

## Fermentação no estado sólido: parâmetros que influenciam na produção de coagulante e avaliação da toxicidade de um representante dos deuteromicetos

### Solid state fermentation: parameters influencing coagulant production and toxicity evaluation of a representative of the deuteromycetes

Maria Francisca Simas Teixeira<sup>1</sup>, Salomão Rocha Martim<sup>2</sup>, Rosana Antunes Palheta<sup>3</sup>, Elliza Emily Barbosa Perroni<sup>4</sup>, Ana Kezia Pimentel de Brito<sup>4</sup>

<sup>1</sup>DPUA Culture Collection, Universidade Federal do Amazonas (UFAM); <sup>2</sup>Universidade Nilton Lins, Manaus, AM, Brasil; <sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Pós graduação em Biotecnologia, UFAM, Manaus, AM, Brasil.

Teixeira, M. F. S.  
mteixeira@ufam.edu.br  
<https://orcid.org/0000-0002-9703-1932>

Martim, S. R.  
salomao.martim@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-0789-2411>

Palheta, R. A.  
rosanapalheta@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-9716-0208>

Perroni, E. E. B.  
ellizaperrone01@gmail.com  
<https://orcid.org/0000,0003-2832-2629>

Brito, A. K. P. de\*  
anakeziapimentel@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-7925-4908>

\* Autor correspondente: Programa de Pós graduação em Biotecnologia, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

**Resumo:** O consumo crescente de queijos e a escassez de coalhos incentivam a busca por novas fontes de enzimas coagulantes do leite. *Aspergillus* sp. têm se destacado por sintetizarem coagulantes com características bioquímicas para uso na produção de queijo. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros biológicos e físicos que influenciam na produção de coagulante por uma espécie de *Aspergillus* e avaliar a toxicidade do extrato bruto. *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1461 da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas, foi cultivado em ágar Czapek, extrato de levedura e peptona, em placas de Petri, a 25 °C por sete dias. Na fermentação em estado sólido foram utilizados resíduos de açaí e casca de cupuaçu suplementados com farelo de arroz. Um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> foi realizado para avaliar a influência da idade e tamanho do inóculo e tempo de fermentação na produção de enzimas proteolíticas e de coagulante. A razão coagulante foi determinada. A toxicidade dos extratos foi avaliada utilizando *Artemia salina* e fibroblastos humanos. *A. flavo-furcatis* DPUA 1461 produziu proteases com máxima atividade (65,5 U/mL) com inóculo 10% (v/v), em 5 dias a 120 h de FES. A máxima produção de coagulante (656,7 U) foi observada no inóculo (10%), em 288h de fermentação e inóculo de 10 dias. A elevada razão coagulante (15,5) foi obtida com inóculo de 3%, 10 dias e 288h de bioprocesso. Resíduos lignocelulósicos amazônicos são substratos eficazes para a produção de coagulante com potencial para uso na produção de queijo por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1461.

**Palavras-chave:** bioprocesso, enzimas, fungo filamentososo, laticínios, queijo.

**Abstract:** The growing consumption of cheese and the scarcity of curds have encouraged the search for new sources of milk coagulating enzymes. *Aspergillus* sp. have stood out for synthesizing coagulants with biochemical characteristics for use in cheese production. The aim of this study was to evaluate the biological and physical parameters that influence the production of coagulants by a species of *Aspergillus* and to assess the toxicity of the crude extract. *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1461 from the DPUA Culture Collection at the Federal University of Amazonas was grown on Czapek agar, yeast extract and peptone in Petri dishes at 25 °C for seven days. Solid-state fermentation used açaí waste and cupuaçu peel supplemented with rice bran. A complete factorial design 2<sup>3</sup> was carried out to evaluate the influence of the age and size of the inoculum and fermentation time on the production of proteolytic enzymes and coagulant. The coagulant ratio was determined. The toxicity of the extracts was assessed using *Artemia salina* and human fibroblasts. *A. flavo-furcatis* DPUA 1461 produced proteases with maximum activity (65.5 U/mL) with 10% (v/v) inoculum, in 5 days at 120 h of FES. The maximum coagulant production (656.7 U) was observed in the 10% inoculum, at 288h of fermentation and 10 days of inoculum. The highest coagulant ratio (15.5) was obtained with 3% inoculum, 10 days and 288h of bioprocess. Amazonian lignocellulosic residues are effective substrates for the production of coagulants with potential for use in cheese production by *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1461.

**Keywords:** bioprocess, enzymes, filamentous fungus, dairy products, cheese.

## INTRODUÇÃO

Proteases, enzimas de importância econômica e industrial, são utilizadas na produção de alimentos, medicamentos, cosméticos e em processos de biorremediação (Prado et al., 2021). Entre os biocatalisadores proteolíticos têm crescido o interesse por proteases coagulantes do leite com potencial para uso na produção de queijo. A escolha do agente de coagulação constitui ação fundamental para o sucesso na produção de queijos devido influenciar diretamente no rendimento, sabor, aroma e textura desses produtos alimentícios (Martim et al., 2021).

Na fabricação de queijos, comumente no processo de fabricação utilizam o coalho de origem animal, composto majoritariamente pela quimosina que cliva de forma específica a ligação Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup>, nas moléculas de  $\kappa$ -caseína (Bakr et al., 2022; Martim et al., 2017). Todavia, novas fontes de coagulantes vêm sendo estudadas, como forma de substituir os coalhos animais. Os fatores que estimulam a essas ações de investigação são os elevados preços dos coalhos, o aumento na produção de queijos, rejeição dos coagulantes de origem animal por questões religiosas e hábitos alimentares, além da escassa aceitação dos coalhos geneticamente modificados (Batista et al., 2021).

Os coagulantes do leite bovino podem ser originários de animais, vegetais e microrganismos. Entretanto, os fungos filamentosos têm se destacado como fontes naturais e renováveis de coagulantes devido as suas propriedades bioquímicas, característica potencial para uso na produção de queijos (Batista et al., 2021). Entre os microfungos, espécies de *Aspergillus* vêm sendo estudadas como fonte de coagulantes: *A. oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha et al., 2010), *A. niger* LBA02 (Castro & Sato, 2014), *A. tamarii* (Benlounissi et al., 2014), *A. candidus* MTCC 1989 (Baskar et al., 2017), *A. flavo furcatis* (Alecrim et al., 2017) e *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 (Mamo et al., 2020).

Para a produção de enzimas coagulantes por fungos filamentosos têm sido utilizada a tecnologia da Fermentação no Estado Sólido (FES), bioprocesso caracterizado pela ausência ou quase ausência de água livre, o que reduz o risco de contaminação por bactérias e fungos unicelulares (Al-Jammas et al., 2018; Mamo et al., 2020). Além disso, na

FES são utilizados resíduos lignocelulósicos, condição que minimiza os impactos ambientais e diminui o valor final do bioproduto (Chinmayee et al., 2019).

A produção de coagulantes por fungos é influenciada por diversos fatores físico-químicos e nutricionais (Al-Jammas et al., 2016). Considerando que cada linhagem de fungo possui condições ótimas para a síntese e excreção de enzimas, os estudos relacionados à otimização dos parâmetros fermentativos são essenciais para que o bioprocessos seja bem-sucedido e possa ser aplicado a nível industrial (Souza et al., 2017).

A avaliação da toxicidade do extrato enzimático é outro fator de grande importância que deve ser considerado para os coagulantes de fungos com potencial uso na produção de queijos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros que influenciam na síntese de coagulante e avaliar a toxicidade dos extratos de uma linhagem de *Aspergillus flavo furcatis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Microrganismo*

Nesta pesquisa foi utilizado *Aspergillus flavo-furcatis* provenientes do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para a reativação e autenticação, os fungos foram subcultivados em Caldo Glicosado, em tubo de ensaio (Lacaz et al., 2002). Os cultivos estacionários foram mantidos a 25 °C. Após o desenvolvimento das estruturas vegetativas e de reprodução no meio líquido, fragmentos dessas culturas foram transferidos para ágar CYA (Czapek, extrato de levedura e peptona), em placas de Petri e mantidos a 25 °C durante sete dias (Klich & Pitt, 1988).

### *Fermentação no estado sólido*

O resíduo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) integral e a casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum.) foram suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*), proporção 1:1 (p/p). Ao término da homogeneização, os resíduos com umidade 60%, pH

6,0 foram transferidos para embalagens de polietileno, transparente de alta densidade com capacidade para 2000 g e espessura de 50  $\mu$ . A esterilização foi realizada a 121 °C por 60 minutos, por dois dias consecutivos (Brito et al., 2024).

### *Determinação da influência da idade do inóculo, tamanho do inóculo e tempo de fermentação*

Para padronização da idade do inóculo *A. flavo-furcatis* foi cultivado em ágar CYA (Czapek, extrato de levedura, peptona), em tubo de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30 °C por cinco, sete e 10 dias. Em cada cultivo foi preparada suspensão celular de concentração final  $10^5$  esporos/mL. De cada suspensão celular foi transferido volume equivalente a 3%, 5% e 10% para 200 g de resíduo agroflorestal. A fermentação foi conduzida a 30 °C por 5, 10 e 12 dias. Para estes experimentos foi feito um planejamento fatorial  $2^3$  completo com três repetições no ponto central para avaliar a influência das variáveis (idade e tamanho do inóculo e tempo de fermentação) na produção de enzimas proteolíticas.

### *Extração das proteases e determinação da atividade proteolítica e coagulante*

As proteases produzidas por fermentação semissólida foram extraídas a 30 °C, em água destilada esterilizada [1:5 (substrato:água, p/v)], a 150 rpm. Após 30 minutos o extrato bruto foi recuperado por filtração em tecido de algodão e seguido de centrifugação a 8000 xg por 10 minutos, a 4 °C. No extrato enzimático foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante (Barbosa et al., 2020).

### *Determinação da atividade proteolítica*

A atividade das proteases foi determinada conforme Leighton et al. (1973). Em um tubo de ensaio foram adicionados 150  $\mu$ L de extrato enzimático e 250  $\mu$ L da solução de azocaseína a 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2. Após 60 minutos de incubação a 25 °C, em câmara

escura, a mistura reacional foi interrompida com 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000 xg) por 15 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, 0,8 mL foi transferido para um tubo de ensaio contendo 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 absorbância de 0,1 em uma hora.

### *Avaliação da atividade coagulante*

Para determinação da atividade coagulante foi utilizado como substrato leite em pó desnatado 10% (p/v), em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, pH 5,8. Do leite diluído foi transferido 5 mL para tubos de ensaio (1,5 cm x 16 cm) e incubado a 40 °C. Após 15 minutos foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático bruto em cada tubo de ensaio. O tempo inicial da coagulação em segundos foi determinado com cronômetro digital. A unidade de atividade de coagulação (U) foi definida como a quantidade de enzima que coagula 1,0 mL de leite, em 40 minutos, a 40 °C (Martim et al., 2021).

### *Testes de toxicidade do extrato bruto*

#### *Bioensaio de toxicidade utilizando **Artemia salina***

Para os testes de toxicidade com *A. salina*, foram utilizados extratos liofilizados de *A. flavo furcatis* DPUA 1461, nas seguintes concentrações 1000, 800, 600, 400 e 200  $\mu$ g/mL, conforme a metodologia descrita por Teixeira et al. (2011). Para eclosão dos ovos, 0,1g de cistos comerciais de *Artemia salina* foi adicionado à solução de sal marinho não iodado 3% (p/v), pH 6,5, mantendo-se os frascos de Erlenmeyer sob agitação (140 rpm), a 30 °C durante 28 horas sob luz (40 watts). Os bioensaios foram realizados em placas multipoços (24 poços). Em cada poço adicionou-se: (1) a suspensão larvas; (2) volume dos extratos em diferentes concentrações e finalmente (3) solução salina 3 % (p/v) completando-se o volume final para 2000  $\mu$ L. O branco foi preparado utilizando-se 100  $\mu$ L da suspensão de larvas e 1900  $\mu$ L da solução salina a 3%. Ao término dos procedimentos iniciais as placas

multipos foram conservadas sob luminosidade constante (40 watts) e temperatura de 30° C. Após 24 horas foi feita a contagem dos náuplios mortos considerando os vivos aqueles que se apresentavam em movimento constante. Após contagem dos náuplios mortos, cinco gotas de solução de formol foram adicionadas em cada poço e após 10 minutos foi determinado o número total de larvas. Para determinar a porcentagem de indivíduos mortos utilizou-se a equação 1 e o resultado foi expresso como citado no quadro 1.

$$\% \text{Mortalidad} : \frac{\text{Número Indivíduos Mortos}}{\text{Número totais indivíduos}} \times 100$$

(01)

Tabela 1  
Classificação da toxicidade de extratos de acordo com a mortalidade das larvas de *Artemia salina*

Mortalidade (%)	Classificação
0 – 9 %	Não tóxico (NT)
10 – 49%	Ligeiramente tóxico (LT)
50 – 80%	Tóxico (T)
90 – 100%	Altamente tóxico (AT)

Fonte: Teixeira et al. (2011).

### Toxicidade em fibroblastos humanos (MRC5)

Neste estudo foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) mantidos em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino a 10 % (v/v) e os antibióticos Ampicilina-Estreptomicina a 1% (p/v). As células foram acondicionadas em estufa com CO<sub>2</sub> a 5%, a 37 °C. A citotoxicidade do extrato *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1461 foi avaliada conforme metodologia descrita por Ahmed et al. (1994). As células foram transferidas para placas com 96 poços na concentração de 0,5 x 10<sup>4</sup> células por poço. Esta placa foi mantida a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5%, por 24 horas. Após este período as células foram tratadas na concentração única de 200 µg/ml de extrato do fungo, durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizado doxorubicina (20µM ou 34µg/mL) e como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1% (v/v). Três horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue 0,4% (v/v) na concentração de 0,02% (v/v) por poço e a leitura das placas realizada em Leitor de microplaca na região de fluorescência em 465 nm e 540 nm. As imagens foram capturadas utilizando o programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company® e os dados

analisados no programa GraphPad prism 6.0. Neste teste o Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente, é reduzido à resofurina, de cor rosa e fluorescente, pelas células viáveis. A toxicidade em fibroblastos humanos foi realizada o extrato que apresentou maior atividade coagulante.

### Análise Estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey que determina a significância das diferenças observadas nas amostras, ao nível de significância de 5% (Minitab, 2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Influência do tamanho e idade do inóculo e tempo de fermentação

A fermentação semissólida de resíduos orgânicos de origem vegetal por *A. flavo-furcatis* DPUA 1461 proporcionou a obtenção de um extrato proteolítico com potencial coagulante para fabricação de queijo. Os resultados apresentados na tabela 1 demonstraram que *A. flavo-furcatis* produziu enzimas proteolíticas nas diferentes condições de fermentação, com máxima atividade (65,5 U/mL) quando foi utilizado inóculo 10% (v/v), de uma cultura com 5 dias de crescimento e 120 h de FES.

Mamo et al. (2020), verificaram síntese máxima de proteases por *Aspergillus oryzae* utilizando 2,5% de inóculo e 120 h de fermentação em farelo de trigo. Da mesma forma, Boukhalifa-Lezzar et al. (2014) relataram produção significativa de enzimas proteolíticas quando foi utilizado *A. oryzae* 2220 com cinco dias de crescimento, mantido por 72 h em meio constituído por bagaço de tomate. Silva et al. (2003) observaram que em 96 h ocorre maior síntese e excreção de proteases por *A. fumigatus* Fresen. cultivado em farelo de trigo. Nos estudos de Fernandes et al. (2024) também verificaram que o farelo de trigo favoreceu a biossíntese de proteases em 96h de fermentação para *A. heteromorphus* URM0269.

Tabela 1  
Atividade de protease, atividade coagulante e razão coagulante de extratos proteolíticos de *A. flavo-furcatis* DPUA 1461

Experimento	Concentração do inóculo (%)	Tempo de fermentação (horas)	Idade do inóculo (dias)	Atividade de protease (U/mL)	Atividade coagulante (U)	Razão coagulante
1	3	120	5	55,8	497,1	8,9
2	3	120	10	50,5	428,6	8,5
3	3	288	5	35,7	514,5	14,4
4	3	288	10	35,4	550,2	15,5
5	10	120	5	65,5	498,9	7,6
6	10	120	10	58,8	426,3	7,2
7	10	288	5	43,7	464,4	10,6
8	10	288	10	58,7	656,7	11,2
9	5	240	7	57,3	222,5	3,9
10	5	240	7	57,6	237,8	4,1
11	5	240	7	57,9	253,1	4,4

No presente estudo, a máxima produção de coagulante (656,7 U) foi observada no experimento 8 (concentração do inóculo = 10%, tempo de fermentação = 288 h e inóculo = 10 dias). Bensmail et al. (2015) e Patil et al. (2012) verificaram produção significativa de coagulante por *A. oryzae* NCIM 1032 e *A. niger* FFB1 após 120 h e 72 h de cultivo semissólido à base de farelo de trigo. Sambo e Sambo (2023), observaram produção máxima de coagulante para *A. tamarii* após 72h em substrato a base de pó de banana.

Alecrim et al. (2015) relataram que *A. flavo furcatis* sintetiza coagulante quando cultivado em semente de açaí e farelo de arroz, durante 120 h. Estes dados corroboram com as afirmações de Prado et al. (2021), cada organismo ou linhagem tem suas condições próprias para a produção máxima de enzimas, incluindo o meio de produção (resíduos agroflorestais), um fator importante a ser monitorado durante o desenvolvimento do processo destes biocompostos para aplicação industrial.

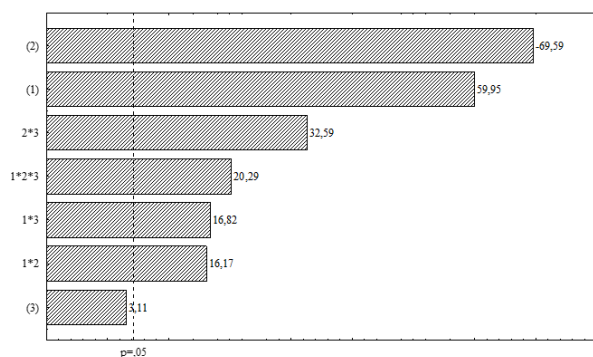
O extrato bruto de *A. flavo furcatis* apresentou elevada razão coagulante (15,5) nas seguintes condições: tamanho do inóculo (3%), idade do inóculo (10 dias) e tempo de fermentação (288h). Vishwanatha et al. (2010) verificaram razão coagulante de 4,39 no extrato proteolítico de *A. oryzae* MTCC 5341 cultivado em farelo de trigo. Alecrim et al. (2015) e Alecrim et al. (2017) relataram que *A. flavo furcatis* DPUA 1641 (5,91) e *A. flavo furcatis* DPUA 1608 apresentaram razões coagulantes de 5,91 e 25, 27 quando cultivados em resíduos de cupuaçu e açaí, respectivamente.

Em todas as condições de fermentação *A. flavo-furcatis* DPUA 1461 apresentou valor médio de razão coagulante maior do que um. Em decorrência, os resultados sugerem a indicação dessa linhagem como fonte de um novo coagulante para aplicação na indústria de laticínios. Martim et al. (2021) relataram que a determinação da razão coagulante é um passo fundamental nos estudos de seleção de extratos enzimáticos promissores para substituição de coalhos animais, em especial para produção de queijos. A utilização de coalhos com elevada razão coagulante resulta em queijos com características físicas e sensoriais adequadas como firmeza e ausência de sabor amargo.

O gráfico de Pareto (Figura 1) representa os efeitos estimados das variáveis na atividade das enzimas proteolíticas produzidas por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1461. As variáveis e suas respectivas interações estão representadas por números no eixo vertical. O comprimento da barra vertical é proporcional ao efeito padronizado e a linha vertical pontilhada está sendo usada para julgar os efeitos estatisticamente significativos. Portanto, as barras que se estendem além dessa linha correspondem aos efeitos significativos de 95%. Em relação à atividade de protease observou-se grande influência das variáveis estudadas e de suas interações. As respostas foram significativas para as variáveis independentes: tempo de fermentação (2) e concentração do inóculo (1), assim como, nas interações entre as três variáveis (1x2x3) e duas variáveis (1x3) e (1x2).

Figura 1

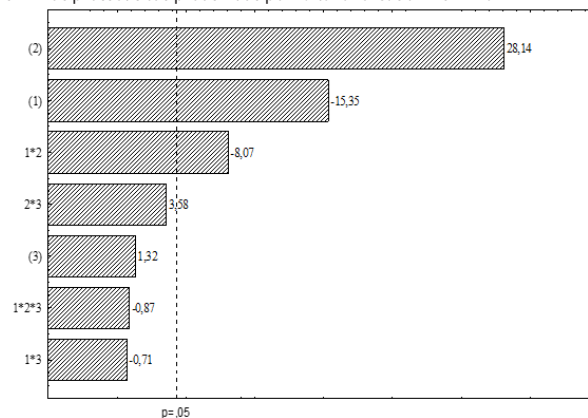
Influência das diferentes variáveis: (1) concentração do inóculo (%), (2) tempo de fermentação (dias) e (3) idade do inóculo (dias) na atividade das enzimas proteolíticas produzidas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1461



O delineamento do ponto central é utilizado para avaliar os efeitos lineares e quadráticos das variáveis independentes em estudo. Enquanto os efeitos lineares refletem a tendência linear das respostas em relação à influência das próprias variáveis, os efeitos quadráticos estão relacionados a não linearidade. Por isso, uma compreensão detalhada dos efeitos lineares e quadráticos é importante para determinar os ajustes necessários nas variáveis independentes, levando a otimização do processo e minimizando custos desnecessários de materiais (Fernandes et al., 2024).

A variável idade do inóculo (3) foi a única que não apresentou resposta significativa ( $p=5\%$ ) na produção das proteases coagulantes quando *A. flavo-furcatis* DPUA 1461. O tempo de fermentação no estado sólido, nas condições experimentais apresentou influência negativa na atividade de protease (Figura 2), isto significa que, quanto menor o tempo de fermentação maior o valor da atividade de protease. Assim foi observado que aos cinco dias de fermentação as proteases apresentaram atividade superior àquelas produzidas no final do bioprocesso, demonstrando que a produção destes metabólitos provavelmente está relacionada à fase do crescimento do fungo (fase log ou de crescimento exponencial) classificada como trofofase, nesta fase o crescimento é acelerado e a produção de metabólitos é constante para a produção da energia necessária ao crescimento do microrganismo (Teixeira et al., 2011).

Figura 2  
Influência das diferentes variáveis: (1) concentração do inóculo (%), (2) tempo de fermentação (dias) e (3) idade do inóculo (dias) na razão coagulantes das enzimas proteolíticas produzidas por *A. flavo-furcatis* DPUA 1461



A concentração do inóculo também foi outra variável que apresentou resposta significativa para atividade de protease, pois a maior concentração de inóculo promoveu maior atividade das enzimas proteolíticas, essa resposta pode estar relacionada com a viabilidade e o número de células utilizadas em cada uma das diferentes concentrações.

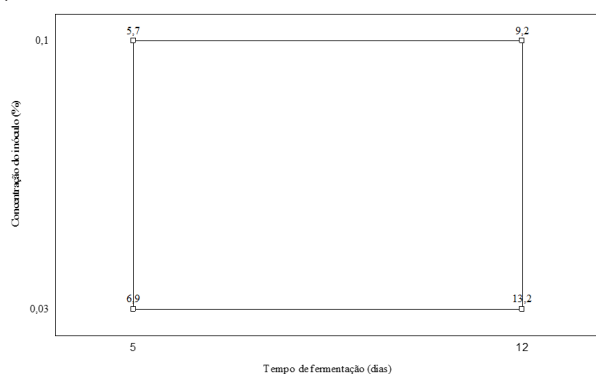
Prasad e Raju (2013) citaram que o tamanho do inóculo é um dos fatores que mais influenciam no metabolismo dos microrganismos, juntamente com pH e teor de umidade de substrato, temperatura, concentração e volume do inóculo. A quantidade de inóculo impacta diretamente na produção excessiva ou insuficiente de biomassa e de metabólitos, devido ao consumo dos nutrientes disponíveis. Este é um dado interessante para o uso do micro-organismo em fermentação no estado sólido em escala industrial.

Em relação à razão coagulante observou-se que foram significativas as seguintes variáveis: (2) tempo de fermentação (dias); (1) concentração do inóculo e a interação entre as duas variáveis (2x1) (Figura 3). A variável independente, tempo de fermentação influenciou positivamente na atividade coagulante indicando que enzimas proteolíticas produzidas na fermentação durante 12 dias são mais específicas para clivar as ligações peptídicas da caseína do leite bovino, resultando em valor de razão coagulante mais alto.

A variável concentração do inóculo também influenciou na resposta razão coagulante, no entanto, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou as menores concentrações do inóculo (Figura 3). Este resultado pode estar associado com o processo de germinação do

esporo que está regulada por estímulos ambientais, pelas propriedades genéticas, fisiológicas e bioquímicas do próprio microrganismo (Sephton-Clark & Voelz, 2018). A interação entre as variáveis 1x2 também foi significativa, a maior atividade de razão coagulante foi observada na menor concentração de inóculo e no menor tempo de fermentação.

Figura 3  
Interação das variáveis: (1) concentração do inóculo (%) e (2) tempo de fermentação (dias) na razão coagulante das enzimas proteolíticas produzidas por *A. flavo-furcatis* DPUA1461

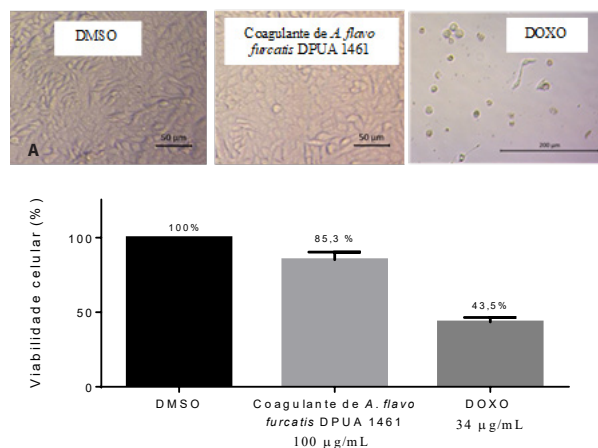


#### Toxicidade do coagulante

Os extratos proteolíticos avaliados não expressaram toxicidade, nas concentrações testadas, de acordo com a classificação descrita por Teixeira et al. (2011). Bioensaios frente à *Artemia salina*, não são de aplicação exclusiva quando se pretende biomonitorar riscos à saúde do homem e de outros animais superiores. Ainda assim, os testes utilizando espécies de *Artemia* comprovam a vasta aplicabilidade e a importância na predição de efeitos tóxicos ao meio ambiente e/ou ao homem (Silva et al., 2015).

O coagulante de *A. flavo furcatis* DPUA 1461 obtido no experimento 8 também não demonstrou toxicidade contra fibroblastos humanos (MRC5) (Figura 4). Estes resultados indicam que o coagulante de *A. flavo furcatis* é seguro para uso industrial e pode ser utilizado para produção de queijos. Barakat e Gohar (2012) verificaram baixo efeito tóxico (LC50 = 1,500 µg/L) do extrato de *A. terreus* var. *africanus* contra *A. salina*, enquanto Gniadek et al. (2017) não verificaram citotoxicidade em extratos de *A. niger*.

Figura 4  
Viabilidade celular de fibroblastos humanos (MRC5) tratados com coagulante de *A. flavo furcatis* DPUA 1461. A – Imagens das células MRC5 após 72h de tratamento com as substâncias; B – Porcentual de viabilidade das células MRC5 após 72 horas de tratamento com as substâncias. DMSO – Dimetilsulfóxido; DOXO – Doxorubicina



De acordo com Alecrim et al. (2017), os testes citotóxicos *in vitro* são fundamentais para identificar substâncias produzidas por fungos que possam representar riscos a saúde humana. Assim, *A. flavo furcatis* DPUA 1461 é uma espécie segura cujas enzimas apresentam grande potencial na indústria alimentícia.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que, a fermentação em estado sólido utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato favorece síntese de coagulantes atóxicos por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1461. Ainda foi observado que os parâmetros biológicos e físicos são variáveis que influenciam na síntese das enzimas investigadas. Coagulantes dessa linhagem de *Aspergillus* são promissores para uso na indústria de laticínios, em especial para a produção de queijos.

## REFERÊNCIAS

- Ahmed, S. A., Gogal, R. M., & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170, 211-224. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)

- Alecrim, M. M., Martim, S. R., Cordeiro, S. B., & Teixeira, M. F. S. (2017). *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 11(7), 312-318. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8400>
- Alecrim, M. M., Palheta, R. A., Teixeira, M. F. S., & Oliveira, I. M. A. (2015). Milk clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), 151-157. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12677>
- Al-Jammas, H. A.-A., Al-Fathi, H., Al-Khalaf, W., & Taifor, A. (2016). Study the influence of nitrogen on rennin production by fungi *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 3(5), 193-200. <https://doi.org/10.21472/bjbs.030517>
- Al-Jammas, H. A., Al Fathi, H., & Alkhalaf, W. (2018). Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 213-216. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.004>
- Bakr, A., Ibrahim, O., El-Ghandour, A. E., & El-Deeb, N. (2022). Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Edible Mushroom (*Pleurotus florida*). *Letters Applied NanoBioscience*, 11(2), 3362-3373. <https://doi.org/10.33263/LIANBS112.33623373>
- Barakat, K. M., & Gohar, Y. M. (2012). Antimicrobial agents produced by marine *Aspergillus terreus* var. *africanus* against some virulent fish pathogens. *Indian journal of microbiology*, 52, 366-372. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0255-1>
- Barbosa, E. E. P., Pimenta, L., Brito, A. K. P., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2020). Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases / Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. *Brazilian Journal of Development*, 6(11), 92475-92485. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-598>
- Baskar, G., Sneha, D. V., Merlin, S. B., & Vidhula, J. A. (2017). Optimization of microbial milk clotting enzyme production by *Aspergillus candidus* MTCC1989 using statistical method. *International Journal of Industrial Engineering*, 1(5), 171-177.
- Batista, S. C. P., Prado, F. B., Brito, A. K. P., Coelho, M. P. S. L. V., Castillo, T. A., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2021). Residual biomass from Amazon's horticultural residues processing for mycelial growth and production of proteases by an edible mushroom species. *Research, Society and Development*, 10(3), e35310313393. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13393>
- Benlounissi, A., Mechakra-Maza, A., Blum, L. J., & Marquette, C. A. (2014). Identification and characterization of milk-clotting proteases produced by two species of mold. *African Journal of Biotechnology*, 13(11), 1275-1280. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13162>
- Bensmail, S., Mechakra, A., & Fouzouane-Naimi, F. (2015). Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* ffb1 in solid-state fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(5), 467-472. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.5.467-472>
- Brito, A. K. P., Pimenta, L., Barbosa, E. E. P., Batista, S. C. P., Martim, S. R., Teixeira, M. F. S. (2024). Crescimento de cogumelo ostra em resíduo lignocelulósico da Amazônia: caracterização de biomassa em pó para fortificação de produto alimentício. *Revista Thema*, 23(2), 621-633. <https://doi.org/10.15536/thema.V23.2024.621-633.3606>
- Boukhalfa-Lezzar, H., Leghlimi, H., Copinet, E., Duchiron, F., & Mechakra-Maza, A. (2014). Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. *International Journal of Advanced Research*, 2(11), 338-346.
- Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.002>
- Chinmayee, C. V., Vidya, C., Rani, A. J., & Singh, S. A. (2019). Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(9), 858-867. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630647>
- Fernandes, L. M. G., Carvalho-Silva, J., Ferreira-Santos, P., Porto, A. L. F., Converti, A., Cunha, M. N. C., Porto, T. S. (2024). Valorization of agro-industrial residues using *Aspergillus heteromorphus* URM0269 for protease production: Characterization and purification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 273(2), 133199. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133199>
- Gniadek, A., Krzysciak, P., Twaruzek, M., & Macura, A. (2017). Occurrence of fungi and cytotoxicity of the species: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* isolated from the air of hospital wards. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 30(2), 231-239. [10.13075/ijomh.1896.00841](https://doi.org/10.13075/ijomh.1896.00841)
- 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*, 1-115.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., & Melo, N. T. de. (2002). *Tratado de micologia médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier.
- Leighton, T. J., Doi, R. H., Warren, R. A. J., & Kelln, R. A. (1973). The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76(1), 103-22. [10.1016/0022-2836\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90083-1)
- Mamo, J., Martin, K., Fernandez-Lahore, H. M., & Assefa, F. (2020). Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 571-584. [10.1007/s42770-020-00243-y](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00243-y)
- Martim, S. R., Silva, L. S. C., Alecrim, M. M., Teixeira, L. S., & Teixeira, M. F. S. (2021). Milk-clotting proteases from *Pleurotus albidus*: an innovative alternative for the production of Minas frescal cheese. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 43(1), e57275. <https://doi.org/10.4025/actasciabiolsci.v43i1.57275>

- Martim, S. R., Silva, L. S. C., Souza, L. B., Carmo, E. J., Alecrim, M. M., Vasconcellos, M. C., Oliveira, I. M. A., & Teixeira, M. F. S. (2017). *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*, *11*(17), 660-667. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8520>
- Minitab. (2017). *Minitab statistical software*. Version 18.0. State College: Minitab LLC.
- Patil, P. M., Kulkarni, A. A., & Kininge, P. (2012). Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran. *International Journal of Scientific and Research Publications*, *2*(10).
- Prado, F. B., Batista, S. C. P., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2021). Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino / Feasibility of protease production by Aspergillaceae species and screening of coagulants from bovine milk. *Brazilian Journal of Development*, *7*(2), 16356-16373. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-317>
- Prasad, D. S. R., & Raju, K. J. (2013). Studies on the production of Neutral Protease by *Rhizopus oligosporus* NCIM 1215 using Lablab purpureus seed powder under solid state fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)*, *3*(4), 2772.
- Sambo, S., & Sambo, Z. G. (2023). Production of Soft Cheese from *Aspergillus tamarii* Enzyme and Sensory Perception. *Greener Trends in Food Science and Nutrition*, *3*(1), 1-6.
- Sephton-Clark, P. C. S., & Voelz, K. (2018). Spore germination of pathogenic filamentous fungi. *Advances in applied microbiology*. Academic Press, *102*, 117-157. <https://doi.org/10.1016/bs.aams.2017.10.002>
- Silva, E. M. F., Nascimento, R. B. C., Barreto, F. S., & Filho, M. O. M. (2015). Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, *36*(2), 277-283.
- Silva, R. R., Cabral, T. P. F., Rodrigues, A., & Cabral, H. (2003). Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(1):235-43. [10.1590/S1517-83822013000100034](https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100034)
- Souza, P. M., Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Filho, E. X. F., Perego, P., Converti, A., Magalhães, P. O., & Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, *109*(2), 1103-1110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055>
- Teixeira, M. F. S., Silva, T. A., Palheta, R. A., Carneiro, A. L. B., & Atayde, H. M. (2011). *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*. (1a ed.). Manaus: EDUA-Editora da Universidade Federal do Amazonas, 255.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Applied microbiology and biotechnology*, *85*(6), 1849-59. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2197-z>