

# Purificação, caracterização e aplicação de $\beta$ -galactosidases produzidas por fungos isolados do semiárido nordestino.

Mariana Malheiro dos Santos<sup>11</sup>, Gildomar Lima Valasques Junior<sup>2</sup>.

## RESUMO

A produção de enzimas por fontes fúngicas tem se mostrado como uma alternativa viável para usos em larga escala, a  $\beta$ -galactosidase produzida pelo fungo filamentososo do gênero *Aspergillus* é um exemplo. A produção das enzimas por fermentação submersa é um método viável para a obtenção, caracterização e purificação. O objetivo deste estudo é obter, purificar e caracterizar  $\beta$ -galactosidases oriunda de fontes fúngicas do semiárido nordestino. Os fungos utilizados foram obtidos da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana, posteriormente se deu a triagem da produção da lactase pelos microrganismos obtidos da coleção de cultura, sendo cultivado em meio Ágar Batata Dextrose e incubado por 5 dias a 30°C com pH 7,0. Posteriormente, 3 discos da placa contendo os fungos foram utilizados na fermentação submersa e incubados por 120 h a 150 rpm em meio líquido contendo lactose como indutor. Após a filtração a vácuo do meio líquido, foi obtido o extrato enzimático bruto. A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi realizada utilizando o orto-nitrofenol  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (oNPG), como reagente colorimétrico, para atividade, intra e extracelular, realizou-se a leitura das absorbâncias com espectrofotômetro a 490nm. O fungo que demonstrou a maior atividade intracelular foi o *Aspergillus niger* de (0,3587 UA) e extracelular de (0,0101 UA). Assim, pode-se concluir que a *Aspergillus niger* possui uma melhor produção de  $\beta$ -galactosidase intracelular.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*,  $\beta$ -galactosidase, Enzimas.

## ABSTRACT

The production of enzymes by fungal sources has been shown to be a viable alternative for large-scale uses, the  $\beta$ -galactosidase produced by the filamentous fungus of the genus *Aspergillus* is an example. The production of enzymes by submerged fermentation is a viable method for obtaining, characterizing and purifying. The objective of this study is to obtain, purify and characterize  $\beta$ -galactosidases from fungal sources in the northeastern semi-arid region. The fungi used were obtained from the Culture Collection of Microorganisms of Bahia (CCMB) of the Universidade Estadual de Feira de Santana, later the lactase production was screened by the microorganisms obtained from the culture collection, being cultivated in Agar Potato Dextrose and incubated for 5 days at 30°C with pH 7.0. Subsequently, 3 discs from the plate containing the fungi were used in the submersed fermentation and incubated for 120 h at 150 rpm in a liquid medium containing lactose as an inducer. After vacuum filtration of the liquid medium, the crude enzyme extract was obtained.  $\beta$ -galactosidase activity was performed using ortho-nitrophenol  $\beta$ -D-galactopyranoside (oNPG) as a colorimetric reagent, for intra and extracellular activity, absorbance reading was performed with a spectrophotometer at 490nm. The fungus that showed the highest intracellular activity was *Aspergillus niger* (0.3587 AU) and extracellular (0.0101 AU). Thus, it can be concluded that *Aspergillus niger* has a better production of intracellular  $\beta$ -galactosidase.

**Keywords:** *Aspergillus niger*,  $\beta$ -galactosidase, Enzymes.

---

Financiamento: Bolsa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

<sup>1</sup> *Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;*

<sup>2</sup> *Professor Titular, Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;*

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e melhoramento de produtos biológicos, é um papel de destaque desempenhado pela biotecnologia (CUI et al., 2015). Grande parte das  $\beta$ -galactosidases utilizadas na indústria são de fontes microbianas, e podem ser produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Nesse cenário, os fungos filamentosos destacam-se por serem microrganismos de fácil adaptação que colonizam diferentes ambientes e produzem vários metabolitos de interesse biológico. Outra característica dos fungos que o torna mais viável no uso como fonte de obtenção das  $\beta$ -galactosidases, é a capacidade de alguns fungos em expressar enzimas extracelulares que torna o processo de extração e purificação mais fácil (CUI et al., 2015).

O fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* é bastante utilizado para produção de enzimas  $\beta$ -galactosidase (SILVÉRIO et al., 2018). De forma geral as enzimas possuem diversas aplicações biotecnológicas, isso porque elas apresentam distintas características que as fazem ser atrativas do ponto de vista de produção uma vez que elas têm propriedades catalíticas que as tornam interessante para biotransformações, e as fazem serem amplamente utilizadas seja na agroindústria, na indústria farmacêutica ou alimentícia, pois se mostram como catalizadores multifuncionais e assim a produção por fontes fúngicas se mostra com alternativa viável e econômica (VECCHIA, 2004). Diante disso, o objetivo desse estudo, foi obter, purificar e caracterizar  $\beta$ -galactosidases oriundas de fontes fúngicas do semiárido nordestino.

## MATERIAIS E METODOS

Nos ensaios de atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, foi utilizada uma metodologia que consiste na utilização do orto-nitrofenol  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (oNPG), como reagente colorimétrico (LIU 2021), e realizou-se a leitura das absorbâncias com espectrofotômetro a 490nm, para análises estatísticas posteriores.

Na etapa de produção da enzima o fungo selecionado para produção da lactose o *Aspergillus niger* foi cultivado em meio Agar batata dextrose (BDA) e incubado por um período de 5 dias a 30°C. Na preparação do meio de cultura utilizou-se lactase (10g/L), extrato de malte (3g/L), extrato de levedura (3g/L), sulfato de magnésio (0,758g/L) e peptona (5g/L) em pH 7,0. A partir dos microrganismos contidos na placa foi feito o inóculo usando três discos mantidos por 120 horas a uma rotação de 150 rpm, no shaker para o processo de fermentação. Posteriormente, realizou-se a filtração a vácuo do meio de cultura, o filtrado foi considerado o extrato enzimático bruto foi obtido que é o sobrenadante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de se avaliar a hidrólise da lactose por diferentes tipos de microrganismos, a fim de identificar qual se mostra mais eficaz na hidrólise da lactose e assim identificar qual tem um maior potencial industrial (MNERA, 2011). Foram realizados experimentos para determinação da hidrólise máxima da lactose em glicose e galactose em meio extracelular, onde a atividade enzimática extracelular foi medida de acordo com absorbância da amostra e os dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase intracelular por diferentes tipos de fungos.

Microrganismo	UA (mol/min)
---------------	--------------

<i>Penicillium roqueforti</i>	0,0026
<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i>	0,0023
<i>Pleurotus roseus</i>	0,0017
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,0016
<i>Aurificaria luteombrina</i>	0,0043
<i>Ganoderma lucidum</i>	0,0027
<i>Lentinus Tigrinus</i>	0,0025
<i>Penicillium camemberti</i>	0,0026
<i>Aspergillus niger</i>	0,3587

Fonte: elaboração dos autores

Com o intuito de se avaliar a concentração de  $\beta$ -galactosidade presente no meio extracelular de distintas cepas de fungos, foram realizados experimentos que se propuseram a mensurar a atividade enzimática extracelular, a fim de identificar qual cepa de fungo apresenta a maior atividade enzimática extracelular. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase extracelular por diferentes tipos de fungos.

<b>Microrganismo</b>	<b>UA (mol/min)</b>
<i>Penicillium roqueforti</i>	-----
<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i>	-----
<i>Pleurotus roseus</i>	-----
<i>Pleurotus ostreatus</i>	-----
<i>Aurificaria luteombrina</i>	-----
<i>Ganoderma lucidum</i>	-----
<i>Lentinus Tigrinus</i>	-----
<i>Penicillium camemberti</i>	0,0016
<i>Aspergillus niger</i>	0,0101

Fonte: Elaboração dos autores

No experimento foi possível observar que somente as cepas do *Aspergillus niger* e do *Penicillium camembertii*, conseguiram apresentar alguma atividade enzimática extracelular; sendo que o *Aspergillus niger* também mostrou um melhor resultado (0,0101UA) nesse ensaio, Barbosa (2007) avaliou a atividade da enzima lactase utilizando como fonte de carbono a lactose e constatou que o *Aspergillus niger* se mostra como uma boa fonte de produção da enzima. Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

## CONCLUSÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus niger*, se mostrou como o melhor produtor de  $\beta$ -galactosidase entre os microrganismos estudados. Isso demonstra que a utilização de fontes microbianas pode ter um grande potencial de produção de das enzimas  $\beta$ -galactosidase, sendo suas aplicações diversas, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou agroindústria.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, M.R.; ARAÚJO, E.H. Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentoso *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v.1, n.1, p.1-22, 2007

CUI, J. L. et al. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. *PloS one*, v. 10, n. 3, p. e0118204, 2015.

LIU, W. et. al. A novel cold-adapted phospho-beta-galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.166, p.760–770, 2021.

SILVÉRIO, S. C. et al. New B-galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 131–139, 2018.

VECCHIA, R. D, NASCIMENTO, M. G, SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova*. v.27, n.4, p.623-630, 2004

MANERA, A. P; ORES, J. C; RIBEIRO, V. A; RODRIGUES, M.I; KALIL, S. J; FILHO, F. M. "Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de  $\beta$ - galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 *Acta Scientiarum Technology*. v.33, n.2, p.155-161, 2011.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos aos órgãos de fomento pela contribuição para realização deste trabalho. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

