

Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L.

Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L.

Títulos abreviados:

Enzymes from fungi of *Morinda citrifolia*

Enzimas de fungos da *Morinda citrifolia*

Anne Caroline Dantas Tavares^{1*}, Jennifer Salgado da Fonseca¹; Tamiris Rio Branco da Fonseca², Jéssica Ferreira Barroncas³, Raiane Áila Teixeira Souza², Taciana de Amorim Silva⁴, Maria Francisca Simas Teixeira⁴

ABSTRACT

The Amazon region is home to a vast microbial diversity that is attracting great interest in the industrial sector, like the anamorphic fungi that has economic value because of the production of bioactive compounds for industrial application. The aim of this study was to isolate and identify fungi from healthy leaf structure of *Morinda citrifolia* and verify the production of enzymes, as well as characterizing proteases from *Aspergillus* and *Penicillium* for industrial application. For the determination of enzyme activities, the fungi were grown in liquid medium (extract MGYF) at 30°C and 150 rpm. After five days, the crude extract was recovered by membrane filtration (22µm) and activity was determined by the cup plate, at 37°C for 18 hours on solid medium with substrate for each enzyme. For visualization of the areas of substrate degradation on the surface of the medium were added solution of Congo Red and 1M NaCl solution to detect cellulase and iodine vapors for detecting amylase. All statements expressed enzyme (amylase, cellulase and protease), but increased expression of the halo was *Aspergillus* N42 and N34 (cellulases). The protease activity of *Aspergillus* ranged from 1.36 U/mL (N44) at 3.38 U/ml (N35), whilst for *Penicillium* N23 values were higher (10.82 U/mL). As to pH, the best results were obtained in a range of 6-9. All isolates tested can be sources of enzymes for future applications in industrial processes.

Keywords: deuteromycetes, bioprocesses, hydrolytics enzymes

¹ Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Biotecnologia. Manaus-AM;

² Universidade Federal do Amazonas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Manaus-AM

³ Universidade Federal do Amazonas – Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica. Manaus-AM;

⁴ Universidade Federal do Amazonas – Departamento de Parasitologia. Manaus-AM.

* Autor para correspondência: dantas.anne@hotmail.com

RESUMO

A região Amazônica abriga uma vasta diversidade microbiana que vem despertando grande interesse no setor industrial, a exemplo dos fungos anamórficos, que tem valor econômico em virtude da produção de compostos bioativos para aplicação industrial. O objetivo desse estudo foi isolar e identificar fungos da estrutura foliar sadia de *Morinda citrifolia* e verificar a produção de enzimas, assim como caracterizar proteases de *Aspergillus* e *Penicillium* para aplicação industrial. Para a determinação das atividades enzimáticas, os fungos foram cultivados em meio líquido (extrato MGYF), a 30°C e 150 rpm. Após cinco dias, o extrato bruto foi recuperado por filtração em membrana (22µm) e a atividade foi determinada pelo método *cup plate*, a 37°C por 18 horas em meio sólido adicionado de substrato indutor para cada enzima. Para visualização das áreas de degradação do substrato, na superfície do meio foram adicionadas solução de Vermelho Congo e, solução de NaCl 1M para detectar celulase e vapores de iodo para detectar amilase. Todos os extratos expressaram atividade enzimática (amilases, celulases e proteases), porém o halo de maior diâmetro foi de *Aspergillus* N42 e N34 (celulases). A atividade das proteases das linhagens de *Aspergillus* variou de 1,36 U/mL (N44) a 3,38 U/mL (N35), enquanto para *Penicillium* N23 os valores foram superiores (10,82 U/mL). Quanto ao pH, os melhores resultados foram obtidos numa faixa de 6-9. Todos os isolados testados podem ser fontes de enzimas para futuras aplicações em processos industriais.

Palavras-chave: deuteromicetos, bioprocessos, enzimas hidrolíticas

INTRODUÇÃO

Dentre as diversas fontes de enzimas, os micro-organismos compõem um dos maiores recursos genéticos disponíveis. Muitas espécies, inclusive, tem sido alvo para investigação da potencialidade industrial, principalmente como fontes de amilases, celulasas e proteases, que tem especial uso no processamento de alimentos e detergentes (OYELEKE *et al.*, 2010; OYELEKE *et al.*, 2012).

A introdução de enzimas como catalisadores em processos industriais, a exemplo das microbianas, mostra-se vantajoso, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, características desejáveis tanto pela indústria quanto para a integridade do meio ambiente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; COSTA *et al.*, 2012).

Dos biocatalisadores microbianos, aqueles produzidos por espécies de fungos estão em expansão pelo uso em diversos processos. Todavia, são raros os estudos de isolamento e caracterização de fungos associados a estruturas vegetais sadias como fonte de enzimas hidrolíticas para aplicação industrial. A maioria dos estudos relata o isolamento de fungos fitopatogênicos ou espécies micotoxigênicas de relevância econômica e sanitária (animal e humana) (GUIMARÃES *et al.*, 2010; MEDONÇA *et al.*, 2009)..

A *Morinda citrifolia*, uma espécie arbórea comumente conhecida como noni, pertence à família Rubiaceae, conhecida devido à importância econômica e terapêutica de suas espécies, utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitofármacos e fitoterápicos. O noni tem sua origem no sudeste da Ásia, Oceania e Austrália tropical, estendendo-se da Polinésia à Índia, atualmente apresenta uma distribuição pantropical devido a necessidade reduzida de cuidados, desenvolvendo-se adequadamente sob várias condições ambientais.

Dentre os inúmeros estudos disponíveis na literatura, Bonaldo *et al.* (2011) descreve ocorrência pioneira de *Colletotrichum* no Estado do Mato Grosso em noni, táxon que compreende várias espécies sapróbias e fitopatogênicas responsáveis por muitas doenças importantes numa gama de hospedeiros.

Dentre os fungos filamentosos, diversos representantes do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são classificados como GRAS (Generally Regarded As Safe) devido à sua baixa toxicidade (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Além desta característica desejável para aplicação na indústria alimentícia, esses fungos são produtores de uma gama de substâncias bioativas e podem ser utilizados

em bioprocessos para produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas e proteases), ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido glucônico) (VARGA *et al.*, 2007).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar fungos da estrutura foliar sadia de *Morinda citrifolia* e verificar a produção de enzimas, assim como caracterizar as proteases de *Aspergillus* e *Penicillium* para aplicação industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolamento de fungos endofíticos e epifíticos

O isolamento de fungos endofíticos e epifíticos foi realizado a partir de fragmentos de aproximadamente 5 mm² retirados das folhas sadias de noni (*Morinda citrifolia*) provenientes de cinco estruturas vegetais distintas: base, nervura central, ápice, nervura lateral e entre as veias laterais. Para o isolamento de endofíticos, os fragmentos vegetais foram submetidos aos seguintes tratamentos: imersão em etanol 70% por trinta segundos; hipoclorito de sódio 1% por dois minutos; etanol 70% por quinze segundos e lavagem em água destilada esterilizada. Para o isolamento dos epifíticos, nos fragmentos vegetais foi realizada descontaminação por imersão em hipoclorito de sódio durante 15 segundos e lavagem em água destilada esterilizada. Para o crescimento dos micro-organismos, os fragmentos vegetais foram semeados na superfície de ágar rosa bengala + cloranfenicol [100mg/L (p/v)]. As placas de Petri (90mm x 20mm) foram mantidas a 25°C, observando-se o crescimento dos fungos a cada 24 horas. Após sete dias, foi realizada a purificação dos isolados em ágar Sabouraud (SAB) e ágar batata dextrose (BDA) nas mesmas condições de isolamento dos micro-organismos (MOSTERTT, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

2. Identificação

Após a obtenção de cultura pura, os fungos isolados foram identificados pelas técnicas convencionais: análise das características macro e microscópicas, conforme as recomendações de Barnett e Hunter (1990), Samson e Pitt (1985), Raper e Thom (1968), Raper e Fennel (1977) e Pitt (1985).

3. Seleção de fungos produtores de amilases, celulases e/ou proteases em meio sólido

Para a avaliação da atividade de amilases, celulases e proteases, foram selecionados seis representantes do gênero *Aspergillus* (F-22, F-34, F-35, F-42, F-44) e *Penicillium* F-23 para cultivo em Agar Czapeck, a 25°C por sete dias. Dessas culturas foram retirados 10 discos miceliais medindo 8 mm de diâmetro para inoculação em 50 mL de extrato MGYP (extrato de malte 0,3%, glicose 1%, extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5%) em frascos de Erlenmayer de 125 mL. A fermentação submersa foi realizada a 25°C, 150 rpm. Após 5 dias, o extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo e em membrana celulósica (0,22 µm). Agar amido (amilase), agar celulose (celulase) e agar leite (protease) foram os meios utilizados para determinação da atividade das enzimas. Nesses meios, em placa de Petri, para cada *cup plate* de 8 mm de diâmetro foram adicionados 100 µL de extrato bruto. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas a 25°C durante 18 horas e, para evidenciar a atividade de amilase, foi utilizado vapor de iodo sublimado como revelador. Para evidenciar o halo de celulase, foi utilizada solução de vermelho Congo a 0,1% e NaCl 1M por quinze minutos cada. A atividade das enzimas foi determinada medindo-se o diâmetro do halo formado em torno de cada *cup plate*, em milímetros.

4. Determinação da atividade de proteases

A atividade das proteases foi determinada conforme Leighton et al. (1973). O extrato enzimático (150 mL) foi adicionado a 250 mL da solução de azocaseína a 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,2 M, em pH 7,2. Após 60 minutos de incubação a 25°C, em câmara escura, a reação foi interrompida com ácido tricloroacético 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000 x g) por 15 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, 1,2 mL foram transferidos para 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora (TREMACOLDI e CARMONA, 2005).

5. Caracterização parcial das enzimas proteolíticas

A determinação do efeito da temperatura na atividade proteolítica foi realizada a 25°C, 37°C, 40°C, 50°C e 60°C por 1h. Ao término do período

de incubação, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito anteriormente. O efeito do pH na atividade das proteases foi determinado utilizando-se o sistema de reação formulado com azocaseína 1% nos tampões citrato 0,1 M (pH 5,0), fosfato 0,1 M (pH 6-8) e carbonato de sódio 0,1 M (pH 9 e 10). Os sistemas foram incubados durante uma hora na ausência de luz e, em seguida, foi determinada a atividade proteolítica. O branco e os sistemas de reação foram preparados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Fungos isolados e identificados

Dos fragmentos vegetais, foram identificados 23 fungos em nível de gênero, os quais apresentaram distribuição homogênea nos fragmentos das folhas. Desses isolados 26,09% são do grupo *Micellia sterilia*. Entre os epifíticos foram identificados representantes dos gêneros *Aspergillus* (21,74%), *Cylindrocladium* (4,35%), *Dothichiza* (4,35%), *Penicillium* (4,35%) e *Pestalotiopsis* (4,35%). Entre os endofíticos, *Exochalara* (4,35%), *Colletotrichum* (21,75%) e *Phyllosticta* (4,35%).

Estes dados diferem dos apresentados por Cannon e Simmons (2002), visto que seus resultados demonstraram *Colletotrichum* e *Pestalotiopsis* como endofíticos, enquanto os dados obtidos revelaram a presença de *Pestalotiopsis* como epifítico. Nesse caso, esses autores citam que as comunidades endofíticas nos vegetais não são iguais e que o fator geográfico pode ser mais importante na determinação da presença desses fungos do que aqueles ligados à planta.

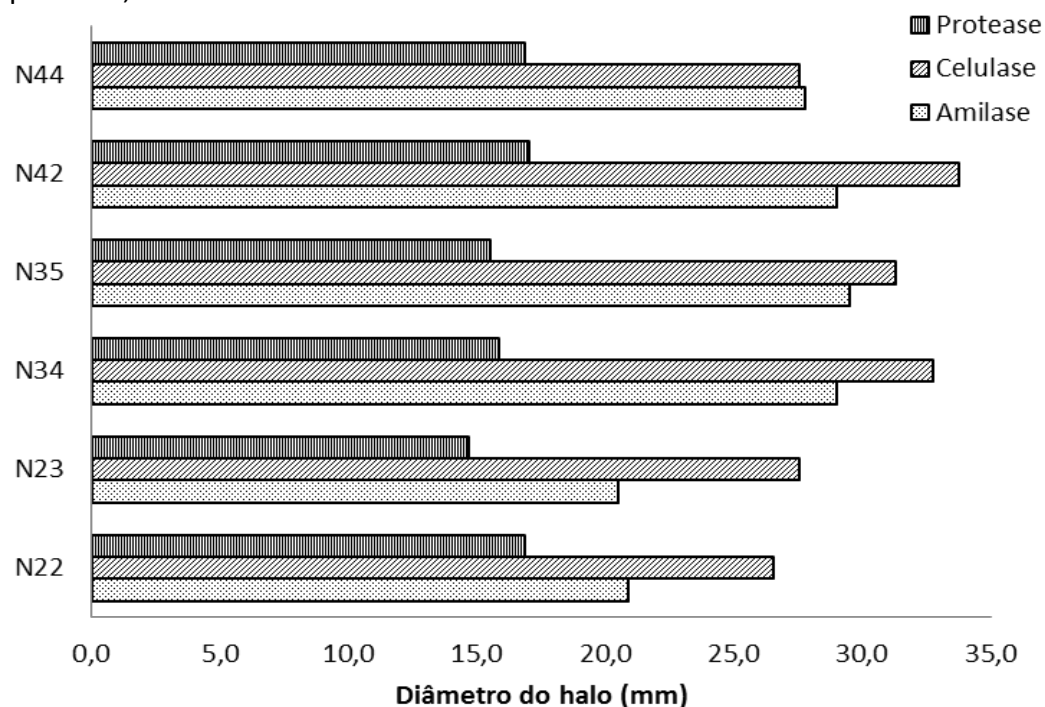
Com relação aos demais fungos, Sunayana e Prakash (2012) isolaram espécies endofíticas de *Aspergillus* da espécie vegetal medicinal *Boswellia serrata*. Já *Penicillium* e *Cylindrocladium* foram identificados de amostras aparentemente sadias de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.) (SILVA et al., 2006), assim como *Phyllosticta* de citrus (GLIENKE et al., 2011). Na investigação realizada por Bonaldo et al. (2011), das folhas e dos frutos de noni, com sintomas de antracnose, foi isolado somente *Colletotrichum* sp.

2. Atividade enzimática em meio sólido

Entre os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* avaliados como fontes de amilases, celulases e proteases, a atividade das enzimas foi observada em diferentes níveis de expressão. Entre os isolados, *Aspergillus* N34 e *Aspergillus*

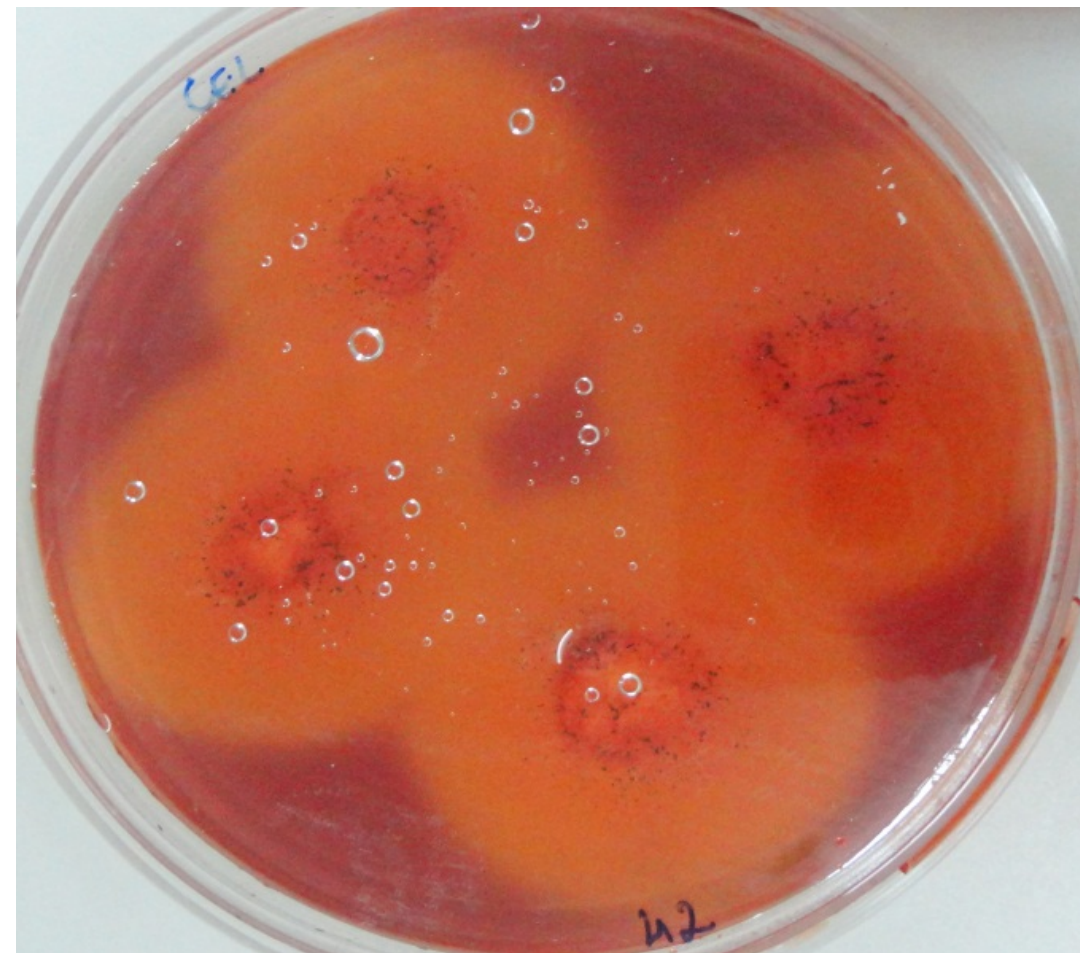
N42 foram os que apresentaram os maiores halos celulolíticos, $33 \text{ mm} \pm 2,0$ e $34 \text{ mm} \pm 0,9$, respectivamente (Figuras 1 e 2). As amilases foram expressivas nos cultivos de *Aspergillus* N34 ($29 \text{ mm} \pm 2,8$), N35 ($29,5 \text{ mm} \pm 5,7$) e N42 ($29 \text{ mm} \pm 8,1$). Contudo, a atividade proteolítica apresentou menores valores quando comparada às demais enzimas, tendo diâmetro do halo medindo, em média, $16 \text{ mm} \pm 0,9$.

Figura 1. Atividade enzimática dos isolados de *Morinda citrifolia* quanto à degradação de protease, celulase e amilase.



Mussoi et al. (2011) cita que celulases de *Penicillium* e *Aspergillus* podem ser utilizadas em processos de hidrólise enzimática de resíduos com alta disponibilidade de carboidratos como resíduos agrícolas, industriais e/ou madeireiros (gramíneas, sabugo de milho, palhas e casca de cereais, polpa e casca de frutas, caule e folhas de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, serragens e outros) e, ainda, podem atuar como fonte de matéria prima para produção de biocombustíveis. Aguiar (2010) e Sales et al. (2005), por sua vez, utilizaram, respectivamente, celulase de *Aspergillus niger* na hidrólise de resíduos agroindustriais e na hidrólise de endocarpo da semente de café, acelerando sua germinação.

Figura 2. Atividade de celulase em meio sólido (método *cup plate*) do *Aspergillus* N42, halos com diâmetro de $34 \text{ mm} \pm 0,9$.



3. Atividade de Proteases

Em média, a atividade das proteases dos isolados de *Aspergillus* variou de $1,36 \text{ U/mL}$ (N44) a $3,38 \text{ U/mL}$ (N35), enquanto para *Penicillium* N23 os valores foram significativamente superiores ($10,82 \text{ U/mL}$). O efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica desses fungos está apresentado na Tabela 1. A máxima atividade das enzimas foi observada a 25°C , 50°C e 60°C para os isolados do gênero *Aspergillus*, sugerindo a presença de grupos distintos de proteases, a exemplo de *Aspergillus* N44. Para *Penicillium* N23, a temperatura ótima das proteases foi obtida a 40°C , característica diferenciada dos resultados publicados para *Penicillium* spp., cuja temperatura ótima de atividade proteolítica costuma ser descrita na faixa de 27°C e 30°C (KRISHNA et al., 2009).

Tabela 1. Temperatura e pH ótimo das proteases de *Aspergillus* e *Penicillium* isolados do noni.

Isolados	Temperatura ótima	pH ótimo
<i>Aspergillus</i> N22	50°C	8,0
<i>Aspergillus</i> N34	25°C	6,0
<i>Aspergillus</i> N35	60°C	8,0
<i>Aspergillus</i> N42	60°C	9,0
<i>Aspergillus</i> N44	37°C	7,0
	60°C	9,0
<i>Penicillium</i> N23	40°C	9,0

Com relação ao pH, a atividade das proteases de maiores valores foi determinada na faixa de 6,0 a 9,0. *Aspergillus* N34 foi o único isolado cujo pH ótimo foi levemente ácido (pH=6,0), resultado semelhante ao citado por Thichota et al. (2010). No extrato de *Penicillium* N23, *Aspergillus* N22, *Aspergillus* N35, *Aspergillus* N42 e *Aspergillus* N44 foram identificadas proteases alcalinas, assim como proteases neutras em *Aspergillus* N44. Com essas propriedades, tais proteases tem potencial para serem utilizadas na indústria de detergentes e alimentos.

CONCLUSÃO

O noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivado no solo Amazônico abriga uma rica diversidade de fungos epifíticos e endofíticos. Dentre os isolados, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são produtores das enzimas celulase, amilase e proteases, as quais apresentam elevada importância industrial. As proteases de *Aspergillus* apresentam características de pH, temperatura e facilidade de manipulação, assim recomendadas para uso em indústria de detergentes e alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. Toledo, 2010, 118p. Tese de doutorado em Engenharia química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

BARNETT H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company. 241p. 1972.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**, 1ª. edição. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BONALDO, S. M.; SANTOS, B. T.; RONDON, M. N.; TRENTO, R. A. ocorrência de antracnose em *Morinda citrifolia* L. (Rubiales: Rubiaceae) em Sinop/MT. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 301 - 305, 2011.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, n. 2, p. 210-220, 2002.

COSTA, L. N. F.; MAGALHÃES, E. A.; MOTA, L. G. S. M.; ALMEIDA, L. M.; GUEDES, M. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fermentos biológicos comerciais (*Saccharomyces cerevisiae*) Dr. Oetker e Dona Benta. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 1, 2012.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V. L.; CUNNINGTON, G.-T.; SHIVAS, J. R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 47–56, 2011.

GUIMARÃES, I. C. O.; SOUZA, A. R. M.; CORNÉLIO, V. M. O.; PEREIRA, J.; VILLELA, V. A. Identificação de *Aspergillus* spp. toxigênico em arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, s.1, p.60-62, 2010.

KRISHNA, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVED, S. ; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, K.; BORASATE, A.; MISHRA, D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2009.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v.76, n.1 p.103-122, 1973.

MENDONÇA, M. B.; HIDALGO A. F.; CHAVES F. C. M. Isolamento e identificação de fungos com potencial patogênico para a saúde humana em material vegetal de uso medicinal comercializado em Manaus. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Room), 2009.

MOSTERTT, L.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the Phomopsis viticola complex. **Sydowia**, v. 52, n.1, p. 46-58. 2000.

MUSSOI, J. G.; FONTANA, R. C.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* em culturas isoladas e mistas. In: **XIX Encontro de jovens pesquisadores e I Mostra acadêmica de inovação e tecnologia, Caxias do Sul**. 2011.

OYELEKE, S. B.; EGWIN, E. C.; OYEWOLE, O. A; JOHN, E. E. Production of cellulase and protease from microorganisms isolated from gut of *Archachatina marginata* (Giant African Snail). **Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2012.

OYELEKE, S. B.; EGWIN, E. C.; AUTA, S. H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**. v. 2, n. 7, p. 83-87, 2010.

PITT, J. I. **A laboratory to common *Penicillium species***, 1ª. edição. Austrália: CSIRO, 1985.

RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. **The genus *Aspergillus***, 1ª. edição - 3ª. reimpressão. New York: Robert E. Krieger Co., 1977.

RAPER, B.K.S.; THOM, C.A. **Manual of the penicillia**, 1ª. edição. Baltimore: Williams and Wilkins, 1968.

SALES, J. F.; ALVARENGA, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; NOGUEIRA, F. D.; SILVA, F. G.; VEIGA, A. D. Efeito da celulase sobre a decomposição do pergaminho e sua influência na velocidade e porcentagem de germinação de sementes de cafeeiro. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p.1146-1152, 2005.

SILVA, R. L. O; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p.649-655, 2006.

SAMSON, R. A.; PITT J. I. **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics**, 1ª. edição. New York, Plenum Press, 1985.

SUNAYANA, N; PRAKASH, H. S. Fungal endophytes of *Boswellia serrata* roxb. (*burseraceae*), a medicinal tree species. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 1, n. 6, p.01-05, 2012.

TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas)**. 1ª. edição. Manaus: Edua, 2011.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n.2, p.169–172, 2005.

TICHOTA, D. M.; LOPES, F. C.; SILVA, L. A. D. E. ; BRANDELLI, A. Otimização da produção de proteases de *Aspergillus niger*. In: **XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS**. 2010. Porto Alegre: Anais do XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, p. 261-263.

VARGA, J.; KOCSUBE´, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, C.; SUSCA, A.; MEIJER, M. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.8, p.1925 – 1932, 2007.

Received 21 October 2012

Accepted 02 March 2013