaz quando esta mantém o microrganismo num estado viável, livre de contaminação e sem mudanças em características fenotípicas e genotípicas.

Neste trabalho foram avaliadas diferentes metodologias de preservação de uma linhagem do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Os métodos de preservação avaliados foram o armazenamento em solo estéril, água destilada, congelamento em criotubos, óleo mineral e as repicagens periódicas. A comparação das metodologias foi feita com base na atividade das enzimas xilanase e endoglucanase produzidas em fermentação em estado sólido (FES). As enzimas selecionadas possuem uma importante aplicação nos processos de conversão da biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis, entre outras aplicações industriais.

## 2. Metodologia

### *Linhagem utilizada*

O microrganismo utilizado foi uma linhagem do fungo filamentoso *Aspergillus niger* F12 pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ. Os conídios estavam armazenados em solo a -18°C e foram reativados em gelose inclinada com meio de triagem para microrganismo e incubados por sete dias a 32°C (COURI; FARIAS, 1995). Os conídios da etapa de ativação foram utilizados para os repiques dos métodos de conservação estudados e posteriormente para a inoculação em meio de sabugo de milho, usado para produção do inóculo na fermentação em estado sólido (FES).

### *Meios de cultura*

#### *Meio de triagem para microrganismo*

A reativação dos conídios em gelose inclinada foi realizada por meio de repiques periódicos em meio de triagem para microrganismo (Tabela 1), utilizando como fonte de carbono 10 g/L de pectina cítrica de baixa metilação em pH 4,0-4,5. Posteriormente, o meio de triagem foi distribuído em tubos de ensaio com rolha de algodão e autoclavado a 1 atm durante 15 minutos (COURI, 1993).

**Tabela 1.** Reagentes utilizados no preparo do meio de triagem para microrganismo.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Ágar-ágar p.a	30,0
Sulfato de magnésio p.a ( $MgSO_4$ )	0,50
Nitrato de sódio p.a ( $NaNO_3$ )	3,0
Cloreto de potássio p.a (KCL)	0,50
Sulfato ferroso p.a ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,01
Fosfato dibásico de potássio p.a ( $K_2HPO_4$ )	1,0

### *Meio de sabugo de milho*

O sabugo de milho é um material apropriado para a produção de conídios de *A. niger* utilizados na inoculação da FES, uma vez que o fungo cresce em uma superfície maior e consequentemente aumenta a esporulação. Foram misturados em um bêquer 2,8 g de peptona de carne; 1 gota de HCl 2N; 190 µL da solução A (20 g de fosfato de potássio em 100 mL de água destilada); 25 µL da solução B (3,96 g de sulfato de zinco; 4,60 g de sulfato de ferro; 0,01 g de sulfato de manganês; 0,5 mL de ácido sulfúrico (95-97%) em 100 mL de água destilada). Posteriormente, esta solução foi transferida para um balão volumétrico e avolumada a 50 mL. Pronto o meio de sabugo de milho, 6 mL foram pipetados e colocados no erlenmeyer de 125 mL juntamente com 4,6 g de sabugo de milho moído. Com o auxílio do bastão de vidro, realizou-se a homogeneização do meio. Os erlenmeyers foram tampados com rolhas de algodão e levados à autoclave a 1 atm durante 60 minutos (COURI; FARIAS, 1995).

### *Métodos de preservação*

#### *Método do solo*

O tipo de solo utilizado nesta metodologia foi o solo latossolo vermelho amarelo oriundo do Pólo Regional da Alta Mogiana, SP. Este solo é do tipo arenoso, apresentando em sua granulometria argila, silte e areia. Primeiramente o solo foi peneirado (peneira de 32 MESH) aproveitando somente a fração mais fina e seco em estufa a 100°C por 24 h. Posteriormente, o solo foi distribuído em tubos de ensaio com rosca (7 g de solo/tubo) e autoclavado por 1 hora. Após esfriar, os tubos contendo o solo foram autoclavados novamente por mais cinco vezes. Os esporos de *A. niger* foram transferidos com a alça de platina da gelose inclinada para o solo estéril. Os tubos de ensaio contendo o solo inoculado foram vedados, identificados e armazenados no freezer - 18°C até a sua posterior avaliação.

#### *Método da água destilada*

A partir da gelose contendo o microrganismo em estudo foram adicionados 10 mL de tween 80 a 0,3% para obtenção da suspensão de esporos. Volumes de 100 µL dessa suspensão foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de triagem para microrganismo. Após o repique, as placas de Petri foram vedadas e levadas à estufa a 32°C por sete dias. Amostras das cepas de 0,5 cm de diâmetro foram colocadas em frascos estéreis contendo 4 mL de água destilada estéril. Os frascos foram identificados e fechados hermeticamente para evitar contaminação e evaporação da água. Em seguida, foram armazenados em temperatura ambiente até a sua posterior avaliação.

#### *Método do congelamento*

A suspensão de esporos de *A. niger* utilizada no método de congelamento foi obtida a partir da adição de 100 mL de tween 80 a 0,3% em erlenmeyer contendo o sabugo de milho inoculado.

Com auxilio do bastão de vidro, homogeneizou esta solução para total desprendimento dos esporos e filtrou-se a suspensão com o auxilio de uma gase estéril. Pronta a suspensão, 3 mL desta foram pipetadas em tubos criogênicos de 3,5 mL e adicionado 0,4 mL de glicerol/tubo. Em seguida, os tubos criogênicos foram fechados, homogeneizados, etiquetados a armazenados em freezer - 80°C até a sua posterior avaliação.

#### *Método do óleo mineral*

Os esporos do *A. niger* foram transferidos com a alça de platina da gelose inclinada para uma nova gelose inclinada. Após o repique, os tubos de ensaio foram tampados com rolha de algodão e levados à estufa a 32°C por sete dias. Após a incubação, o *A. niger* foi recoberto com uma camada de óleo mineral estéril ficando aproximadamente 2 cm acima do topo do meio de cultura. Em seguida, os tubos de ensaio com o microrganismo foram armazenados em temperatura ambiente até a sua posterior avaliação.

#### *Método de repicagens periódicas*

Os esporos do *A. niger* foram transferidos três vezes com a alça de platina da gelose inclinada contendo os conídios para uma nova gelose inclinada. Após o repique, os tubos de ensaio foram tampados com rolha de algodão e levados à estufa a 32°C por sete dias. Decorridos os setes dias, as geloses foram armazenadas na geladeira até a sua posterior avaliação.

#### *Condições da fermentação em estado sólido (FES)*

A reativação dos esporos preservados nos diferentes métodos avaliados foi feita com o auxílio da alça de platina onde foram inoculados para uma nova gelose inclinada. Após o repique, os tubos de ensaio foram tampados com rolha de algodão e levados à estufa a 32°C por sete dias. A viabilidade das cepas foi avaliada durante o período de um ano. A FES foi conduzida em frascos de 500 mL com farelo de trigo como substrato e meio de complementação composto por sulfato de amônio 0,91% em HCl 0,1 mol/L. Os frascos foram esterilizados e então inoculados. Após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 32°C, procedeu-se à etapa de extração do complexo enzimático. As amostras foram extraídas com tampão acetato 0,2 mol/L, pH 4,5, incubando os frascos por 1 h em banho termostático a 32°C. Os extratos enzimáticos recuperados foram armazenados a -18 °C para posterior análise da atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

#### *Atividades enzimáticas*

As atividades enzimáticas de endoglucanase e xilanase dos extratos obtidos a partir das diferentes metodologias de conservação de fungos filamentosos foram quantificadas e os resultados das análises foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato inicial seco.

A atividade de endoglucanase tem como substrato a CMC (carboximetilcelulose). Uma unidade de atividade de endoglucanase corresponde a 1 mmol de grupos redutores liberados por minuto de reação em pH 4,2 a 50°C. A atividade da xilanase foi medida em termos de produção de açúcares redutores a partir de xilana comercial. Uma unidade de atividade xilanase corresponde a 1mmol de xilose liberado por minuto em pH 4,2 a 50 °C. A quantificação de grupos redutores foi realizada pelo método DNS (MILLER, 1959).

### 3. Resultados

A preservação adequada dos microrganismos visando à manutenção das suas características originais por longos períodos de tempo é de suma importância para sua aplicação em pesquisas e desenvolvimento dos processos biotecnológicos, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. Nesse contexto, são apresentados aqui os resultados do estudo de avaliação de diferentes metodologias de conservação do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Os métodos de preservação avaliados foram o armazenamento em solo estéril, água destilada, congelamento em criotubos, óleo mineral e as repicagens periódicas.

#### *Métodos de preservação*

A manutenção de fungos em solo é feita conservando os conídios em solo estéril, como suporte (Figura 1). Este método mantém o fungo estabilizado, com todas as suas características por um longo período de tempo. O solo deve ser mantido em temperatura ambiente ou em baixas temperaturas para que haja preservação do fungo (SINGLETON et al., 1992). Isolados de fungos podem apresentar variações na cor da hifa, tamanho e número de esporos e, também, na sua virulência se mantidos em solo estéril com alta umidade (SINGLETON et al., 1992). São atribuídas como vantagens desse método o baixo custo e estabilidade genética (MARIANO; SILVEIRA, 2005), e como desvantagem, o tempo despendido na esterilização do solo.



Foto: Daiane Carla Barboza.

**Figura 1.** Solo estéril com *Aspergillus niger*.

O método de conservação em água destilada, também chamado de Castellani, é muito utilizado para preservação de fungos fitopatogênicos. Nesse método, colônias puras do fungo são colocadas em um pequeno frasco contendo água destilada esterilizada ou solução salina, sendo posteriormente selado e armazenado em temperatura ambiente ou de refrigerador (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) (Figura 2). Castellani consiste de um método simples e eficaz quanto à viabilidade fúngica. Pequenas coleções micológicas podem ser mantidas por este método até mesmo quando as condições prevalecentes do material são ruins (URDANETA; LACAZ, 1965). Como vantagens desse método são atribuídas o baixo custo, facilidade de execução e redução do espaço necessário para estocagem do material, além de evitar o desenvolvimento de acarianos (CARNEIRO et al., 1996).



**Figura 2.** Água destilada com *Aspergillus niger*.

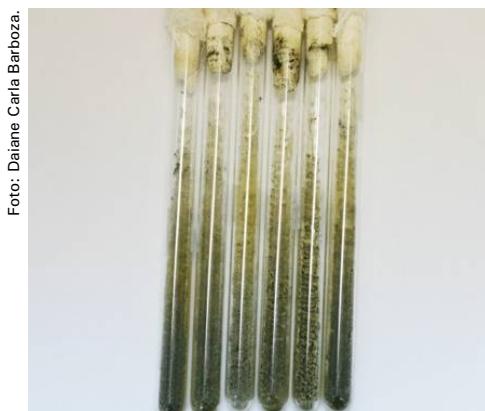
O método do congelamento consiste em armazenar uma suspensão de esporos em temperaturas de -20 a -70°C (Figura 3).



**Figura 3.** Suspensão de esporos de *Aspergillus niger* armazenada em tubo criogênico com glicerol 15%.

A velocidade inicial de congelamento deve ser lenta (até -20 a -40°C), pois do contrário pode haver formação interna de cristais de gelo e ruptura da célula, ou perda de eletrólitos com danos letais. O congelamento final (até -70°C) deverá ser rápido, bem como o descongelamento (MARIANO; SILVEIRA, 2005). A maioria dos microrganismos pode sobreviver por longo tempo na forma congelada, pois assim reduzem marcadamente o seu metabolismo (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Para proteger os organismos de possíveis danos durante o processo de congelamento, estocagem e descongelamento, agentes crioprotetores são normalmente adicionados à suspensão da cultura. Existem dois tipos de agentes crioprotetores: aqueles que adentram a célula e protegem o ambiente intracelular e outros que protegem a célula externamente. Glicerol e dimetil-sulfóxido (DMSO) são mais comumente usados no primeiro caso; sacarose, lactose, glicose, manitol, sorbitol, dextran, pirrolidona e poliglicol são usados no segundo caso. Desta forma, as células podem ser preservadas por um tempo indefinido e recuperar suas funções normais quando forem devidamente descongeladas (ABREU; TUTUNJI, 2003).

O método de repicagens periódicas consiste em transferir, periodicamente, colônias de fungos, que cresceram em meio de cultura, para novos meios (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) (Figura 4). As grandes vantagens desse método são a simplicidade e rapidez de se obter as culturas fúngicas, baixo custo e não requer equipamentos sofisticados, porém, as desvantagens baseiam-se na implicação em consumo de tempo e, muitos fungos podem adaptar-se ao crescimento saprofítico induzido pelo método. Isso pode levar os organismos a perderem a capacidade de esporular e a patogenicidade, ou seja, terem suas características alteradas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Culturas mantidas desta forma tendem a desidratar-se; além disso, este método exige mão de obra e espaço relativamente grande para o armazenamento.



**Figura 4.** Repique de *Aspergillus niger* em tubo inclinado.

O método de preservação em óleo mineral consiste primeiramente em multiplicar o fungo em meio de cultura dentro de um frasco e, em seguida, cobrir essa colônia com óleo mineral esterilizado, impedindo a dessecção e, ficando o fungo em estado inativo (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Desse modo, o intervalo de repicagem pode-se estender até vários anos. Esta preservação é maximizada se os tubos forem conservados em geladeira (MARIANO; SILVEIRA, 2005) (Figura 5). As vantagens deste método é o baixo custo dos equipamentos além de apresentar baixo risco de contaminação ao acaso. As desvantagens são a dificuldade de manuseio e transporte dos tubos, bem como a penetração lenta de oxigênio através do óleo, o que poderá causar crescimento posterior do fungo e variabilidade genética (MARIANO; SILVEIRA, 2005), mas em relação ao método repicagens periódicas, reduz a velocidade de dessecamento do meio de cultura e proporciona uma longevidade maior.

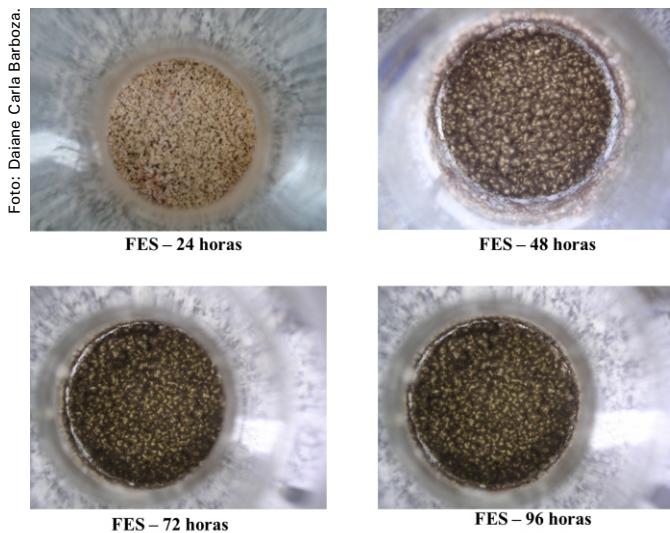


**Figura 5.** Óleo mineral com *Aspergillus niger*.

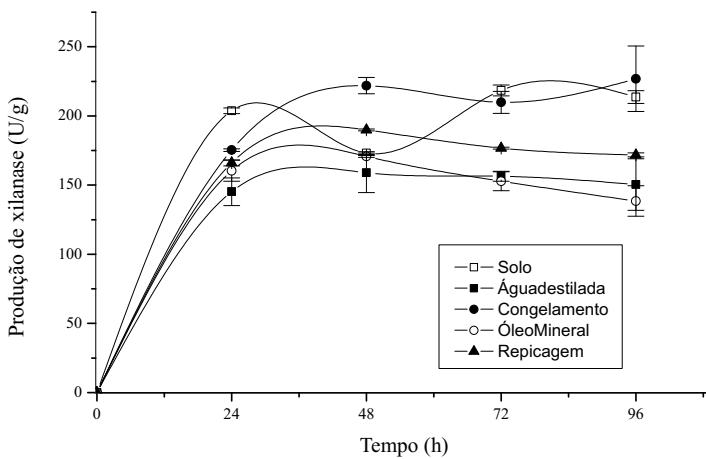
#### *Produção enzimática em fermentação em estado sólido (FES)*

A comparação dos diferentes métodos de conservação estudados foi realizada através da avaliação da produção enzimática durante o cultivo em FES em termos das atividades de xilanase e endoglucanase. Antes de realizar a FES foi necessário ativar os esporos em gelose inclinada, desta para o sabugo de milho, a partir do qual obteve-se a suspensão de esporos para ser inoculada no farelo de trigo (Figura 6).

Pode-se inferir que a produção de xilanase foi muito similar entre os diferentes métodos de conservação de fungos filamentosos estudados, sendo os métodos de solo e congelamento os que apresentaram maiores valores de atividade (Figura 7).

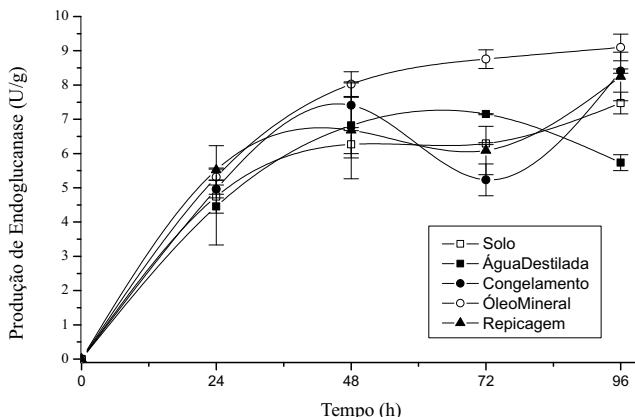


**Figura 6.** Fermentação em estado sólido (FES) em farelo de trigo do fungo *A. niger*.



**Figura 7.** Avaliação da produção de xilanase nos diferentes métodos de conservação de fungos filamentosos.

Em relação à produção de endoglucanase, uma maior atividade foi observada para o método de óleo mineral e congelamento (Figura 8). No entanto, a diferença observada pode ser considerada não significativa.



**Figura 8.** Avaliação da produção de endoglucanase nos diferentes métodos de conservação de fungos filamentosos.

De uma forma geral, todos os métodos de conservação estudados apresentaram valores de atividade enzimática similares, concluindo que para a seleção do melhor método deve-se levar em conta a praticidade e custo envolvido.

## Conclusão

A preservação adequada dos microrganismos visando à manutenção das suas características originais por longos períodos de tempo é de suma importância para sua aplicação em pesquisas e desenvolvimento dos processos biotecnológicos, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. Pode-se inferir através deste trabalho que todas as metodologias de preservação avaliadas foram similares no sentido de garantir a manutenção das características do fungo *A. niger* de produção das enzimas celulases e xilanases.

## Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, DF, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2003.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, R. G. Avaliação de quatro métodos de conservação relativos à sobrevivência de *Paecilomyces lilacinus* e *Artrobotrys oligospora*. **Revista Nematologia Brasileira**, [S. I.], v. 20, n. 02, 1996.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*).** 2006. 240 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Tecnologia e Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

COLEN, C. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase.** 2006. 206 p. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos) - Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, 2006.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8.** 1993. Tese (Doutorado) - Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 1993.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods.** 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia.** 2. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 35-45.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Biochememistry*, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia.** São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v. 1. p. 138 -139.

SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi.** St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. 265 p.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; MARCO, J. L.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FELIPE, M. S. S. O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas. In: BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia:** produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciênciac, 2008. cap. 3. p. 55-69.

URDANETA, S. M.; LACAZ, C. S. **Preservation of Fungi in Distilled Water Preliminaru Results.** *Rev. Inst. Med. Tro.*, São Paulo, v. 7, p. 24-26, 1965.







---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

*Embrapa Instrumentação*

*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP*

*Telefone: (16) 2107 2800 - Fax: (16) 2107 2902*

*[www.cnpdia.embrapa.br](http://www.cnpdia.embrapa.br) - [sac@cnpdia.embrapa.br](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)*

**Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

