

# Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de $\beta$ -galactosidases produzidas por fungos do semiárido nordestino

Fernanda Lobo de Lima<sup>1</sup>, Pâmala Évelin Pires Cedro<sup>2</sup>, Alana Caise dos Anjos Miranda<sup>2</sup>, Gildomar Lima Valasques Junior<sup>3</sup>.

## RESUMO

As  $\beta$ -galactosidases são enzimas hidrolases, que podem ser obtidas por diversas fontes, sendo a produção por fungos filamentosos seu principal meio de obtenção, atualmente. Este estudo tem o intuito de analisar a produção, purificação e caracterização da aplicação de  $\beta$ -galactosidase obtidas de fungos filamentosos isolados do semiárido nordestino. Para isso, realizou-se uma pesquisa nas bases de dados, onde foram selecionados estudos nos idiomas português e inglês. Os resultados demonstraram que a intolerância à lactose tem afetado uma parcela significativa da população mundial e que a produção de lactase têm se apresentado como alternativa bastante favorável no cenário mundial.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -galactosidase. Intolerância à lactose. Atividade enzimática.

## ABSTRACT

The  $\beta$ -galactosidases are hydrolases enzymes, which can be obtained from several sources, being the production by filamentous fungi its main means of obtaining, currently. This study aims to analyze the production, purification and application characterization of  $\beta$ -galactosidase obtained from filamentous fungi. For this, a search was carried out in the databases, where studies in Portuguese and English were selected. The results showed that lactose intolerance has affected a significant portion of the world population and that lactase production has been presented as a very favorable alternative on the world stage.

**Keywords:**  $\beta$ -galactosidase. Lactose intolerance. Enzymatic activity.

## INTRODUÇÃO

O reino fungi é composto por microrganismos unicelulares, eucariontes, heterotróficos e pluripotentes, capazes de formar hifas; em geral, os fungos são divididos, morfológicamente, em filamentosos e leveduriformes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Atualmente, têm-se demonstrado bastante interesse na aplicabilidade dos fungos, uma vez que, podem ser utilizados na indústria de alimentos, indústria farmacêutica, na área agrícola e entre outros. Dentre as utilidades desse microrganismo, está a produção de enzimas a partir dos fungos filamentosos (SILVA, 2016).

Uma das principais enzimas produzidas pelos fungos são as lactases, também conhecidas como  $\beta$ -galactosidases, que hidrolisam as ligações glicosídicas presentes na lactose, formando dois monossacarídeos, que são a glicose e a galactose (MURADOR, 2020). A busca por fontes alternativas de produção de  $\beta$ -galactosidases tem se demonstrado cada vez mais necessária, uma vez que, estima-se que 75% da

---

\* 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> Doutoranda em Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;

<sup>3</sup> Professor Titular, Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;

população mundial possui uma deficiência de galactosidase e isso pode gerar diversos distúrbios digestivos no organismo humano, causando dor e inchaço na região abdominal, flatulência, diarreia, cólicas abdominais entre outros sintomas (VIDYA et al., 2020).

De acordo com a Convenção de Biodiversidade da Organização das Nações Unidas (ONU), de 1992, a biotecnologia é toda aplicação tecnológica que faz uso de sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica (SOUZA, 2018). Neste sentido, o objetivo desse trabalho é estudar a produção, purificação e caracterização da aplicação de  $\beta$ -galactosidase obtidas de fungos filamentosos, isolados do semiárido nordestino, e realizar ensaios de aplicação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, realizou-se buscas nas bases de dados, nos idiomas português e inglês, que abordassem sobre a obtenção de  $\beta$ -galactosidases de origem fúngica, levando em consideração a produção, a caracterização e a aplicação biotecnológica, como características principais da pesquisa. Não houveram critérios de exclusão e as palavras-chave utilizadas foram:  $\beta$ -galactosidase, intolerância à lactose e atividade enzimática.

Utilizou-se microrganismos da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ), bem como, os da Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), que foram previamente isolados do semiárido nordestino e mantidos em meio BDA (Agar Batata Dextrose) a 4°C.

Os fungos foram cultivados e colocados na incubadora por 5 dias a 30°C. Posteriormente, preparou-se 125 mL de meio líquido contendo lactose (10 g/L), extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L), sulfato de magnésio (0,758 g/L) e peptona (5 g/L); então, fez-se o inóculo com três discos de cada placa com microrganismo. O processo fermentativo foi realizado a 150 rpm por 120h em incubadora shaker. Por fim, fez-se a filtração a vácuo e utilizou o sobrenadante como extrato enzimático bruto da enzima extracelular. A biomassa foi utilizada para a obtenção da enzima intracelular.

Para o processo fermentativo da atividade enzimática intracelular, colocou-se 10 mL de tampão citrato-fosfato de pH 7 na biomassa; depois, acrescentou-se 20  $\mu$ L de tuim e 100  $\mu$ L de clorofórmio (1%); então, transferiu-se para tubos de ensaio e os levou ao ultrassom por 15 minutos. Posteriormente, macerou por 15 minutos, centrifugou a 5000 rpm por 5 minutos e utilizou o sobrenadante como extrato bruto enzimático da lactase extracelular.

Para a determinação da atividade enzimática, utilizou-se o O-nitrofenol  $\beta$ -galactopiranosídeo (oNPG), como reagente colorimétrico do ensaio da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase intra e extracelular. Foram utilizados 500  $\mu$ L do extrato bruto enzimático e 2 mL de solução de oNPG 5 mM em pH 7,0; deixou reagir em banho-maria a 40°C por 15 min; em seguida, adicionou-se 500  $\mu$ L de carbonato de sódio a 1M para paralisar a reação e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm (LIU et al., 2021).

Para analisar o pH e a temperatura ótimos da atividade dessa enzima, utilizou-se o método de superfície de resposta com o delineamento experimental de Doehlert. A variável pH foi avaliada em cinco níveis (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) e a temperatura em três (30°C, 50°C e 70°C), totalizando sete experimentos, incluindo a triplicata do ponto central.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de avaliar a atividade enzimática de algumas  $\beta$ -galactosidase produzidas por fungos filamentosos, utilizou-se alguns microrganismos isolados do semiárido nordestino.

A atividade foi avaliada de modo comparativo, onde foram utilizados os resultados obtidos das absorvâncias das  $\beta$ -galactosidases intracelulares dos microrganismos, com a real atividade enzimática dessas hidrolases, pois, essa atividade é proporcional aos valores de absorvâncias obtidos, ou seja, quanto maior o valor da absorvância, maior é a ação da  $\beta$ -galactosidase produzida pelo microrganismo (VIDYA et al., 2020).

A partir da análise dos resultados obtidos (Tabela 1), observa-se que o *Aspergillus niger* apresentou maior atividade enzimática da lactase, quando comparada as outras cepas, uma vez que, apresentou valor de UA de 0,3587. Estudos semelhantes também demonstraram que o gênero *Aspergillus* tem sido utilizado por algumas na produção de lactase, devido a sua boa atividade enzimática (MURADOR, 2020).

**Tabela 1:** Atividade das  $\beta$ -galactosidases intracelular de fungos filamentosos.

Microrganismo	UA ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
<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 luteoabrina</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: Autor

Com a finalidade e de analisar a concentração de  $\beta$ -galactosidase presente em diferentes cepas, realizou-se o teste de atividade extracelular e observou-se que apenas o *Aspergillus niger* e o *Penicillium camemberti* apresentaram atividade enzimática; como apresentado na tabela 2, o *A. niger* obteve melhor resultado para esse teste.

**Quadro 2:** Atividade em micromols/min de betagalactosidases de fungos

Microrganismo	UA ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
<i>Penicillium roqueforti</i>	-----
<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i>	-----
<i>Pleurotus roseus</i>	-----
<i>Pleurotus ostreatus</i>	-----
<i>Aurificaria luteoabrina</i>	-----
<i>Ganoderma lucidum</i>	-----
<i>Lentinus Tigrinus</i>	-----

<i>Penicillium camemberti</i>	0,0016
<i>Aspergillus niger</i>	0,0101

Fonte: Autor

Após o processo de triagem dos microrganismos, realizou-se os procedimentos para a obtenção da atividade enzimática, observando as condições ótimas de temperatura e pH. Entretanto, após os experimentos não foi possível verificar a mudança de coloração da reação. Esse fato, pode estar atrelado a uma possível inviabilidade do substrato colorimétrico, uma vez que, um novo substrato foi utilizado, pois o substrato utilizado anteriormente no processo de triagem havia terminado e um novo foi adquirido. Nesse contexto, não foi possível dar continuidade aos experimentos e estudo da lactase oriunda do *Aspergillus niger*.

## CONCLUSÃO

De acordo com a triagem e os experimentos realizados, verificou-se que o *A. niger* produz lactase tanto intracelular quanto extracelular, quanto no extracelular. Sendo assim, a produção de lactase por fungos filamentosos é uma alternativa viável e de suma importância, pois, trata-se de uma enzima que melhora a qualidade de vida daqueles que possuem intolerância à lactose.

## REFERÊNCIAS

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.

MURADOR, G. K. et al. Produção de  $\beta$ -galactosidase através da *Saccharomyces fragilis* Cultivada em Soro de Queijo. *Ensaio*, v. 24, n. 4, p. 337-342, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020v24n4p337-342>.

SILVA, C.J.A; MALTA, D.J.N. **A importância dos fungos na biotecnologia**. Ciências biológicas e da saúde, Recife: v. 2, n. 3, p. 49-66, Jul 2016.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Lactase ( $\beta$ -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, v. 83, p. 88–96, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Sao Paulo: Artmed, 2017.

VIDYA, C. H. et al. Purification, characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 156, p. 885–895, 2020.

## AGRADECIMENTOS

