

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA β -GALACTOSIDASE PRODUZIDA PELA ESPÉCIE FÚNGICA *Ganoderma lucidum*

Bianca Maria de Jesus¹, Gildomar Lima Valasques Júnior²

RESUMO

A β -galactosidase (lactase) é uma enzima com ação biocatalisadora na hidrólise da lactose, rompendo a ligação glicosídica β -1 \rightarrow 4 e liberando D-glicose e D-galactose. Desse modo, esses monossacarídeos, são melhores absorvidos pelo organismo para serem metabolizados. A β -galactosidase está disposta naturalmente no ser humano, além de ser obtida de fontes vegetais e microbiológicas. Os fungos filamentosos se destacam na produção de metabólitos de interesse industrial e apresentam ainda atividades biológicas, de interesse médico e farmacêutico. São de fácil manipulação e requer baixo investimento em seu cultivo, uma vez que se desenvolvem-se em substratos simples. Este estudo buscou caracterizar parcialmente a lactase obtida da espécie fúngica *Ganoderma lucidum*, através da metodologia de superfície de resposta, com o planejamento experimental Doehlert, averiguando seu comportamento em termos de pH (3,4, 5, 6 e 7) e temperatura (30, 50 e 70°C). A lactose foi utilizada como indutor da produção da lactase em meio submerso. A extração da lactase intracelular, foi realizada pelo método de pérolas de vidro e a atividade enzimática determinada pelo método do orto-nitrofenol β -D-galactopiranosídeo (ONPG). O perfil de estabilidade frente a variações de pH, na faixa empregada no processo anterior foi investigado. A β -galactosidase produzida por *Ganoderma lucidum* exibiu melhor atividade catalítica em pH 3 e temperatura de 55°C. As condições encontradas neste estudo, pode servir de parâmetro para aplicações da β -galactosidase de *Ganoderma lucidum* no setor industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima, pH, temperatura, metodologia de superfície de resposta.

PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE β -GALACTOSIDASE PRODUCED BY THE FUNGAL SPECIES *Ganoderma lucidum*

ABSTRACT

β -galactosidase (lactase) is an enzyme with a biocatalytic action in the hydrolysis of lactose, breaking the β -1 \rightarrow 4 glycosidic bond and releasing D-glucose and D-galactose. In this way, these monosaccharides are better absorbed by the body and metabolized. β -galactosidase is naturally present in humans and can also be obtained from plant and microbiological sources. Filamentous fungi stand out in the production of metabolites of industrial interest and also have biological activities of medical and pharmaceutical interest. They are easy to handle and require little investment to cultivate, as they grow on simple substrates. This work sought to partially characterize the lactase obtained from the fungus *Ganoderma lucidum*, using the response surface methodology, with the Doehlert experimental design, verifying its behaviour as a function of pH (3-7) and temperature (30, 50 and 70°C). Lactose was used as an inducer for lactase production in submerged media. Intracellular lactase was extracted using the glass bead method and enzyme activity was determined using the ortho-nitrophenol β -D-galactopyranoside

¹Graduanda do curso de Farmácia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 201920300@uesb.edu.br

² Doutor em Biotecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, gildomar.valasques@uesb.edu.br

(ONPG) method. The stability profile against pH variations in the range used in the previous process was investigated. The β -galactosidase produced by *Ganoderma lucidum* showed better catalytic activity at pH 3 and at a temperature of 55°C. The conditions found in this study can serve as a parameter for applications of β -galactosidase from *Ganoderma lucidum* in the industrial sector.

KEYWORDS: Enzyme, pH and temperature, response surface methodology

INTRODUÇÃO

Realidade em cerca de 70% da população mundial, a intolerância à lactose é uma síndrome caracterizada pela incapacidade de digestão da lactose, devido a deficiência ou ausência da enzima biocatalizadora β -galactosidase. Com isso, a lactose permanece no lúmen intestinal e contribui com o aumento da osmolaridade intraluminal, é então fermentada por bactérias do cólon, produzindo gases e ácidos graxos de cadeia curta, levando à manifestação dos sinais clínicos (Castellano et al, 2022).

A β -galactosidase estimula o organismo a produzir bactérias benéficas, como a bifidobactérias, que possui ação protetora ao trato gastrointestinal atuando como um substrato para a microbiota do intestino, regulando o trânsito estomacal, além de elevar a absorção de cálcio, magnésio, zinco e manganês (Thomson; Medina; Garrido, 2018). Observando a alta taxa de indivíduos com essa condição, o setor industrial tem buscado vias alternativas para obtenção da lactase. Os fungos filamentosos se destacam nesse sentido, devido ao seu potencial como produtor de metabólitos com atividades biológicas, sendo necessário baixo investimento em seu cultivo, uma vez que se desenvolvem em substratos simples, além disso, são de fácil adaptabilidade à substratos o que contribui para a secreção de enzimas, que são passíveis de recuperação em meio de fermentação (Martarello, 2016).

Dessa forma, estudos (Murador *et al.*, 2020; Kazemi; Khayati; Faezi-Ghasemi, 2016) acerca do processo de produção e caracterização estão sendo realizados com o intuito de promover a rastreabilidade das espécies fúngicas produtoras de β -galactosidase. Com o uso de β -galactosidase fúngicas, espera-se alcançar tratamentos eficazes e acessíveis para o quadro de intolerância à lactose, o que implica em melhor qualidade de vida aos indivíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

A extração da β -galactosidase intracelular, foi realizada utilizando pérolas de vidro. A atividade enzimática foi determinada pelo método do ONPG e o teor de proteínas pelo método de Bradford (1976).

A produção e a caracterização da β -galactosidase foi otimizada aplicando o planejamento de Doehlert, utilizando como variáveis tempo (5, 10 e 15 dias) e concentração do indutor (variando entre 2 g/L-18 g/L.) e pH (3-7) e temperatura (30, 50 e 70°C), respectivamente. Todos os testes foram conduzidos em triplicata.

Após o cultivo submerso, o meio foi centrifugado (Modelo 206 BL80 EXCELSA) e a biomassa ressuspensa em água destilada. Para cada 1 mL de água destilada, 1,1 g de perólas de vidro foram adicionadas e em seguida, submetidas à agitação em vórtex (AP 56 Phoenix). A cada 5 min de agitação, a mistura era submetida a banho de gelo por 2 min, o período total de agitação foi de 30 min. A suspensão foi centrifugada a 5.000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade enzimática.

Para a determinação da atividade enzimática, utilizou-se 300 μ L do extrato enzimático e 1,5mL de solução do ONPG (20 mM). Para o branco a água destilada foi substituída pela amostra. A mistura foi aquecida em banho maria por 20 min a 50°C e a reação foi parada com 1mL de solução de carbonato de sódio (1M). A leitura foi conduzida a 410nm. No doseamento proteico, a mistura de 100 μ L do extrato bruto enzimático com 5mL de Bradford, foi mantida em repouso por 5 min e a leitura realizada em 595 nm.

Na verificação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi previamente submetido a pH diferentes (3 a 7) por 1 hr e em seguida a atividade foi determinada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da curva padrão do Bradford, obteve a equação da reta: $y=0,0073x+0,0821$ (R^2 0,99). O teor de proteínas foi de 21,93 μ g, enquanto a atividade enzimática inicial foi 0,4994 UA/min e a atividade específica de 2,2771 AE.

No gráfico de superfície de resposta, nota-se os pontos ótimos de cada variável empregada, sendo pH ótimo em torno de 3 e temperatura ótima em torno de 55°C (R^2 0,97). A influência da temperatura ocorre sobre a cinemática da reação, sendo acima da faixa ideal induz alterações em sua estrutura química, gerada pelo rompimento das ligações de hidrogênio, desnaturando a enzima. Por outro lado, o pH age na velocidade das reações, dependendo da quantidade de grupos ionizáveis para exercer sua atividade catalítica (Song, 2007). A literatura aponta que a valores ótimos da β -galactosidase produzida pela espécie *Ganoderma lucidum* fica na faixa de 55°C a 60°C, além de apresentar afinidade por pH ácidos (Song, 2007 apud Cruz *et al.*, 1999).

CONCLUSÃO

O fungo *G. lucidum* pode ser utilizado como uma alternativa para obtenção da enzima β -galactosidase, importante para degradar o dissacarídeo lactose. O processo de otimização permitiu indicar as condições ótimas da enzima que conduzem à melhor atividade. Os resultados evidenciam o potencial desse fungo em aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABD EL-SALAM, B. E.; IBRAHIM, O. A.; AMER, A. E. Efficient enzymatic conversion of lactose in milk using fungal β -galactosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 29, p. 101813, 2020
- 2- Ahmad MF, Ahmad FA, Zeyaulah M, Alsayegh AA, Mahmood SE, AlShahrani AM, Khan MS, Shama E, Hamouda A, Elbendary EY, et al. *Ganoderma lucidum*: nova visão sobre o potencial hepatoprotetor com mecanismos de ação. *Nutrientes* . 2023; 15(8):1874. <https://doi.org/10.3390/nu15081874>
- 3- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 4- CASTELLANO, Beatriz França et al. Intolerância à lactose: diagnóstico clínico laboratorial e genético. *BioSCIENCE*, v. 80, n. 2, p. 12, 1 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.55684/80.2.12>. Acesso em: 11 set. 2023.
- 5- FACIONI, M. S., RASPINI, B., PIVARI, F., DOGLIOTTI, E., & CENA, H. Nutritional management of lactose intolerance: The importance of diet and food labelling. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1-9, 2020.
- 6- FALLEIROS, Larissa Nayhara Soares Santana. Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537. 2016. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. DOI <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2016.64>.
- 7- FISCHER, Janaína et al. Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo. 2010.
- 8- MARTARELLO, Raquel Dall'agnol. Purificação de uma beta-galactosidase produzida por *aspergillus foetidus* através de técnicas cromatográficas. 2016. 112 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade De Brasília, Brasília, 2016
- 9- 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.
- 10- SONG, M. et al. Use of Whey Permeate for Cultivating *Ganoderma lucidum* Mycelia. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 5, p. 2141-2146, maio 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-690>. Acesso em: 13 set. 2023.
- 11- SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, v. 83, p. 88–96, 2018.

12- THOMSON, P., MEDINA, D. A., & GARRIDO, D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology*, 75, 37-46, 2018.

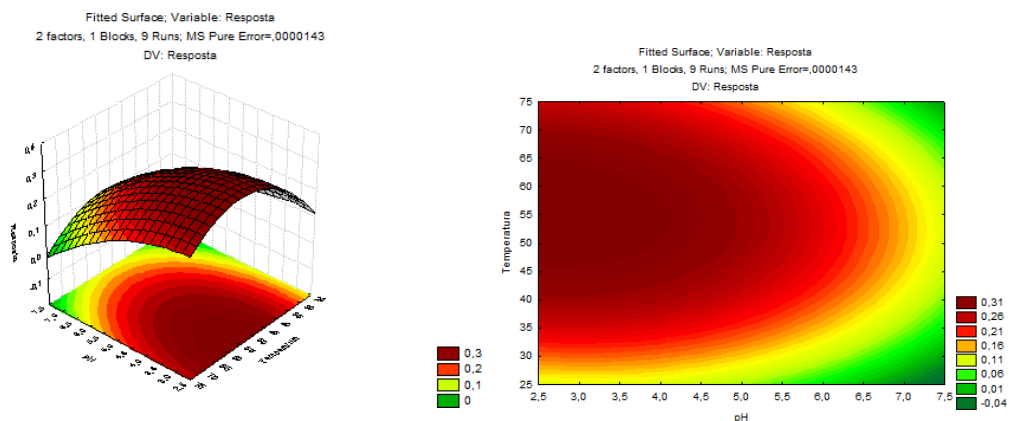
Tabelas e Figuras

TABELA 01: doseamento enzimático e protéico do *G. lucidum*.

	Abs 01	Abs 02	Abs 03	Média	Zero	Média
Atividade enzimática	0,209	0,156	0,168	0,177	0	0,177
Proteína Total	0,097	0,076	0,061	0,078	-	-

Fonte própria

FIGURA 01: Gráfico de superfície e curva de níveis para a caracterização da β -galactosidase de *G. lucidum*



Fonte própria

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pertencente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – campus Jequié. Outrossim, sua realização foi possível graças a colaboração de Pâmala Évelin Pires Cedro.