



POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FARINHAS DE INSETOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS COAGULANTES POR *Mucor subtilissimus* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF INSECT MEALS FOR THE PRODUCTION OF COAGULANT ENZYMES BY *Mucor subtilissimus* IN SUBMERGED FERMENTATION

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS HARINAS DE INSECTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS COAGULANTES POR *Mucor subtilissimus* EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Apresentação: Comunicação Oral

Laura Anjos Rodrigues¹; Kethylen Barbara Barbosa Cardoso²; Maria Eduarda Luiz Coelho de Miranda³; Júlio César dos Santos Nascimento⁴; Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/VIICIAGRO.0038>

RESUMO

A busca por coagulantes alternativos à quimosina de origem animal têm despertado crescente interesse devido à demanda por processos mais sustentáveis e economicamente viáveis na indústria de laticínios. Nesse contexto, fungos filamentosos destacam-se como produtores de enzimas de interesse biotecnológico, enquanto farinhas de insetos surgem como substratos alternativos promissores em processos fermentativos. Dessa forma, o estudo teve como objetivo avaliar a atividade coagulante do leite expressa em Milk Clotting Units (MCU) de extratos produzidos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em fermentação submersa utilizando farinhas de *Hermetia illucens*, *Shelfordella lateralis*, *Gryllus assimilis*, *Zophobas morio* e *Nauphoeta cinerea* como substrato, comparando os resultados com a quimosina comercial. A fermentação foi conduzida a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 96 horas, utilizando 1% de farinha de inseto como substrato. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de quantificação de proteínas (BCA), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A atividade coagulante foi avaliada pela adição de 100 µL de extrato enzimático a 1 mL de leite reconstituído a 10% (m/v), suplementado com CaCl₂ 0,01 M e ajustado para pH 6,5, sendo o tempo de

¹ Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, laura.anjos@upe.br

² Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, kethylen.barbarabc@upe.br

³ Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, dudaclmiranda.@gmail.com

⁴ Professor adjunto do Departamento de Zootecnia (UFRPE), Universidade Federal Rural de Pernambuco, julio.nascimento@ufrpe.br

⁵ Professor adjunto dos cursos de Saúde (UPE/Campus Santo Amaro), Universidade de Pernambuco, romero.brandao@upe.br

coagulação utilizado para cálculo das MCU. Os extratos apresentaram variação na concentração de proteínas totais, entre 0,600 e 1,360 mg/mL, enquanto a quimosina comercial apresentou 1,443 mg/mL. Entretanto, não foi observada relação direta entre concentração proteica total e atividade coagulante. O extrato obtido com *Nauphoeta cinerea* apresentou o melhor desempenho, com 58,25 MCU, valor aproximadamente 414% superior ao da quimosina comercial (11,33 MCU), enquanto os demais substratos também apresentaram desempenho superior ao controle em diferentes níveis. Os resultados indicam que a eficiência coagulante está relacionada à presença de proteases específicas e não à concentração total de proteínas no extrato bruto. Além disso, evidenciam a influência do substrato sobre o perfil funcional das enzimas produzidas, reforçando o potencial biotecnológico das farinhas de insetos associadas à fermentação submersa por *Mucor subtilissimus* como alternativa promissora para produção de coagulantes microbianos com aplicação na indústria de laticínios.

Palavras-Chave: enzimas coagulantes, fermentação submersa, farinhas de insetos, *Mucor subtilissimus*, biotecnologia.

RESUMEN

La busca de coagulantes alternativos a la quimosina de origen animal ha despertado un interés creciente debido a la demanda de procesos más sostenibles y económicamente viables en la industria láctea. En este contexto, los hongos filamentosos destacan como productores de enzimas de interés biotecnológico, mientras que las harinas de insectos se perfilan como sustratos alternativos prometedores en los procesos fermentativos. De este modo, el estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad coagulante de la leche, expresada en Milk Clotting Units (MCU), de los extractos producidos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 en fermentación sumergida utilizando harinas de *Hermetia illucens*, *Shelfordella lateralis*, *Gryllus assimilis*, *Zophobas morio* y *Nauphoeta cinerea* como sustrato, comparando los resultados con la quimosina comercial. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C con agitación a 150 rpm durante 96 horas, utilizando un 1 % de harina de insectos como sustrato. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método colorimétrico de cuantificación de proteínas (BCA), utilizando albúmina sérica bovina como patrón. La actividad coagulante se evaluó mediante la adición de 100 µL de extracto enzimático a 1 mL de leche reconstituida al 10 % (m/v), suplementada con CaCl₂ 0,01 M y ajustada a un pH de 6,5, utilizándose el tiempo de coagulación para el cálculo de la MCU. Los extractos presentaron una variación en la concentración de proteínas totales, entre 0,600 y 1,360 mg/mL, mientras que la quimosina comercial presentó 1,443 mg/mL. No obstante, no se observó una relación directa entre la concentración proteica total y la actividad coagulante. El extracto

obtenido a partir de *Nauphoeta cinerea* presentó el mejor rendimiento, con 58,25 MCU, un valor aproximadamente un 414 % superior al de la quimosina comercial (11,33 MCU), mientras que los demás sustratos también presentaron un rendimiento superior al del control en distintos grados. Los resultados indican que la eficiencia coagulante está relacionada con la presencia de proteasas específicas y no con la concentración total de proteínas en el extracto bruto. Además, evidencian la influencia del sustrato sobre el perfil funcional de las enzimas producidas, lo que refuerza el potencial biotecnológico de las harinas de insectos asociadas a la fermentación sumergida por *Mucor subtilissimus* como alternativa prometedora para la producción de coagulantes microbianos con aplicación en la industria láctea.

Palabras clave: enzimas coagulantes, fermentación sumergida, harinas de insectos, *Mucor subtilissimus*, biotecnología.

ABSTRACT

The search for alternative coagulants to animal-derived chymosin has sparked growing interest due to the demand for more sustainable and economically viable processes in the dairy industry. In this context, filamentous fungi stand out as producers of enzymes of biotechnological interest, while insect meal is emerging as a promising alternative substrate in fermentation processes. Thus, the study aimed to evaluate the milk-clotting activity, expressed in Milk Clotting Units (MCU), of extracts produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in submerged fermentation using meal from *Hermetia illucens*, *Shelfordella lateralis*, *Gryllus assimilis*, *Zophobas morio*, and *Nauphoeta cinerea* as substrates, comparing the results with commercial chymosin. Fermentation was conducted at 30 °C under agitation at 150 rpm for 96 hours, using 1% insect meal as the substrate. Total protein concentration was determined using the colorimetric protein quantification method (BCA), with bovine serum albumin as the control standard. Coagulation activity was assessed by adding 100 µL of enzymatic extract to 1 mL of 10% (w/v) reconstituted milk, supplemented with 0.01 M CaCl₂ and adjusted to pH 6.5, with the coagulation time used to calculate the MCU. The extracts varied in total protein concentration between 0.600 and 1.360 mg/mL, while commercial chymosin had 1.443 mg/mL. However, no direct relationship was observed between total protein concentration and coagulant activity. The extract obtained from *Nauphoeta cinerea* showed the best performance, with 58.25 MCU, a value approximately 414% higher than that of commercial chymosin (11.33 MCU), while the other substrates also performed better than the control to varying degrees. The results indicate that coagulation efficiency is related to the presence of specific proteases and not to the total protein concentration in the crude extract. Furthermore, they highlight the influence of the substrate on the functional profile of the enzymes produced,

reinforcing the biotechnological potential of insect flours associated with submerged fermentation by *Mucor subtilissimus* as a promising alternative for the production of microbial coagulants for application in the dairy industry.

Keywords: coagulant enzymes, submerged fermentation, insect meal, *Mucor subtilissimus*, biotechnology.

INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios representa um dos segmentos mais importantes do setor alimentício, sendo a produção de queijos uma atividade de grande relevância econômica e tecnológica em diversos países. Nesse contexto, enzimas coagulantes desempenham papel fundamental ao promoverem a coagulação do leite, etapa essencial para a formação da coalhada e posterior obtenção dos derivados lácteos. Além de participarem diretamente desse processo, essas enzimas influenciam características importantes do produto final, como textura, rendimento, sabor e qualidade tecnológica, tornando-se componentes indispensáveis para a cadeia produtiva de queijos e outros produtos fermentados (Wiśniewski *et al.*, 2025; Khan; Selamoglu, 2020).

Tradicionalmente, a enzima utilizada é a quimosina, obtida do estômago de bezerros lactentes, é o coagulante mais utilizado há décadas devido à sua elevada eficiência e especificidade de ação. Entretanto, o crescimento da demanda mundial por produtos lácteos, associado a questões éticas relacionadas ao uso de enzimas de origem animal, além de custos de produção elevados e limitações de oferta, tem impulsionado a busca por fontes alternativas de enzimas coagulantes. Nesse cenário, os coagulantes microbianos têm recebido atenção crescente por apresentarem potencial para substituir parcial ou totalmente o coalho tradicional, contribuindo para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e economicamente viáveis (Kumar *et al.*, 2010; Stocco *et al.*, 2025).

Entre os microrganismos de interesse biotecnológico, os fungos filamentosos destacam-se como importantes produtores de enzimas extracelulares devido ao seu rápido crescimento, facilidade de cultivo, ampla distribuição no ambiente e capacidade de secreção enzimática. Além disso, esses organismos apresentam grande versatilidade metabólica, possibilitando a obtenção de diferentes metabólitos de interesse industrial por meio de processos fermentativos (Mascarin *et al.*, 2025). A fermentação submersa tem sido amplamente empregada para a produção de enzimas fúngicas por permitir maior controle das condições operacionais, como temperatura, pH, aeração e agitação, favorecendo o crescimento microbiano e a síntese de compostos bioativos em escala industrial (Nascimento *et al.*, 2022).

Paralelamente, o uso de substratos alternativos tem se consolidado como uma estratégia

promissora para reduzir custos e agregar valor a biomateriais de elevado potencial nutricional. Nesse contexto, as farinhas de insetos vêm despertando interesse devido ao seu elevado teor de proteínas, lipídios, minerais e compostos estruturais, além de apresentarem características associadas à sustentabilidade ambiental. Estudos recentes demonstram que esses materiais podem ser empregados em diferentes aplicações alimentícias e biotecnológicas sem comprometer parâmetros nutricionais e microbiológicos, evidenciando seu potencial como matéria-prima para processos fermentativos (Almeida; Rijo; Rosado, 2020; Xu *et al.*, 2025). Apesar do crescente interesse por insetos como fonte de nutrientes e ingredientes funcionais, ainda são escassos os estudos que avaliam sua aplicação como substrato para produção de enzimas coagulantes por fungos filamentosos.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade coagulante do leite expressa em Milk Clotting Units (MCU) de extratos produzidos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em fermentação submersa utilizando farinhas de inseto como substrato, comparando os resultados com a quimosina comercial. A investigação busca contribuir para o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas sustentáveis para a obtenção de coagulantes microbianos com potencial aplicação na indústria, uma vez que se espera que diferentes composições de substrato resultem em variações significativas no perfil e na eficiência das proteases produzidas por *Mucor subtilissimus*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Coagulação do Leite e Estabilidade das Micelas de Caseína

A coagulação do leite é um fenômeno físico-químico decorrente de alterações na estrutura coloidal das micelas de caseína, podendo ocorrer por acidificação ou por ação enzimática. Na coagulação enzimática, o processo ocorre em duas etapas principais: uma fase primária, caracterizada pela hidrólise específica da κ -caseína após a ação de proteases coagulantes, e uma fase secundária, na qual ocorre a desestabilização do sistema micelar e a agregação progressiva das partículas proteicas, culminando na formação da coalhada (Vidal *et al.*, 2021). A κ -caseína exerce função essencial na estabilidade das micelas de caseína, atuando como uma camada superficial que impede sua agregação na presença de íons cálcio (Creamer *et al.*, 1998).

A clivagem enzimática dessa fração reduz a repulsão estérica entre as micelas, favorecendo sua aproximação e agregação em uma rede tridimensional de gel, caracterizando a coagulação visível (McMahon; Brown; Ernstrom, 1984). O cálcio também desempenha papel determinante nesse sistema, estando presente no leite em sua forma iônica, complexada com fosfato ou citrato, e ligada às caseínas. As frações solúveis participam do equilíbrio iônico do sistema, enquanto a

fração associada às proteínas influencia diretamente a estabilidade micelar. A adição de cálcio é prática comum na indústria de laticínios, especialmente em leites pasteurizados, uma vez que o tratamento térmico reduz a disponibilidade de cálcio iônico e compromete a eficiência da coagulação enzimática (Benedet, 1986).

Enzimas Coagulantes e Quimosina como Padrão Industrial

As enzimas coagulantes utilizadas na indústria de laticínios pertencem majoritariamente ao grupo das aspartil-proteases, caracterizadas por sua atividade em meio ácido e por mecanismos catalíticos envolvendo resíduos de ácido aspártico no sítio ativo (Dela Justina; Dela Justina; Skoronski, 2019). Essas enzimas apresentam duas atividades principais: a atividade coagulante, associada à clivagem específica da κ -caseína, e a atividade proteolítica inespecífica, responsável pela degradação geral de proteínas do leite. A eficiência de um coagulante é determinada pelo equilíbrio entre essas duas atividades, sendo desejável uma alta relação entre atividade coagulante e proteolítica, de forma a garantir formação adequada da coalhada sem produção excessiva de peptídeos indesejáveis.

A quimosina é considerada o padrão industrial devido à sua elevada especificidade pela κ -caseína e baixa atividade proteolítica inespecífica, resultando em alto rendimento e qualidade sensorial dos produtos lácteos (Shammet; Brown; McMahon, 1992). Durante o processo de coagulação, a quimosina promove a clivagem limitada da κ -caseína, liberando o glicomacropéptido e formando a para- κ -caseína, que permanece associada às micelas de caseína. Essa alteração estrutural desencadeia a agregação micelar e a formação do coágulo. Embora originalmente obtida a partir do estômago de bezerros, questões éticas, limitações de oferta e a crescente demanda da indústria impulsionaram o desenvolvimento de quimosinas produzidas por fermentação microbiana. Atualmente, quimosinas recombinantes expressas em microrganismos como *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* var. *awamori* e *Escherichia coli* são amplamente empregadas na fabricação de queijos, apresentando desempenho tecnológico comparável ou superior ao coalho tradicional, além de maior padronização, pureza e disponibilidade comercial (Kumar *et al.*, 2010; Luerce *et al.*, 2015). Estima-se que mais de 80% da produção mundial de queijos utilize quimosina obtida por tecnologia recombinante, consolidando essa estratégia como uma das aplicações biotecnológicas mais bem-sucedidas da indústria alimentícia (Luerce *et al.*, 2015).

Fungos Filamentosos e Fermentação Submersa como Sistema Biotecnológico

Fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como importantes produtores de enzimas

extracelulares de interesse industrial, devido ao seu rápido crescimento, elevada adaptabilidade ambiental e capacidade de secreção enzimática em meios de cultura (Naeem *et al.*, 2022). O gênero *Mucor* destaca-se por sua habilidade de produzir proteases com atividade coagulante, sendo frequentemente explorados em processos fermentativos voltados à biotecnologia de alimentos (Gomes *et al.*, 2020).

A fermentação submersa constitui uma estratégia eficiente para produção enzimática, pois permite controle rigoroso de parâmetros como temperatura, pH, aeração e composição do meio, favorecendo maior reprodutibilidade e escalabilidade industrial. Além disso, a expressão de enzimas em fungos filamentosos é fortemente regulada por mecanismos de indução e repressão metabólica, nos quais a disponibilidade de nutrientes no meio exerce influência direta sobre o perfil enzimático produzido (Sanchez; Demain, 2008).

Nesse contexto, a composição do substrato desempenha papel central na modulação da síntese de enzimas extracelulares, uma vez que diferentes fontes de carbono e nitrogênio podem ativar vias metabólicas específicas. Assim, o sistema fúngico responde de forma adaptativa ao ambiente fermentativo, alterando tanto a quantidade quanto a natureza das proteases produzidas, o que impacta diretamente sua aplicação biotecnológica.

Substratos Alternativos e Farinhas de Insetos como Indutores Metabólicos

A utilização de substratos alternativos em processos fermentativos tem sido amplamente investigada como estratégia para redução de custos e aumento da sustentabilidade biotecnológica. Nesse contexto, farinhas de insetos apresentam elevado potencial por sua composição rica em proteínas, lipídios, minerais e compostos estruturais como quitina, que podem atuar como indutores metabólicos em microrganismos filamentosos (Almeida; Rijo; Rosado, 2020). Estudos indicam que substratos ricos em compostos nitrogenados e estruturais podem modular significativamente o metabolismo de fungos, influenciando a produção de enzimas extracelulares com diferentes perfis funcionais (Zhgun, 2023).

Além disso, a utilização de biomassa de insetos como fonte de nutrientes em sistemas fermentativos tem sido associada a respostas metabólicas diferenciadas em microrganismos, favorecendo a produção de compostos bioativos de interesse industrial (Robles Jimenez *et al.*, 2024). Nesse cenário, farinhas de insetos como *Hermetia illucens* e outras espécies comestíveis têm sido apontadas como alternativas promissoras para aplicação em bioprocessos, devido à sua disponibilidade, valor nutricional e potencial de sustentabilidade (Xu *et al.*, 2025; Oh *et al.*, 2023; Marzan *et al.*, 2025). Assim, sua aplicação como substrato fermentativo representa uma abordagem inovadora para a produção de enzimas coagulantes microbianas com potencial de

aplicação industrial.

METODOLOGIA

Abate e Obtenção das Farinhas

Foram utilizadas as espécies *Zophobas morio* (tenébrio gigante), *Nauphoeta cinerea* (barata cinérea), *Shelfordella lateralis* (barata-real), *Gryllus assimilis* (grilo-preto) e *Hermetia illucens* (mosca-soldado-negra). Com exceção de *H. illucens*, todas as espécies foram provenientes do Setor de Entomocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DZ-UFRPE).

O abate dos artrópodes foi realizado no próprio departamento, utilizando exposição ao CO₂ para minimização de alterações proteicas. Em seguida, os insetos foram congelados a -5 °C, submetidos à fervura em água a 100 °C por 10 minutos e posteriormente desidratados em estufa com circulação de ar a 60 °C por 24 horas, obtendo-se as farinhas de cada espécie. A farinha de *H. illucens* foi adquirida de origem industrial (Buss Fly), com composição centesimal previamente determinada.

Microrganismo, Manutenção e Esporulação

O fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, isolado da Caatinga do Nordeste brasileiro e pertencente à Coleção de Culturas UCP da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), registrado no Patrimônio Genético Brasileiro sob nº AA30B0B, foi utilizado para produção de proteases. O microrganismo foi mantido em meio Ágar Batata Dextrose (BDA), sob óleo mineral. Para esporulação, foi inoculado em BDA e incubado em estufa BOD a 30 °C por 7 dias.

Produção Enzimática por Fermentação Submersa

A fermentação submersa foi conduzida em frascos Erlenmeyer de **250 mL**, contendo **100 mL de meio fermentativo composto por água destilada e 1% (m/v) de farinha de inseto**, utilizada como única fonte de nutrientes. A inoculação do fungo foi realizada por meio de discos de micélio obtidos a partir de culturas ativas em meio BDA, os quais foram transferidos diretamente para o meio líquido. Os cultivos foram incubados a **30 °C**, sob agitação de **150 rpm**, por **96 horas**.

Determinação da Concentração Proteica

A concentração de proteínas totais foi determinada em triplicata pelo método de Smith *et al.* (1985), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, na faixa de 0 a 1000 µg/mL.

Atividade Coagulante

Para o ensaio de atividade coagulante, o leite foi reconstituído a 10% (m/v), suplementado com CaCl_2 0,01 M e ajustado para pH 6,5. Os extratos enzimáticos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e mantidos em banho de gelo. Em seguida, 100 μL do extrato foram adicionados a 1 mL do substrato lácteo, com homogeneização imediata e início da cronometragem. Como controle positivo, foi utilizada quimosina comercial como enzima de referência para comparação da atividade coagulante nas condições experimentais adotadas. Os ensaios foram realizados utilizando os extratos enzimáticos brutos e a quimosina comercial em suas condições de uso, sem ajuste prévio da concentração proteica entre as preparações. O tempo de coagulação foi utilizado para o cálculo da atividade, expressa em Milk Clotting Units (MCU), conforme a equação::

$$MCU = \frac{2400 \times S}{T \times E}$$

Em que S corresponde ao volume do substrato, E ao volume da enzima e T ao tempo de coagulação em segundos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais dos extratos enzimáticos produzidos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 por fermentação submersa utilizando diferentes farinhas de insetos como substrato encontra-se apresentada na Tabela 1. Entre as amostras avaliadas, o extrato obtido com *Hermetia illucens* apresentou a maior concentração proteica ($1,360 \pm 0,008$ mg/mL). Os demais extratos apresentaram concentrações variando entre $0,600 \pm 0,013$ e $1,008 \pm 0,015$ mg/mL, evidenciando diferenças na produção de proteínas em função do substrato utilizado.

Tabela 01: Proteína total das amostras avaliadas

Substrato	Proteína total (mg/mL)
<i>Hermetia illucens</i>	$1,360 \pm 0,008$
<i>Shelfordella lateralis</i>	$1,008 \pm 0,015$
<i>Gryllus assimilis</i>	$0,600 \pm 0,013$
<i>Zophobas morio</i>	$0,780 \pm 0,015$
<i>Nauphoeta cinerea</i>	$0,724 \pm 0,021$

Fonte: Própria (2026).

Essas variações podem estar relacionadas às diferenças nutricionais existentes entre as

farinhas de insetos, especialmente quanto ao teor de proteínas, lipídios e compostos estruturais, que influenciam diretamente o metabolismo fúngico durante a fermentação submersa. Segundo Santana *et al.* (2024), insetos apresentam elevado valor nutricional e expressiva concentração proteica, entretanto a composição dessas proteínas pode variar consideravelmente entre espécies. Dessa forma, a disponibilidade de nutrientes específicos pode favorecer a síntese de diferentes conjuntos de enzimas extracelulares, resultando em perfis metabólicos distintos para cada substrato avaliado.

Entretanto, a análise conjunta da concentração proteica (Tabela 1) e da atividade coagulante (Tabela 2) indicou que não foi observada relação proporcional entre a concentração de proteínas totais presentes nos extratos e sua capacidade de coagular o leite. Embora *Hermetia illucens* tenha apresentado um dos maiores teores proteicos, sua atividade coagulante foi inferior à observada para os extratos produzidos com *Shelfordella lateralis*, *Gryllus assimilis*, *Zophobas morio* e *Nauphoeta cinerea*. Considerando que os ensaios foram realizados utilizando extratos enzimáticos brutos e a quimosina comercial em suas condições de uso, sem ajuste prévio da concentração proteica entre as preparações, a atividade específica (MCU/mg de proteína) foi utilizada como parâmetro complementar para avaliar a eficiência coagulante relativa dos extratos produzidos por *Mucor subtilissimus*.

A análise da atividade específica demonstrou que o extrato obtido com *Nauphoeta cinerea* apresentou o maior valor (80,46 MCU/mg de proteína), enquanto *Hermetia illucens* apresentou a menor atividade específica (7,35 MCU/mg de proteína). Esses resultados reforçam que a eficiência coagulante está relacionada principalmente à presença de proteases funcionalmente eficientes e com maior especificidade para as proteínas do leite, e não apenas à concentração total de proteínas presentes no extrato bruto.

Tabela 02: Atividade coagulante e atividade específica dos extratos enzimáticos produzidos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizando diferentes farinhas de insetos como substrato

Substrato	Tempo de coagulação (s)	MCU	Atividade específica (MCU/mg de proteína total)
<i>Hermetia illucens</i>	2400	10,00	7,35
<i>Shelfordella lateralis</i>	814	29,84	29,60
<i>Gryllus assimilis</i>	1063	22,58	37,63
<i>Zophobas morio</i>	1164	20,62	29,44
<i>Nauphoeta cinerea</i>	412	58,25	80,46
Quimosina comercial	2119	11,33	—

Fonte: Própria (2026).

Os valores de atividade coagulante observados variaram entre os extratos avaliados. Os resultados de atividade coagulante demonstraram diferenças expressivas entre os extratos avaliados. O menor valor foi observado para *Hermetia illucens* (10,00 MCU), enquanto o maior foi obtido para *Nauphoeta cinerea* (58,25 MCU), correspondente a um tempo de coagulação de apenas 412 segundos. A quimosina comercial foi utilizada como enzima de referência nas condições experimentais adotadas, permitindo a comparação do desempenho coagulante das preparações avaliadas. Nessas condições, o extrato obtido com *Nauphoeta cinerea* apresentou valor de MCU aproximadamente 414% superior ao observado para a quimosina comercial (11,33 MCU). Os extratos produzidos com *Shelfordella lateralis*, *Gryllus assimilis* e *Zophobas morio* também apresentaram valores de MCU superiores aos da quimosina comercial nas condições avaliadas, evidenciando o potencial desses substratos para indução da produção de proteases coagulantes por *M. subtilissimus*.

O desempenho observado para o extrato produzido utilizando *Nauphoeta cinerea* como substrato foi particularmente relevante, uma vez que apresentou o maior valor de atividade coagulante entre as amostras avaliadas, inclusive superior ao da preparação comercial utilizada como referência nas condições experimentais avaliadas. Considerando que a quimosina comercial representa um dos principais coagulantes empregados pela indústria de laticínios, esse resultado sugere que o sistema fermentativo baseado em *Mucor subtilissimus* possui potencial para a produção de enzimas com elevada eficiência tecnológica. Além disso, os dados demonstram a viabilidade da utilização de substratos alternativos para obtenção de biocatalisadores com aplicação na coagulação do leite.

Esses resultados são consistentes com estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, que evidenciaram a capacidade de *M. subtilissimus* UCP 1262 de produzir diferentes proteases com elevado potencial biotecnológico e industrial. Souza *et al.* (2022) relataram a produção de uma protease colagenolítica com atividade significativa em diferentes sistemas fermentativos. Da mesma forma, Conniff *et al.* (2024) demonstraram a produção e caracterização de uma protease fibrinolítica com propriedades bioquímicas promissoras para aplicações industriais e farmacêuticas. A relevância biotecnológica dessas enzimas também foi confirmada por estudos envolvendo sua imobilização em nanopartículas magnéticas (Marques da Silva *et al.*, 2022) e pela modulação de sua atividade por radiação gama (Cardoso *et al.*, 2024), evidenciando a robustez e versatilidade das proteases produzidas por esse microrganismo. Em conjunto, esses achados reforçam o potencial de *M. subtilissimus* como uma plataforma microbiana promissora para a produção comercial de enzimas proteolíticas. Entretanto, estudos adicionais de purificação,

caracterização bioquímica e determinação da relação entre atividade coagulante e atividade proteolítica são necessários para avaliar o potencial industrial dessas enzimas de forma mais abrangente.

Segundo Wiśniewski *et al.* (2025), a eficiência de enzimas coagulantes está relacionada principalmente à sua especificidade de ação, e não necessariamente à quantidade total de proteínas presentes no extrato. Proteases com elevada afinidade pelas proteínas responsáveis pela coagulação do leite tendem a apresentar melhor desempenho tecnológico, mesmo quando presentes em menores concentrações. Dessa forma, os resultados observados sugerem que os substratos utilizados influenciaram não apenas a quantidade de proteínas produzidas, mas também a composição e funcionalidade do complexo enzimático secretado pelo fungo.

A escolha do substrato exerce papel fundamental nesse processo. Neves *et al.* (2024) demonstram que farinhas de insetos apresentam elevado potencial biotecnológico, podendo ser empregadas em diferentes sistemas alimentares e fermentativos. Além disso, a composição química desses materiais pode atuar como indutora de diferentes rotas metabólicas, favorecendo a produção de enzimas com características específicas. Nesse sentido, as diferenças observadas entre os extratos podem refletir a capacidade de cada farinha em modular a expressão de proteases coagulantes por *M. subtilissimus* UCP 1262. Corroborando essa perspectiva, Rocha *et al.* (2024) demonstram que enzimas obtidas a partir de recursos entomológicos apresentam ampla estabilidade e atividade em diferentes condições de processo, enquanto Song *et al.* (2022) destacam o potencial de enzimas coagulantes alternativas na indústria de laticínios, especialmente pela sua eficiência funcional. Em conjunto, esses achados reforçam o potencial do sistema fungos filamentosos–farinhas de insetos como plataforma biotecnológica promissora para a produção de coagulantes microbianos, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis à quimosina tradicional.

Considerando a crescente demanda por coagulantes alternativos e processos mais sustentáveis, os resultados obtidos indicam que a associação entre farinhas de insetos e fermentação submersa por *M. subtilissimus* representa uma estratégia promissora para a produção de enzimas coagulantes. Essa abordagem não apenas agrega valor a biomateriais alternativos, como também pode contribuir para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos de interesse industrial, reduzindo a dependência de coagulantes de origem animal.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que farinhas de insetos podem ser utilizadas como substratos alternativos para a produção de enzimas coagulantes por *Mucor subtilissimus* em

fermentação submersa, atendendo ao objetivo proposto neste estudo. Observou-se que a atividade coagulante dos extratos não apresentou relação direta com a concentração de proteínas totais, sendo a atividade específica um parâmetro complementar importante para evidenciar a eficiência funcional dos extratos produzidos. Além disso, as diferenças observadas entre os substratos indicam que a composição das farinhas de insetos influencia a produção e a atividade das enzimas obtidas.

Destaca-se o potencial dos extratos produzidos com *Nauphoeta cinerea*, que apresentaram o maior valor de atividade coagulante entre os extratos avaliados e desempenho superior ao da quimosina comercial utilizada como referência nas condições experimentais estabelecidas, evidenciando a viabilidade da utilização de fungos filamentosos e substratos alternativos para obtenção de coagulantes microbianos. Dessa forma, a pesquisa contribui para o avanço do conhecimento sobre o aproveitamento biotecnológico de farinhas de insetos e reforça o potencial desse sistema como uma alternativa sustentável e promissora para aplicações na indústria de laticínios. Estudos futuros envolvendo a caracterização das proteases produzidas e a otimização das condições fermentativas poderão ampliar ainda mais o potencial de aplicação desses bioprodutos em escala industrial.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.; RIJO, P.; ROSADO, C. Bioactive compounds from *Hermetia illucens* larvae as natural ingredients for cosmetic application. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. E976, 2020.

BENEDET, Honório Domingos. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NA COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA DO LEITE. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 4, n. 2, 1986.

CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa et al. Role of gamma radiation as an agent modulator of *Mucor subtilissimus* UCP1262 Fibrinolytic Enzyme (MsFE). **Process Biochemistry (Barking, London, England)**, v. 143, p. 13–22, 2024.

CONNIFF, Amanda Emmanuelle S. et al. Production and biochemical and biophysical characterization of fibrinolytic protease of a *Mucor subtilissimus* strain isolated from the caatinga biome. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, n. suppl 1, p. e20230616, 2024.

CREAMER, L. K. et al. Micelle stability: kappa-casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 3004–3012, 1998.

DELA JUSTINA, Marciel; DELA JUSTINA, Mariléia Buss; SKORONSKI, Everton. The use of enzymes in the dairy industry: a condensed review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 3, p. 172–184, 2019.

GOMES, José Erick Galindo *et al.* Biochemical and thermodynamic characteristics of a new serine protease from *Mucor subtilissimus* URM 4133. **Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)**, v. 28, n. e00552, p. e00552, 2020.

KHAN, U.; SELAMOGLU, Z. Use of enzymes in dairy industry: A review of current progress. **Archives of Razi Institute**, v. 75, n. 1, p. 131–136, 2020.

KUMAR, A. *et al.* Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 243–258, 2010.

LUERCE, Tessália Diniz *et al.* Recombinant *Lactococcus lactis* fails to secrete bovine chymosine. **Bioengineered**, v. 5, n. 6, p. 363–370, 2015.

MARQUES DA SILVA, Marllyn *et al.* Immobilization of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in magnetic nanoparticles. **Protein Expression and Purification**, v. 192, n. 106044, p. 106044, 2022.

MARZAN, Shafia Mustafa *et al.* Antibacterial and antioxidant potentials of larval extract of black soldier fly, *Hermetia illucens* and blow fly, *Lucilia sericata*, for biomedical applications. **BioTechnologia**, v. 107, n. 1, p. 77–88, 2026.

MASCARIN, G. M. *et al.* Correction: Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 109, n. 1, p. 224, 2025.

MCMAHON, Donald J.; BROWN, Rodney J.; ERNSTROM, C. A. Enzymic coagulation of milk casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 4, p. 745–748, 1984.

NAEEM, Muhammad *et al.* Fungal proteases as emerging biocatalysts to meet the current challenges and recent developments in biomedical therapies: An updated review. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 2, p. 109, 2022.

NASCIMENTO, Júlio César dos Santos *et al.* Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e41311628994, 2022.

NEVES, Vítor *et al.* Insect flour as milk protein substitute in fermented dairy products. **Food Bioscience**, v. 60, n. 104379, p. 104379, 2024.

OH, Jung Hwan *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory, anti-adipogenesis activities and proximate composition of *Hermetia illucens* larvae reared on food waste enriched with different wastes. **Hanguk tongmul chawon kwahakhoe chi [Journal of Animal Science and Technology]**, v. 66, n. 5, p. 1034–1048, 2024.

ROBLES JIMENEZ, Lizbeth E. *et al.* Dietary water fly (*Notonecta* sp.) meal as an alternative protein source for sheep: Effects on performance, nutrient intake, nitrogen balance, and fermentation parameters. **Nihon chikusan Gakkaiho [Animal Science Journal]**, v. 95, n. 1, p. e70006, 2024.

ROCHA, Camila Bianca Ferreira da *et al.* Caracterização de protease produzida por larvas de *Tribolium castaneum* e aplicação biotecnológica industrial na coagulação do leite.

OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA, v. 22, n. 12, p. e8206, 2024.

RUNTHALA, Ashish et al. Caseins: **Versatility of their micellar organization in relation to the functional and nutritional properties of milk**. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 28, n. 5, p. 2023, 2023.

SANCHEZ, Sergio; DEMAINE, Arnold L. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites: Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 283–319, 2008.

SANTANA, Giovana de Oliveira; KWIATKOWSKI, Angela; SANTOS DE MINAS, Ramon. DESENVOLVIMENTO DE PREPARADOS EM PÓ PARA BEBIDAS DO TIPO “SHAKE” COM INSETOS COMESTÍVEIS DE ALTO TEOR PROTEICO: GROMPHADORHINA PORTENTOSA (SCHAUM, 1853) – BLATTODEA: BLABERIDAE; BOMBYX MORI LINNAEUS, 1758 – LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE). **Insect Farming Technologies**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2024.

SHAMMET, Khalid M.; BROWN, Rodney J.; MCMAHON, Donald J. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on κ -casein. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 6, p. 1373–1379, 1992.

SONG, Zhaoyang et al. Effect of pH on the coagulation properties of *Tenebrio molitor* coagulant. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 57, n. 3, p. 1630–1643, 2022.

SOUZA, Kessia P. S. et al. A novel collagenolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262: Comparative analysis of production and extraction in submerged and stated-solid fermentation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 4, p. e20201438, 2022

STOCCO, Giorgia *et al.* Effects of animal rennet, fermentation-produced chymosin, and microbial coagulants on bovine milk coagulation properties. **Journal of Dairy Science**, v. 108, n. 5, p. 4614–4625, 2025.

VIDAL, Ana Maria Centola et al. (ORGS.). **Obtenção e processamento do leite e derivados**. [S.l.]: Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2021.

WIŚNIEWSKI, P. et al. Invited review: Milk-clotting enzymes of microbial origin and their role in cheesemaking – A review. **Journal of Dairy Science**, v. 108, n. 10, p. 10427–10446, 2025.

XU, Xinyan *et al.* Edible insects as future proteins: Nutritional value, functional properties, bioactivities, and safety perspectives. **Nutrients**, v. 17, n. 19, p. 3165, 2025.

ZHGUN, Alexander A. Fungal BGCs for production of secondary metabolites: Main types, central roles in strain improvement, and regulation according to the piano principle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11184, 2023.