

# FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DE FARINHA DA LARVA DA MOSCA SOLDADO-NEGRA (*Hermetia illucens*) UTILIZANDO *Aspergillus tubingensis*: UM ESTUDO SOBRE A PRODUÇÃO DE ENZIMAS, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E DIGESTIBILIDADE DOS PRODUTOS FERMENTADOS

**Palavras-Chave:** proteína de inseto, fermentação semissólida, enzimas

**Autores(as):**

Cecília Candido Rodrigues de Souza, FEA – UNICAMP, Yuri Matheus Silva Amaral, FEA – UNICAMP, Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador), FEA – UNICAMP

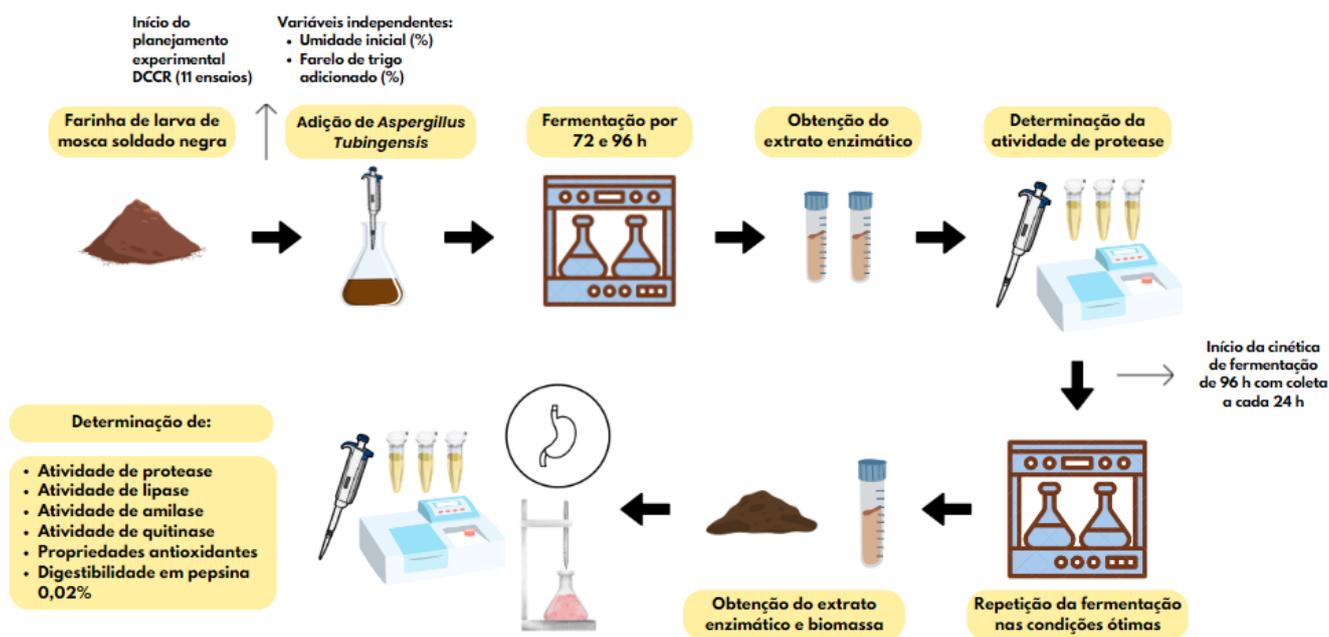
## INTRODUÇÃO:

Projeções indicam que a população mundial alcançará 9,7 bilhões de pessoas em 2050, com a perspectiva de, em 2030, 600 milhões de pessoas estarem cronicamente desnutridas, fazendo-se necessário o crescimento na demanda por fontes alternativas de alimentos (SHARMA et al., 2024; FAO et al., 2023). Outra preocupação surge frente à crise climática, já que a indústria de alimentos é responsável pela emissão de um terço dos gases de efeito estufa, além do uso de uma grande quantidade de recursos naturais (CRIPPA et al., 2021). Dessa forma, a entomofagia, prática de consumo de insetos, se apresenta como uma fonte alternativa de alto potencial, pois os insetos são ricos em proteínas e lipídeos e sua produção resulta em um menor impacto ambiental (Nitride et al., 2023).

A larva da mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) se destaca por ser um inseto comestível com alta eficiência produtiva industrialmente e é capaz de converter compostos orgânicos de baixo valor agregado, como resíduos alimentares, em biomassas proteicas e ricas em lipídeos (SHARMA et al., 2024). Porém, o consumo de insetos ainda possui barreiras culturais, e estudos mostram que ao torná-los menos visíveis ou indistinguíveis em produtos, tem-se uma maior aceitação (PÉREZ-RODRIGUES, et al., 2023). A fermentação semissólida é um processo biotecnológico e de baixo custo, que ao utilizar fungos do gênero *Aspergillus*, resulta na produção de compostos bioativos e de biomassas com maior conteúdo proteico, além de uma série de biomoléculas com potencial tecnológico (MUÑOZ-SEIJAS et al., 2024). Dessa forma, ao utilizar a farinha de larva da mosca soldado-negra como substrato, além de descaracterizar o inseto, busca-se a melhoria dos aspectos funcionais dessa matéria prima.

## METODOLOGIA:

A farinha desengordurada de larvas da mosca soldado-negra foi fornecida pela empresa Agrin Criação e Comércio de Insetos (Avaré, São Paulo). A cepa de *Aspergillus tubingensis* LBA02, utilizada nos processos fermentativos, pertence à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Os efeitos dos parâmetros de cultivo foram investigados de acordo com o delineamento composto central rotacional (DCCR), em que as variáveis independentes umidade inicial e quantidade de farelo de trigo adicionado foram avaliadas em diferentes níveis (total de 11 ensaios) (Tabela 1). A sequência de experimentos executados pode ser verificada na Figura 1.



**Figura 1.** Resumo gráfico da metodologia utilizada para fermentação de farinha de larvas da mosca soldado-negra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados para produção de proteases por *Aspergillus tubingensis* LBA02 utilizando as farinhas das larvas da mosca soldado-negra nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental estão dispostos da Tabela 1. O ponto 6 (45% de umidade inicial e 12,5% de adição de farelo de trigo) apresentou o maior valor de atividade de protease, atingindo 425,60 U/g em 96 h. No entanto, os pontos centrais (45% de umidade inicial e 12,5% de adição de farelo de trigo) se destacaram por apresentarem os maiores valores de atividade proteolítica em 72 h (307,75 U/g).

A análise dos dados de produtividade foi utilizada como base para definição da condição mais adequada para a produção de protease. Com isso, apesar de o ensaio 6 apresentar maior atividade proteolítica em 96 h, o ganho não justifica o acréscimo de 24 h de fermentação, uma vez que os valores de produtividade não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) para aqueles atingidos nos pontos centrais (ensaios 9 a 11) em 72 h (Tabela 1).

A umidade do substrato é frequentemente considerada a variável mais importante na fermentação semissólida, pois deve permitir a difusão de nutrientes e posterior absorção pelo micro-organismo. Contudo, umidade excessiva pode causar compactação e restrição da difusão de oxigênio (AMARAL e DE CASTRO, 2023). Benabda et al. (2019) observaram aumento na produção de protease por *Rhizopus oryzae* usando resíduos de pão com o aumento da umidade inicial, porém o aumento demasiado de umidade levou à redução na produção da enzima.

O substrato deve possuir uma razão entre carbono e nitrogênio (C/N) adequada. O balanço entre a fonte de carbono e nitrogênio é capaz de providenciar a energia necessária para crescimento microbiano e estimula a formação de conídios (DE CASTRO e SATO, 2014). Assim, a combinação da farinha da larva da mosca soldado-negra com alto teor de proteínas (~70%) e de farelo de trigo com alto teor de carboidratos (~65%) resulta em um balanço C/N mais equilibrado o que explica a produção de protease onde o farelo de trigo é adicionado em maiores quantidades (igual ou acima de 12,5%) em condições de umidade iguais ou acima de 45%.

**Tabela 1.** Matriz do DCCR usada para avaliação dos efeitos das variáveis independentes (umidade inicial e farelo de trigo adicionado) na produção de protease por *Aspergillus tubingensis* LBA02 usando farinha da larva de mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) como substrato em fermentação semissólida.

Ensaio	Variáveis independentes		Atividade de protease (U/g)		Produtividade (U/g/h)	
	Umidade inicial (%)	Farelo de trigo (%)	72h	96h	72h	96h
1	-1,00 (34,4)	-1,00 (7,2)	113,56 ± 5,18 <sup>e</sup>	331,65 ± 19,11 <sup>bcd</sup>	1,58 ± 0,07 <sup>i</sup>	3,45 ± 0,20 <sup>bcd</sup>
2	1,00 (55,6)	-1,00 (7,2)	282,08 ± 8,34 <sup>abc</sup>	331,10 ± 23,11 <sup>bcd</sup>	3,92 ± 0,12 <sup>ab</sup>	3,45 ± 0,20 <sup>bcd</sup>
3	-1,00 (34,4)	1,00 (17,8)	197,9 ± 15,8 <sup>d</sup>	286,80 ± 30,43 <sup>cde</sup>	2,75 ± 0,22 <sup>efg</sup>	2,99 ± 0,32 <sup>cdef</sup>
4	1,00 (55,6)	1,00 (17,8)	167,7 ± 9,49 <sup>d</sup>	163,97 ± 21,91 <sup>f</sup>	2,33 ± 0,13 <sup>fgh</sup>	1,71 ± 0,23 <sup>hi</sup>
5	-1,41 (30,0)	0,00 (12,5)	153,8 ± 4,26 <sup>de</sup>	225,00 ± 19,80 <sup>ef</sup>	2,14 ± 0,06 <sup>ghi</sup>	2,34 ± 0,17 <sup>efgh</sup>
6	1,41 (60,0)	0,00 (12,5)	250,71 ± 22,67 <sup>c</sup>	425,60 ± 40,19 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,31 <sup>bcd</sup>	4,43 ± 0,42 <sup>a</sup>
7	0,00 (45,0)	-1,41 (5,0)	175,99 ± 5,9 <sup>d</sup>	376,09 ± 31,15 <sup>ab</sup>	2,44 ± 0,08 <sup>efg</sup>	3,92 ± 0,32 <sup>ab</sup>
8	0,00 (45,0)	1,41 (20,0)	259,99 ± 4,25 <sup>bc</sup>	238,97 ± 15,41 <sup>e</sup>	3,61 ± 0,06 <sup>bc</sup>	2,49 ± 0,16 <sup>efg</sup>
9	0,00 (45,0)	0,00 (12,5)	313,83 ± 20,66 <sup>a</sup>	274,25 ± 7,38 <sup>de</sup>	4,36 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,08 <sup>def</sup>
10	0,00 (45,0)	0,00 (12,5)	312,22 ± 21,43 <sup>a</sup>	342,15 ± 14,76 <sup>bc</sup>	4,34 ± 0,30 <sup>a</sup>	3,56 ± 0,15 <sup>bc</sup>
11	0,00 (45,0)	0,00 (12,5)	297,21 ± 26,69 <sup>ab</sup>	293,01 ± 9,41 <sup>cde</sup>	4,13 ± 0,27 <sup>ab</sup>	3,05 ± 0,10 <sup>cde</sup>

\*Os resultados são apresentados como a média (n = 3) ± desvio padrão e, para a atividade de protease resultados seguidos por letras diferentes na mesma coluna, indicam a diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Para a produtividade o teste de Tukey foi realizado entre todos os resultados.

Resultados similares foram encontrados por Amaral e De Castro (2023) em processo fermentativo semissólido de vísceras de frango por *Aspergillus oryzae* com 40% de umidade inicial, onde foi reportada produção de proteases de 428,22 U/g após 72 h de fermentação.

Uma cinética de fermentação de 96 h foi realizada nas condições do ponto central para avaliação do efeito do tempo na produção de enzimas, moléculas com atividade antioxidante e na digestibilidade da biomassa (Tabela 3). Não foi identificada atividade enzimática nas primeiras 24 h da cinética de fermentação, o que é justificado pelo tempo de adaptação do micro-organismo e início da produção enzimática (SATTAR et al. 2019). A produção de enzimas apresentou comportamento similar para todas as classes quantificadas, atingindo produção máxima de enzimas com 72 h de fermentação e alcançando valores de 347,06, 46,11, 0,14 e 110,14 U/g para produção de protease, lipase, quitinase e  $\alpha$ -amilase, respectivamente.

A produção de protease foi crescente até 72 h e apresentou queda em 96 h. A redução de atividade proteolítica ao longo do tempo na fermentação utilizando *Aspergillus niger* foi observada por Colla et al. (2023) e Sattar et al. (2019). Causas possíveis são o esgotamento de nutrientes no meio, alterações de pH e o aumento da temperatura do meio devido ao processo de fermentação (SATTAR et al., 2019), bem como a dinâmica da própria enzima como substrato, em que reações de autodigestão podem alterar a atividade proteolítica (FERRALL-FAIRBANKS, KIESLICH E PLATT, 2020).

A produção de lipase iniciou-se a partir de 48 h, atingindo produção máxima em 72 h (46,11 U/g). Resultados próximos foram obtidos por uma cepa de *Aspergillus sp.* utilizando como substrato farelo de trigo, farelo de soja e farelo de soja combinado com bagaço de cana-de-açúcar (FLEURI et al., 2014). Fungos do gênero *Aspergillus* degradam polissacarídeos eficientemente por meio de enzimas amilolíticas, convertendo os açúcares resultantes em energia ou biomoléculas. A expressão de genes deve permitir a adaptação à fonte de carbono mais eficiente para o crescimento do fungo (MÄKELÄ et al., 2018). O farelo de trigo é um excelente substrato na fermentação semissólida para produção de amilase devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, nutrientes e capacidade tamponante (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007). Dessa forma, a produção de  $\alpha$ -amilase e baixa

atividade de quitinase indicam que o farelo de trigo foi a principal fonte de carbono e não houve utilização de quitina (presente na farinha de insetos) como fonte de carbono.

Os maiores valores obtidos para a atividade antioxidante em cada método ocorreram em 96 h: 1092,34  $\mu\text{mol TEq/g}$  para ABTS, 450,43  $\mu\text{mol TEq/g}$  para DPPH e 599,35  $\mu\text{mol TEq/g}$  para FRAP (Tabela 3). A capacidade antioxidante do extrato fermentado tem como origem, provavelmente, a formação de peptídeos bioativos, dado o alto teor de proteínas do substrato e a alta produção de proteases, além de uma série de metabólitos secundários que podem ser produzidos com atividade antioxidante (AMARAL e DE CASTRO, 2023). Sabe-se que a composição nutricional da larva da mosca soldado-negra é altamente afetada pelo substrato oferecido para consumo e, devido à sua capacidade de conversão, a presença de compostos com atividade antioxidante de fontes diversas pode ser incorporada ao inseto (OH et al., 2023). Desse modo, os altos valores de atividade antioxidante no tempo zero da cinética de fermentação podem estar relacionados à presença natural de compostos com esta propriedade na farinha de insetos.

Em relação à digestibilidade da biomassa, os resultados demonstraram uma pequena redução com o avanço do tempo de fermentação. Essa redução pode estar relacionada à digestibilidade da fração proteica resultante do crescimento microbiano, que aparentemente é menor que a da farinha das larvas. Sendo assim, ensaios de digestibilidade devem ser realizados com todo o material fermentado, para avaliar o real comportamento da digestibilidade.

**Tabela 3.** Cinética de fermentação da farinha da larva da mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) por *Aspergillus tubingensis* e resultados obtidos para atividades enzimáticas de protease, lipase, quitinase e amilase, atividade antioxidante mensurada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP e digestibilidade em pepsina 0,02%.

Ensaio (h)	Atv. de protease (U/g)	Atv. de lipase (U/g)	Atv. de quitinase (U/g)	Atv. de $\alpha$ -amilase (U/g)
0	0,82 $\pm$ 0,27 <sup>d</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	1,98 $\pm$ 0,64 <sup>d</sup>
24	0,76 $\pm$ 0,13 <sup>d</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	3,47 $\pm$ 1,10 <sup>d</sup>
48	137,04 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	24,70 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	0,11 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	55,79 $\pm$ 2,06 <sup>c</sup>
72	347,06 $\pm$ 21,94 <sup>a</sup>	46,11 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	110,14 $\pm$ 4,04 <sup>a</sup>
96	278,72 $\pm$ 14,18 <sup>b</sup>	44,19 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	83,48 $\pm$ 2,08 <sup>b</sup>
	ABTS ( $\mu\text{mol TEq/g}$ ) <sup>1</sup>	DPPH ( $\mu\text{mol TEq/g}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol TEq/g}$ )	Digestibilidade (%)
0	1059,27 $\pm$ 27,01 <sup>a</sup>	45,29 $\pm$ 1,61 <sup>c</sup>	202,12 $\pm$ 11,16 <sup>c</sup>	74,94 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>
24	792,16 $\pm$ 13,36 <sup>c</sup>	23,21 $\pm$ 8,04 <sup>c</sup>	183,81 $\pm$ 9,93 <sup>c</sup>	72,28 $\pm$ 1,26 <sup>ab</sup>
48	765,06 $\pm$ 10,21 <sup>c</sup>	222,84 $\pm$ 5,46 <sup>b</sup>	265,8 $\pm$ 21,57 <sup>b</sup>	68,59 $\pm$ 1,57 <sup>c</sup>
72	854,90 $\pm$ 24,01 <sup>b</sup>	232,68 $\pm$ 12,29 <sup>b</sup>	577,88 $\pm$ 34,71 <sup>a</sup>	69,27 $\pm$ 0,00 <sup>bc</sup>
96	1092,34 $\pm$ 9,08 <sup>a</sup>	450,43 $\pm$ 26,90 <sup>a</sup>	599,35 $\pm$ 20,47 <sup>a</sup>	65,76 $\pm$ 1,63 <sup>c</sup>

\*Os resultados são apresentados como a média (n = 3)  $\pm$  desvio padrão e, quando seguidos por letras diferentes na mesma coluna, indicam a diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. <sup>1</sup>A unidade  $\mu\text{mol TEq/g}$  corresponde a  $\mu\text{mol}$  de Trolox Equivalentes por grama de proteína.

## CONCLUSÕES:

A farinha da larva da mosca soldado-negra mostrou-se um substrato adequado para produção de enzimas e compostos antioxidantes por *Aspergillus tubingensis* em fermentação semissólida. Meios de cultivo com 45% de umidade inicial e 12,5% de adição de farelo de trigo foram definidos como os mais adequados para a fermentação com base na produção de proteases. O estudo cinético mostrou que o tempo de fermentação de 72 h permitiu maior produção de enzimas hidrolíticas. Para a atividade antioxidante, os maiores resultados foram obtidos após 96 h.

## BIBLIOGRAFIA

SHARMA, B. YADAV, D. K. MALAKAR, S. SINGH, S. SHARMA, M. SURI, S. SRIDHAR, K. **Insect proteins – Production technologies, bio-functional, and food applications: A perspective**, Food Bioscience, Volume 61, 2024.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. **The state of food security and nutrition in the world 2023.: Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural-urban continuum**. Rome, FAO, 2023

CRIPPA, M., SOLAZZO, E., GUIZZAEDI, D. et al. **Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions**. Nat Food 2, 198–209, 2021

NITRIDE, C. D'AURIA, G. FERRANTI, A, P. **Environmental, Nutritional, and Cultural Sustainability of Novel Food Protein Sources**, Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach, 199-215, 2023.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, E. IBARRA-HERRERA, C, C. PÉREZ-CARRILLO, E. **Effect of incorporation of solid-state fermented edible insects *Tenebrio molitor* and *Sphenarium purpurascens* with *Aspergillus oryzae* in the elaboration of bread**, LWT, Volume 184, 2023.

MUÑOZ-SEIJAS, N. FERNANDES, H. OUTEIRIÑO, D. MORÁN-AGUILAR, M, G. DOMÍNGUEZ, J, M. SALGADO, J, M. **Potential use of frass from edible insect *Tenebrio molitor* for proteases production by solid-state fermentation**, Food and Bioproducts Processing, Volume 144, Pages 146-155, 2024.

AMARAL, Y, M, S. DE CASTRO, R, J, S. **Chicken viscera meal as substrate for the simultaneous production of antioxidant compounds and proteases by *Aspergillus oryzae***. Bioprocess and Biosystems Engineering, 46:1777–1790, 2023.

BENABDA, O. M'HIR, S. KASMI, M. MNIF, W. HAMDI, M. **Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation**, *Journal of Chemistry*, 2019, 3738181, 9 pages, 2019.

DE CASTRO, R, J, S. SATO, H, H. **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, Volume 3, Issue 3, Pages 20-25, 2014

COLLA, L, M. REINEHR, C, O. MANFREDINI, P, G. CAVANHI, V, A, F. COSTA, J, A, V. **Simultaneous production of proteases and antioxidant biopeptides by solid-state fermentation** Sustainable Food Technology, Volume 1, Issue 6, Pages 874-885, 2023.

SATTAR, H. BIBI, Z. KAMRAN, A. AMAN, A. QADER, S, A, U. **Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36**, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 21, 101256, 2019.

FERRALL-FAIRBANKS, M, C. KIESLICH, C, A. PLATT, M, O. **Reassessing enzyme kinetics: Considering protease-as-substrate interactions in proteolytic networks**, Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 117, No. 6, 2020.

FLEURI, L.F., NOVELLI, P.K., DELGADO, C.H.O., PIVETTA, M.R., PEREIRA, M.S., ARCURI, M.D.L.C. AND CAPOVILLE, B.L. **Biochemical characterisation and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates**. Int J Food Sci Technol, 49: 2585-2591, 2014.

MÄKELÄ, M.R., AGUILAR-PONTES, M.V., VAN ROSSEN-UFFINK, D. et al. **The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA**. Scientific Reports 8, 6655, 2018.

SIVARAMAKRISHNAN, S. GANGADHARAN, D. NAMPOOTHIRI, K. M. SOCCOL, C. R. P. ASHOK, P. **Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation**. JSIR, Vol. 66(08), 2007.

OH J, H. KARADENIZ, F. YANG, J. LEE, H. CHOI, M. JEON, S. PARK, G, KIM, J. PARK, K. KONG, C. **Antioxidant, anti-inflammatory, anti-adipogenesis activities and proximate composition of *Hermetia illucens* larvae reared on food waste enriched with different wastes**. JAST (Journal of Animal Science and Technology), 2023.