

<https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a56.1-7>

Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de fitase para inclusão na alimentação animal

Júlio César dos Santos Nascimento^{1*}, Lucilo Bioni da Fonseca Filho², Raphael Luiz Andrade Silva³, Priscilla Virginio de Albuquerque⁴, Lourival Barros de Sousa Brito Pereira⁵, Caio Alves da Costa⁶, Felipe Pereira de Melo⁷, Jailson Souza do Nascimento⁸, Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim⁹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹⁰

¹Professor do Centro Universitário Maurício de Nassau, Curso de Medicina Veterinária, Recife-PE Brasil.

²Discente do curso de Medicina Veterinária em Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil. E-mail: lucilofilho@gmail.com

³Biólogo em Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil. E-mail: raphaelluizandradesilva@gmail.com

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil E-mail: priscilla2009w@hotmail.com

⁵Discente do curso de Medicina Veterinária em Universidade Maurício de Nassau, Recife-PE Brasil. E-mail: lorinho2013.1@hotmail.com

⁶Professor em Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RO Brasil. E-mail: costa.caioalves@hotmail.com

⁷Médico Veterinário, Recife-PE Brasil, E-mail: phelipe16_2010@hotmail.com

⁸Discente do curso de Agronegócios do SENAR, Recife-PE. Brasil. E-mail: Souza.jailsonn@gmail.com

⁹Professor Associado em Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil. E-mail: marleyneamorim@gmail.com

¹⁰Professor Titular em Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil. E-mail: analuporto@yahoo.com.br

*Autor para correspondência, E-mail: juliocezar@veterinario.med.br

RESUMO. O fósforo (P) contido nos grãos e seus subprodutos utilizados na alimentação de animais não ruminantes, se apresenta em grande parte, indisponível para a absorção. Portanto, o fósforo pode encontrar-se de 29 a 99% indisponível nos ingredientes de origem vegetal, por estar preso à estrutura estável do ácido fítico. Define-se por enzimas, como sendo um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente protéica com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras. Fitases - *Mio*-inositol fosfohidrolase hexafosfato - formam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ácido fítico (*mio*-inositol hexafosfato) e os seus sais (fitatos), geralmente produzindo inositol, inositol monofosfato e fosfato inorgânico, aumentando a disponibilidade de fósforo para a absorção. Os fungos são altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo de fungos filamentosos de grande dispersão no meio ambiente e importante nos processos de biodeterioração, principalmente em alimentos estocados e industrializados. Os resíduos agroindustriais são gerados no processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool, sendo sua produção, geralmente, sazonal. Os fungos para seleção de produção de fitase foram obtidos da coleção URM do Departamento de Micologia -UFPE. No total, foram obtidas 19 espécies do gênero *Aspergillus*. Na primeira etapa do *screening* as linhagens foram replicadas no Meio Screening Fitase (MSF) para classificar os possíveis produtores de fitase. O MSF contém como única fonte de carbono e de fosfato, o ácido fítico (fitato). A segunda etapa do *screening* foi realizada com as linhagens que apresentaram crescimento na 1ª etapa. As mesmas foram inoculadas pela técnica do ponto central. O diâmetro das colônias foi mensurado por 96 horas. Dentre os 19 fungos *Aspergillus spp.* testados no meio básico modificado, a maioria das espécies apresentaram crescimento no meio, exceto os fungos *A. niveus* URM 2803 e *A. sydowi* URM 3066. *A. aculeatus* URM 4953 e *A. janus* URM 4456 apresentaram crescimento das colônias somente após 24 horas de incubação. *A. caespitosus* URM 5182 foi o microrganismo que apresentou o crescimento mais tardio (a partir de 48 horas) no meio *screening* fitase. *A. phoenicis* URM 4924 se destacou no crescimento da em meio básico modificado seguido do *A. niger* URM 5239 com 4,800 cm

em 96 horas. O presente trabalho demonstra o potencial dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* na produção de fitase para inclusão na alimentação animal.

Palavras chave: fungos, produção animal, *screening* tanase

Selection of fungi of the genus Aspergillus phytase for inclusion in animal feed

ABSTRACT. The phosphorus (P) contained in the grains and their by-products, used in the feeding of non-ruminant animals, is largely unavailable for their absorption. Therefore, phosphorus may be 29 to 99% unavailable in ingredients of plant origin, because it is attached to the stable structure of phytic acid. It is defined by enzymes as being a group of organic substances of a normally protein nature with intra- or extracellular activity that have catalytic functions. Phytases - Myo-inositol phosphohydrolase hexaphosphate - form a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of phytic acid (myo-inositol hexaphosphate) and its salts (phytates), generally producing inositol, inositol monophosphate and inorganic phosphate, increasing the availability of phosphorus to the absorption. Fungi are highly efficient beings in the degradation of a wide range of substrates. The genus *Aspergillus* belongs to the group of filamentous fungi of great dispersion in the environment and plays an important role in the biodeterioration processes, mainly in stored and industrialized foods. Agroindustrial wastes are generated in the processing of food, fiber, leather, wood, sugar and alcohol production, and its production is generally seasonal. Fungi for selection of phytase production will be obtained from the URM collection of the Department of Mycology - UFPE. In total, 19 species of the genus *Aspergillus* were obtained. In the first stage of the screening the strains were replicated in the Medium Screening Phytase (MSF) to classify the possible phytase producers. MSF contains phytic acid (phytate) as its only source of carbon and phosphate. The second stage of screening was performed with the strains that presented growth in the 1st stage. They were inoculated by the central point technique. The diameter of the colonies was measured for 96 hours. Among the 19 fungi *Aspergillus* spp. tested in the modified basic medium, most of the species showed growth in the medium, except the fungi *A. niveus* URM 2803 and *A. sydowi* URM 3066. *A. aculeatus* URM 4953 and *A. janus* URM 4456 showed growth of the colonies only after 24 hours of incubation. *A. caespitosus* URM 5182 was the microorganism that showed the most late growth (from 48 hours) in the screening phytase medium. *A. phoenicis* URM 4924 stood out in the growth of the modified basic medium followed by *A. niger* URM 5239 with 4,800 cm in 96 hours. The present work demonstrates the potential of the filamentous fungi of the genus *Aspergillus* in the production of phytase for inclusion in animal feed.

Keywords: fungi, animal production, screening tannase

Selección de hongos del género Aspergillus productores de fitasa para su inclusión en la alimentación animal

RESUMEN. El fósforo (P) contenido en los granos y sus subproductos, utilizados en la alimentación de animales no rumiantes, está en gran parte no disponible para su absorción. Por lo tanto, el fósforo puede ser 29 a 99% no disponible en ingredientes de origen vegetal, por estar ligado a la estructura estable del ácido fítico. Se define por enzimas, como un grupo de sustancias orgánicas de naturaleza normalmente proteica con actividad intra o extracelular con funciones catalíticas. Fitasas – mio-inositol fosfohidrolasa hexafosfato – forman un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del ácido fítico (hexafosfato de mio-inositol) y sus sales (fitatos), produciendo generalmente inositol, monofosfato de inositol y fosfato inorgánico mediante el aumento de la disponibilidad de fósforo para la absorción. Los hongos son altamente eficientes en la degradación de una amplia gama de sustratos. El género *Aspergillus* pertenece al grupo de hongos filamentosos de gran dispersión en el

medio ambiente y desempeña un papel importante en los procesos de biodegradación, principalmente en alimentos almacenados e industrializados. Los residuos agroindustriales se generan en el procesamiento de alimentos, fibras, cuero, madera, producción de azúcar y alcohol, y su producción es generalmente estacional. Los hongos para la selección de la producción de fitasa fueron obtenidos de la colección URM del Departamento de Micología - UFPE. En total, se obtuvieron 19 especies del género *Aspergillus*. En la primera fase del *Sreening*, las cepas se replicaron en Medio Screening Fitasa (MSF) para clasificar a los posibles productores de fitasa. MSF contiene como única fuente de carbono y fosfato, ácido fítico (fitato). La segunda etapa de *Sreening* fue realizada con las cepas que presentaron crecimiento en la 1ª etapa. Las mismas fueron inoculadas por la técnica del punto central. El diámetro de las colonias fue medido por 96 horas. Entre los 19 hongos *Aspergillus* spp. testados en el medio básico modificado, la mayoría de las especies se presentó crecimiento en el medio, excepto los hongos *A. niveus* URM 2803 y *A. sydowi* URM 3066. *A. aculeatus* URM 4953 y *A. janus* URM 4456 mostraron crecimiento de las colonias sólo después de 24 horas de incubación. *A. Caespitosus* URM 5182 fue el microorganismo que mostró el crecimiento más tardío (a partir de 48 horas) en MSF. *A. phoenicis* URM 4924 se destacó en el crecimiento del medio básico modificado seguido de *A. niger* URM 5239 con 4.800 cm en 96 horas. El presente trabajo demuestra el potencial de los hongos filamentosos del género *Aspergillus* en la producción de fitasa para su inclusión en la alimentación animal.

Palabras clave: producción animal, hongos, *screening* tanase

Introdução

O fósforo (P) contido nos grãos e seus subprodutos, utilizados na alimentação de animais não-ruminantes, se apresenta em grande parte, indisponível para a absorção pelos mesmos. [Cromwell & Coffey \(1991\)](#), a biodisponibilidade do fósforo dos grãos e subprodutos varia entre 1 e 71%, relativa à disponibilidade padrão (100%) do fósforo do fosfato monossódico. Portanto, o fósforo pode encontrar-se de 29 a 99% indisponível nos ingredientes de origem vegetal, por estar preso à estrutura estável do ácido fítico. Por esta razão, é uma prática comum utilizar-se fosfatos inorgânicos nas rações de aves e suínos para atender suas exigências nutricionais ([Fireman & Fireman, 1998](#)).

Além de serem encontradas em plantas e em alguns tecidos animais, as fitases também são produzidas por microrganismos tais como em *Escherichia coli*, ([Greiner et al., 1993](#)), *Klebsiella* spp. ([Tambe & Sharma, 1994](#)), *Enterobacter* spp. ([Yoon et al., 1996](#)), *Aspergillus oryzae* ([Fujita et al., 2000](#)) e *Aspergillus niger* ([Silva et al., 2005](#)). Dentre estes, os fungos filamentosos têm se mostrado os mais promissores na produção da enzima, principalmente os do gênero *Aspergillus* ([Ullah & Gibson, 1987](#), [Nair & Duvnjak, 1990](#), [Richardson et al., 2001](#)). Fitase extracelular tem sido encontrado também, em outras espécies de *Aspergillus* spp., tal como *A. amstelodami*, *A. candidus*, *A. flavus* e *A. repens* ([Howson & Davis, 1983](#)).

A fitase é uma enzima ésteres-hidrolítica com uma massa molecular estimada de 35-700 kDa dependendo da fonte da origem. Uma grande molécula (700 kDa) em conjunto com um peptídeo excessivamente pequeno (10-13 KDa) foi encontrada em *Klebsiella aerogenes*. Duas formas moleculares distintas de fitase expuseram diferenças em propriedades físico-químicas como a constante Michelis (K_m), pH ótimo, e termo-estabilidade; além disso, supõe-se que a menor fração de massa molecular. É o primeiro caso onde um peptídeo tão pequeno expõe uma atividade enzimática ([Tambe & Sharma, 1994](#)). A enzima produzida por *Aspergillus terreus* tem uma massa molecular de 214 KDa que é uma molécula hexamérica de subunidades com uma massa molecular de 37 KDa; entretanto a enzima purificada de outras fontes exibe uma estrutura monomérica ([Yamamoto et al., 1972](#)).

As fitases comerciais disponíveis atualmente são produzidas por uma larga variedade de distintos organismos, dentre os quais estão bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As consequências ambientais e nutritivas adversas de fitato dietético pode ser melhorado pela inclusão de fitase na dieta monogástrica ([Campbell & Bedford, 1992](#), [Bedford & Partridge, 2011](#)). O presente trabalho tem como objetivo demonstrar o potencial dos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* na produção de fitase para inclusão na alimentação animal.

Material e Métodos

Seleção de fungos produtores de fitase

Os fungos para seleção de produção de fitase serão obtidos da coleção URM do Departamento de Micologia (Centro de Ciências Biológicas) da Universidade Federal de Pernambuco. No total, foram obtidas 19 espécies do gênero *Aspergillus*. A Coleção de Culturas, Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, apresenta um acervo diversificado de fungos pertencentes aos filos Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e “Deuteromycota” (Fungos anamorfos). A Micoteca URM está registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM (University Recife Mycologia) e é filiada ao Word Federation for Culture Collections (WFCC) sob o número 604 (Micoteca, 2007; World Data Center for microorganisms, 2007).

Foram adquiridas 19 amostras de fungos do gênero *Aspergillus* da coleção URM (Micoteca – Departamento de Micologia/CCB/UFPE). Na primeira etapa do *screening* as linhagens foram replicadas no Meio *Screening* Fitase (meio básico modificado) para classificar os possíveis produtores da enzima fitase (Tabela 1). O meio básico modificado contém como única fonte de carbono e de fosfato, o ácido fítico (fitato). O meio continha (g/L): ácido fítico 5,00; NaNO₃, 3,00; MgSO₄.7H₂O, 0,5; KCl, 0,5; Fe₂SO₄, 0,01; CaCl₂, 0,5; ZnSO₄, 0,01; ágar, 30,0; pH 4,5 (Couri & Farias, 1995). A inoculação de cada espécie de *Aspergillus* foi feita em duplicata a 30° C por 120 horas.

A segunda etapa do *screening* foi realizada com as linhagens que apresentaram crescimento na 1ª etapa, em meio *screening* fitase. As mesmas foram inoculadas pela técnica do ponto central em placas contendo o meio básico modificado (meio *screening* fitase). As placas foram incubadas a 30° C em estufa microbiológica e o diâmetro das colônias foi mensurado a cada 24 horas, utilizando um paquímetro por um período total de 96 horas (Gomes da Silva et al., 2007). Os experimentos foram realizados em duplicata, considerando a média aritmética de ambos.

Meio de manutenção, crescimento dos fungos

Para manutenção das culturas será utilizado o meio de cultura potato dextrose agar (PDA) e Czapek (Cz). As amostras foram repicadas a cada

30 dias para tubos de ensaio contendo ágar Sabourand, Malte ou Czapek, de acordo com amostra, incubados a 30° C por 48h.

Tabela 1. *Aspergillus* utilizados para o *screening* de produtores de fitase.

Espécies <i>Aspergillus</i> URM
<i>A. aculeatus</i> URM 4953
<i>A. caespitosus</i> URM 5182
<i>A. carbonarius</i> URM 1546
<i>A. carbonarius</i> URM 3818
<i>A. carbonarius</i> URM 5012
<i>A. janus</i> URM 4456
<i>A. japonicus</i> URM 3833
<i>A. japonicus</i> URM 3840
<i>A. japonicus</i> URM 3916
<i>A. japonicus</i> URM 5242
<i>A. niger</i> URM 2908
<i>A. niger</i> URM 4645
<i>A. niger</i> URM 5218
<i>A. niger</i> URM 5239
<i>A. niger</i> URM 5243
<i>A. niveus</i> URM 2803
<i>A. phoenicis</i> URM 4924
<i>A. sydowi</i> URM 3066
<i>A. terreus</i> URM 224

Taxonomia das espécies do gênero *Aspergillus*

Para confirmação taxonômica das espécies, foram observadas as características macroscópicas, tais como: coloração, consistência e diâmetro das colônias e, microscópicas como: estruturas somáticas e reprodutivas, sendo estas últimas observadas através do cultivo sob lamínula (Dalmau, 1929) utilizando Ágar Extrato de Malte contido em placa de Petri, onde foram semeados fragmentos da colônia em três pontos equidistantes, cobrindo-os com lamínulas esterilizadas e mantidos a temperatura ambiente. Após aproximadamente 7 dias, removeu-se a lamínula do cultivo e colocou sobre uma lâmina de microscopia, contendo uma gota de corante Azul de Aman para posterior observação das microestruturas em microscópio de luz. As espécies foram confirmadas taxonomicamente com base na literatura especializada (Raper & Fennell, 1965, Klich & Pitt, 1988).

Resultados e Discussão

Gumbira-Sa'id et al. (1992) estudaram a produção de ração animal pela fermentação de sagu pelo *Rhizopus oligosporus* e obtiveram um enriquecimento proteico de 20mg.g⁻¹ para 83,

9mg.g-1 (peso seco do produto obtido). [Joshi & Sandhu \(1996\)](#) produziram ração animal pela fermentação da polpa de maçã residual de indústria de suco por *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Torula utilis* obtiveram um incremento no teor proteico de 5,80% para 16,80; 18,50 e 15,57% para cada microrganismo utilizado, respectivamente.

A [tabela 2](#) mostra os resultados da capacidade dos fungos do gênero *Aspergillus* testados em crescer no meio *screening* fitase, no qual possui o ácido fítico como única fonte de carbono e fósforo (1º Etapa do *screening*). Dos 19 fungos *Aspergillus spp.* testados no meio básico modificado, a maioria das espécies apresentaram crescimento no meio, exceto os fungos *A. niveus* URM 2803 e *A. sydowi* URM 3066. Isso indicou que o ácido fítico não conseguiu ser assimilado por esses fungos e demonstrando que os mesmos não produzem a enzima fitase, na qual catalisa a reação de hidrólise do ácido fítico para posterior aproveitamento, tanto do inositol (como fonte de carbono), como dos íons ortofosfato (como fonte de fósforo).

Tabela 2. Desenvolvimento dos fungos do gênero *Aspergillus* em meio *screening* fitase.

Espécie	Resultado
<i>A. aculeatus</i> URM 4953	+
<i>A. caespitosus</i> URM 5182	+
<i>A. carbonarius</i> URM 1546	+
<i>A. carbonarius</i> URM 3818	+
<i>A. carbonarius</i> URM 5012	+
<i>A. janus</i> URM 4456	+
<i>A. japonicus</i> URM 3833	+
<i>A. japonicus</i> URM 3840	+
<i>A. japonicus</i> URM 3916	+
<i>A. japonicus</i> URM 5242	+
<i>A. niger</i> URM 2908	+
<i>A. niger</i> URM 4645	+
<i>A. niger</i> URM 5218	+
<i>A. niger</i> URM 5239	+
<i>A. niger</i> URM 5243	+
<i>A. niveus</i> URM 2803	-
<i>A. phoenicis</i> URM 4924	+
<i>A. sydowi</i> URM 3066	-
<i>A. terreus</i> URM 224	+

+: Crescimento evidenciado em meio *screening* fitase;

-: Crescimento não-evidenciado em meio *screening* fitase.

Os resultados apresentados na [Tabela 3](#) mostram que o *A. aculeatus* URM 4953 e *A. janus* URM 4456 apresentaram crescimento das

colônias somente após 24 horas de incubação. *A. caespitosus* URM 5182 foi o microrganismo que apresentou o crescimento mais tardio (a partir de 48 horas) no meio *screening* fitase, demonstrando a incapacidade do mesmo em aproveitar de forma rápida (antes de 48 horas) o fitato que continha no meio de seleção para produtores de fitase. A partir de 48 horas de incubação, todas as linhagens apresentaram um bom desempenho de crescimento de colônia que variou entre 1,15 - 2,30 cm, com 96 horas, as colônias apresentaram diâmetros que variaram de 0,655 a 5,680 cm. *A. phoenicis* URM 4924 se destacou no crescimento da em meio básico modificado, apresentando um diâmetro de colônia de 5,680 cm em 96 horas de incubação (30° C), seguido do *A. niger* URM 5239 com 4,800 cm em 96 horas.

Tabela 3. *Aspergillus* utilizados para o *screening* de produtores de fitase.

Espécies	Diâmetro das Colônias (cm/hora)**			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>A. aculeatus</i> URM 4953	*	1,85	2,63	3,85
<i>A. caespitosus</i> URM 5182	*	*	0,33	0,65
<i>A. carbonarius</i> URM 1546	0,25	1,82	2,76	3,58
<i>A. carbonarius</i> URM 3818	0,18	1,53	2,39	3,37
<i>A. carbonarius</i> URM 5012	0,58	1,63	2,46	3,68
<i>A. janus</i> URM 4456	*	1,15	2,42	3,84
<i>A. japonicus</i> URM 3833	0,32	1,42	2,01	2,85
<i>A. japonicus</i> URM 3840	0,67	2,21	3,17	4,47
<i>A. japonicus</i> URM 3916	0,94	2,30	3,35	4,50
<i>A. japonicus</i> URM 5242	0,70	1,93	2,65	3,22
<i>A. niger</i> URM 2908	0,28	1,83	2,95	3,84
<i>A. niger</i> URM 4645	0,77	2,24	3,40	4,62
<i>A. niger</i> URM 5218	0,69	1,85	2,59	3,63
<i>A. niger</i> URM 5239	0,60	2,11	3,22	4,80
<i>A. niger</i> URM 5243	0,20	1,67	2,86	4,55
<i>A. phoenicis</i> URM 4924	0,40	2,07	3,59	5,68
<i>A. terreus</i> URM 224	0,41	1,32	2,35	3,50

*Não houve crescimento ou não se conseguiu mensurar macroscopicamente. ** Esses valores representam a média dos experimentos em duplicata.

A. phoenicis URM 4924 foi o fungo que apresentou maior crescimento por hora no meio *screening* fitase (5,68 cm em 96 horas) *A. phoenicis* URM 4924 possuiu crescimento em Ágar Extrato de Malte, variando de 6 a 7cm de diâmetro em duas semanas. O reverso da colônia varia de branco a creme. Cabeça conidial globosa quando jovem e variável na cor (de marrom a negra), na maior parte 300-500µm podendo chegar até 1200µm no diâmetro; conidióforo variável no tamanho, variando geralmente de 1-

2,5 mm podendo ter até 4mm e o diâmetro de 10-20 µm, com paredes lisa e levemente colorido perto da vesícula; vesícula globosa, na maior parte variando de 45-65µm, ocasionalmente chegando até 80 ou 85µm no diâmetro; esterigma em duas séries, amarronzado, o primário possui tamanho variado, frequentemente de 20-35µm de comprimento, porém nas cabeças conidiais maduras a maior parte vai de 40-60µm x 5,5-7,5µm, podendo o esterigma se apresentar às vezes septadas e alcançar 100-110µm, o esterigma secundário vai de 6,5-11µm x 3-3,5µm. Conídio globoso e liso quando jovem, tornando-se rugoso na maturidade, na maior parte 3-3,5 µm mas até 4µm no diâmetro. *A. awamori* var. *hominis* apresenta-se em sinonímia de *A. phoenicis* e *A. granulatus* é um provável sinônimo para *A. phoenicis* ([Raper & Fennell, 1965](#)).

Aspergillus niger URM 5239 apresentou o segundo maior diâmetro de colônia em meio sreening fitase (4.80 cm em 96 horas) A taxonomia de fungos pertencentes ao Grupo *Aspergillus niger* constitui-se em uma das mais complexas do gênero *Aspergillus*, tendo como principais características, conídios de coloração marrom-escuro a negros, conidióforo hialino ou levemente pigmentado próximo ao ápice, esterigma uniseriado ou biseriado e vesículas globosa ([Raper & Fennell, 1965](#)).

[Raper & Fennell \(1965\)](#) produziram um importante manual de classificação do gênero *Aspergillus* e incluíram 12 espécies e duas variedades para o grupo *Aspergillus niger* (*A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. ficum*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *A. pulverulentus*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. foetidus* var. *acidus* e *A. foetidus* var. *pallidus*). [Al-Musallam \(1980\)](#) revisou a taxonomia deste grupo de fungos usando análise de agrupamento envolvendo parâmetros morfológicos e culturais e subdividiu o grupo *Aspergillus niger* em apenas 4 espécies facilmente distinguíveis, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus*. As diferenças aparentemente insignificantes entre os membros do Grupo *Aspergillus niger* foi à razão decisiva para Al-Musallam sugerir que algumas espécies reconhecidas por [Raper & Fennell \(1965\)](#) fossem reduzidas a variedades.

Aspergillus niger é caracterizado por apresentar colônia marrom escuro a negra, esterigma biseriado com grandes vesículas, métulas razoavelmente longas e conídios

irregularmente rugosos. Possuem diâmetro da colônia variando de 3 a 7 cm em meio Ágar Extrato de Malte a 28° C ± 1° C, com textura granular para flocosa. Cabeça conidial radiada, com conidióforo variando de 300-3000 µm x 7-20µm, de parede lisa, hialina para amarelada ou ligeiramente marrom, especial perto do ápice; vesícula de 20-85µm de largura, quase esférica; esterigma biseriado (muito raramente uni-seriado), métula cobrindo a superfície inteira da vesícula, medindo 12-40µm x 3-6µm, às vezes com um único septo e fiálides de 7-10µm x 3-4µm. Conídio globoso, de 3-5µm de diâmetro e muito rugoso.

Conclusão

Os fungos do gênero *Aspergillus* demonstraram ser ótimos produtores da enzima fitase, pois dos 19 (dezenove) espécies de fungos testados em meio *sreening* fitase, 17 (dezessete) destes conseguiram desenvolver, demonstrando a habilidade dos mesmos em produzir a enzima fitase, a qual pode ser utilizada para estudos posteriores e ser incluída na alimentação de animais não-ruminantes.

Referências Bibliográficas

- Al-Musallam, A. 1980. *Revision of the black Aspergillus species*.
- Bedford, M. R. & Partridge, G. G. 2011. *Enzymes in farm animal nutrition 2nd edition*. CAB International, Wallingford, UK.
- Campbell, G. L. & Bedford, M. R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 72, 449-466.
- Couri, S. & Farias, A. X. 1995. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 26, 314-317.
- Cromwell, G. L. & Coffey, R. D. 1991. Phosphorus-a key essential nutrient, yet a possible major pollutant-its central role in animal nutrition. *Biotechnology in the Feed Industry*, 1, 133-145.
- Dalmau, L. M. 1929. Remarques sur la technique mycologique. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 7, 536-545.
- Fireman, F. A. T. & Fireman, A. K. B. A. T. 1998. Enzimas na alimentação de suínos. *Ciência Rural*, 28, 173-178.

- Fujita, J., Budda, N., Tujimoto, M., Yamane, Y.-i., Fukuda, H., Mikami, S. & Kizaki, Y. 2000. Isolation and characterization of phytase isozymes produced by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 22, 1797-1802.
- Gomes da Silva, L., Ferreura, C. R. C. & Courin, S. 2007. Seleção de *Aspergillus niger* produtores de fitase. CEFET, Nilópolis, Rio de Janeiro.
- Greiner, R. T., Konietzny, U. & Jany, K.-D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 107-113.
- Gumbira-Sa'id, E., Mitchell, D. A., Greenfield, P. F. & Doelle, H. W. 1992. A packed bed solid-state cultivation system for the production of animal feed: Cultivation, drying and product quality. *Biotechnology Letters*, 14, 623-628.
- Howson, S. J. & Davis, R. P. 1983. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 377-382.
- Joshi, V. K. & Sandhu, D. K. 1996. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology*, 56, 251-255.
- Klich, M. A. & Pitt, J. I. 1988. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Nair, V. C. & Duvnjak, Z. 1990. Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 183-188.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I. 1965. *The genus Aspergillus*. Baltimore.
- Richardson, A. E., Hadobas, P. A. & Hayes, J. E. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus phytase* from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal*, 25, 641-649.
- Sano, K., Fukuhara, H. & Nakamura, Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Biotechnology letters*, 21, 33-38.
- Silva, L. G., Trugo, L. C., Costa, S. T. & Couri, S. 2005. Low phytate lupin flour based biomass obtained by fermentation with a mutant of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 40, 951-954.
- Tambe, D. E. & Sharma, M. M. 1994. The effect of colloidal particles on fluid-fluid interfacial properties and emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 52, 1-63.
- Ullah, A., H.J. & Gibson, D. M. 1987. Extracellular phytase (EC 3.1. 3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Preparative Biochemistry*, 17, 63-91.
- Yamamoto, S., Minoda, Y. & Yamada, K. 1972. Chemical and physicochemical properties of phytase from *Aspergillus terreus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 2097-2103.
- Yoon, S. J., Choi, Y. J., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Lee, S. C. & Jung, Y. H. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 449-454.

Article History:

Received 31 October 2017

Accepted 30 November 2018

Available online 24 February 2018

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.