

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE B-GALACTOSIDASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE β -GALACTOSIDASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO.

Uanderson de Jesus Santos¹, Gildomar Lima Valasques Júnior².

RESUMO

Os fungos fazem parte do reino Fungi e necessitam de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono. *Lentinus tigrinus* é um fungo de podridão branca, trata-se de um cogumelo comestível e medicinal, com alto valor nutritivo e de saúde, alta quantidade de aminoácidos, poucos açúcares e baixas calorias. Os fungos filamentosos se destacam dentre os produtores de β -galactosidase pela habilidade de produzir enzimas e capacidade de crescerem em vários substratos. As β -galactosidases, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose. Neste contexto, é possível observar a importância para a obtenção de enzimas por meio dos fungos afim de novas tecnologias para beneficiar a saúde humana mantendo o equilíbrio ambiental, sendo de interesse industrial, principalmente no setor de alimentos. As enzimas possuem condições determinantes para atuação ótima. Neste estudo foi observado as condições de pH e temperatura ideais para ação da enzima produzida pelo fungo, caracterizado pelo pH de 4,5 e temperatura de 60°C, a fim de ampliar sua obtenção.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas, estabilidade, fungo filamentoso, lactose, *Lentinus tigrinus*.

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF B-GALACTOSIDASES PRODUCED BY FUNGI ISOLATED FROM THE NORTHEAST SEMI-ARID: PARTIAL CHARACTERIZATION OF B-GALACTOSIDASES PRODUCED BY FUNGI ISOLATED FROM THE NORTHEAST SEMI-ARID.

Fungi are part of the Fungi kingdom and need organic components as sources of energy and carbon. *Lentinus tigrinus* is a white rot fungus, it is an edible and medicinal mushroom, with high nutritional and health value, a high amount of amino acids, few sugars and low calories. Filamentous fungi stand out among β -galactosidase producers due to their ability to produce enzymes and their ability to grow on various substrates. β -galactosidases, popularly known as lactases and classified as hydrolases, are responsible for catalyzing the terminal β -galactopyranosyl residue of lactose to form glucose and galactose. In this context, it is possible to observe the importance of obtaining enzymes through fungi in order to create new technologies to benefit human health while maintaining environmental balance, being of industrial interest, mainly in the food sector. Enzymes have determining conditions for optimal performance. In this study, the ideal pH and temperature conditions were observed for the action of the enzyme produced by the fungus, characterized by a pH of 4.5 and a temperature of 60°C, in order to increase its obtainment.

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

¹Graduando em Farmácia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, uanderjsantos@gmail.com

²Doutor em Biotecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, jvalasques@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os fungos fazem parte do reino Fungi, são quimio-heterotróficos e adquirem alimentos por absorção. necessitam de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono, são aeróbios ou anaeróbios facultativos. Fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela fragmentação de suas hifas. (TORTORA, 2017) e (NELSON, 2019). *Lentinus tigrinus* é um fungo de podridão branca encontrado naturalmente em madeira de lei podre durante a primavera e o verão na China. Trata-se de um cogumelo comestível e medicinal, com alto valor nutritivo e de saúde. Os compostos naturais deste cogumelo, como os fenólicos, são comprovadamente capazes de ter atividade antioxidante (HE, 2016). As β -galactosidases, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose, com grande importância nas indústrias de alimentos para fabricação de produtos hidrolisados com lactose (SANTIAGO 2004). A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na conformação da proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura (MARZZOCO, 2018). Neste contexto, é possível observar a importância para a obtenção de enzimas por meio dos fungos afim de novas tecnologias para beneficiar a saúde humana mantendo o equilíbrio ambiental. Em consideração a isso, este estudo se faz relevante por indicar um método efetivo para extração de β -galactosidase do meio intracelular do fungo filamentoso *Lentinus tigrinus*, sendo uma opção para exploração da enzima desejada.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTIVO:

O *Lentinus tigrinus* foi cultivado a 28°C durante 7 dias, em um meio de cultura em estado líquido contendo peptona (3g/L) e lactose (10g/L).

OBTENÇÃO DA ENZIMA:

A extração enzimática foi realizada através do método de ruptura da parede celular com pérolas de vidro, com agitação no vórtex AP 56 Phoenix do tubo Falcon contendo 1mL da suspensão para cada 1,1g de pérolas de vidro sobre 30 minutos de agitação. submetida por 2 minutos de banho de gelo a cada 5 minutos de agitação. Por fim, foi centrifugada a 5.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar atividade enzimática (FALLEIROS apud MEDEIROS, 2016).

PADRÃO DA AMOSTRA

A amostra é composta por 0,75 uL de ONPG e 150 uL do extrato bruto enzimático, o zero 150 uL de extrato bruto enzimático e 0,75 uL de água destilada e o branco com 0,75 uL de ONPG e 150 uL de água destilada. Utilizando como comprimento de onda padrão de 410nm no espectrofotômetro.

OTIMIZAÇÃO DE PH E TEMPERATURA:

Foi realizado através da metodologia de superfície de resposta utilizando a matriz Doehlert, composta pelas variáveis pH e temperatura, onde foi analisada em 3 níveis (30, 50 e 70 °C), enquanto pH em 5 níveis (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0). Totalizando 9 experimentos com triplicata no ponto central (pH 5 a 50 °C), para detecção de possíveis erros experimentais.

PH ESTABILIDADE

O experimento foi realizado explorando a faixa de pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 e 7.0, em triplicata. A amostra com preparo padrão foi submetido aos pH citados e posto em banho-maria a 50°C por 20 minutos. Após isso, foi adicionado 500 uL de carbonato de cálcio 1M, a fim de parar a reação.

TERMOESTABILIDADE

A termoestabilidade foi experimentada em distintas temperaturas (60°C e 70°C) e por períodos crescentes (10, 20, 30 e 40 min) em pH igual a 5,0. Com preparo padrão da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento Doehlert foi aplicado a fim de identificar as melhores condições para ação enzimática da b-galactosidase produzida pelo fungo *Lentinus tigrinus*, analisando os fatores pH e temperatura. Sendo o pH ótimo de 4,5 e a temperatura ótima de 60°, como mostrado na (figura 1). Os resultados obtidos demonstram relação entre as condições utilizadas e o desempenho da enzima lactase, nos quais, condições em faixas inferiores reduz o seu desempenho e em faixas superiores há perda da atividade enzimática, provocada pela desnaturação da enzima. (MARZZOCO, 2018)

Em relação ao pH estabilidade de os resultados obtidos estão na (tabela 1). Os valores de absorbâncias do zero foram 0,118; 0,117 e 0,120, uma média de 0,118. Em um estudo semelhante realizado por (CARVALHO, 2015) da lignina produzida por *L. Tigrinus* em farelo de trigo, foi observado um aumento da atividade na faixa de pH 3,5 a 4,5. Após esse ponto houve regressão da atividade em 75%. Aqui é possível observar um perfil semelhante em pH 3 e 5.

Para termoestabilidade a enzima mostrou boa atividade em temperatura de 60°C, porém não houve atividade em 70°C. Segundo (MARZZOCO, 2018) a estrutura da enzima são uma decorrência da estrutura tridimensional, passiva de ser afetada por condições de temperatura por exemplo, alterando a conformação.

Para a maioria das enzimas existe um valor de pH no qual a sua atividade é máxima, a reação diminui na medida em que o pH se afasta desse valor ótimo. A influência do pH sobre a enzima se dá pelos grupos ionizáveis nos resíduos de aminoácidos. A elevação da temperatura aumenta a velocidade somente enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das enzimas são desnaturadas, acarretando a perda do poder de catálise. (MARZZOCO, 2018).

CONCLUSÃO

A aplicação da metodologia de superfície de resposta seguindo o planejamento Doehlert permitiu a análise das condições favoráveis para melhor ação da enzima b-galactosidase produzida pelo fungo filamentoso *L. Tigrinus*. Concluindo que para obter maior desempenho, entende-se, que os melhores parâmetros são temperatura de 60 °C e pH 4,5. Ao experimentar a enzima em teste de pH estabilidade compreende-se que a enzima se mantém estável entre a faixa de 3 a 5. Para termoestabilidade, a temperatura

de 60°C encontra-se dentro da faixa aceitável para sua atividade, quando submetido a 70°C a atividade é zerada em decorrência da desnaturação.

Neste contexto, o *Lentinus tigrinus* apresenta-se como uma boa alternativa para obtenção da β -galactosidase, enzima essencial para melhora da qualidade de vida de pessoas com intolerância a lactose. Sendo assim, com um grande potencial para obtenção da enzima de lactase, o *L. Tigrinus* torna-se uma via relevante para aplicação industrial.

AGRADECIMENTO:

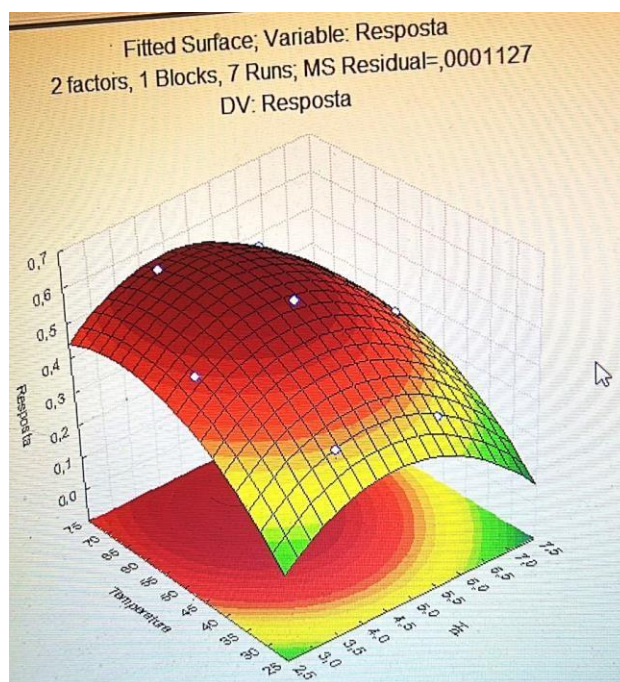
Agradeço a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela bolsa para realização deste estudo, a fim do desenvolvimento científico e tecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FALLEIROS, Larissa Nayhara Soares Santana et al. Produção e caracterização de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537. 2016.
2. HE, Peixin et al. Effect of Tween 80 and acetone on the secretion, structure and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lentinus tigrinus*. *Food Technology and Biotechnology*, v. 54, n. 3, p. 290-295, 2016.
3. MARZZOCO, Anita. TORRES, Bayardo Baptista. *Bioquímica básica*. – 4. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
4. NELSON, David L., COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 7. ed. - Porto Alegre: Artmed, 2019.
5. SANTIAGO, Patrícia A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Food Science and Technology**, v. 24, p. 567-572, 2004.
6. TORTORA, Gerard J. FUNKE, Berdell R. CASE, Christine L. *Microbiologia*. 12. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

Tabelas e Figuras:

Figura 1. Planejamento experimental Doehlert para otimização do pH e temperatura da b-galactosidase.



Fonte própria

Tabela 1. pH estabilidade e termoestabilidade.

Tabela 1a: pH estabilidade do <i>Lentinus tigrinus</i> .					
pH	Abs.1	Abs.2	Abs.3	Média	Média Abs.
3	0,125	0,128	0,124	0,125	0,007
4	0,087	0,098	0,120	0,101	0
5	0,130	0,118	0,119	0,122	0,004
6	0,117	0,113	0,114	0,114	0
7	0,108	0,107	0,103	0,106	0
Tabela 1b: Termoestabilidade do <i>L. Tigrinus</i> .					
	Abs.1	Abs.2	Abs.3	Média	
Tempo 0	0,338	0,393	0,370	0,367	
Para 60°C					
10 min	0,278	0,297	0,291	0,288	
20 min	0,188	0,203	0,217	0,202	
30min	0,132	0,145	0,144	0,140	
40 min	0,138	0,172	0,147	0,152	

Fonte própria

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

¹Graduando em Farmácia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, uanderjsantos@gmail.com

²Doutor em Biotecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, jrvallasques@gmail.com