

APLICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO

Larissa Matos Oliveira Sanches¹, Gildomar Lima Valasques Junior²

RESUMO

As enzimas fúngicas representam mais da metade das enzimas do mercado, compartilhado nos diferentes setores industriais. Neste grupo, as hidrolases compõem as mais extensivamente estudadas e com maior demanda comercial, pois catalisam a hidrólise do seu substrato através da adição de água. A intolerância à lactose é uma condição que afeta a capacidade de digestão da lactose, ocasionando sintomas como diarreia, dor abdominal, inchaço e flatulência. Este estudo teve por objetivo purificar, imobilizar e aplicar, na deslactosação de leite, as β -galactosidases produzidas por fungos filamentosos isolados do semiárido nordestino, utilizando fermentação submersa e lactose como indutor. A Metodologia de Superfície de Resposta foi aplicada a fim de identificar as condições ótimas de obtenção de produtos deslactosados utilizando a enzima β -galactosidase produzida por *Lentinus tigrinus* CCMB 553 e *Ganoderma lucidum* CCMB 601, considerando as variáveis tempo (60 a 180 min) e concentração da enzima (5 a 15%) pelo planejamento Doehlert. As condições ótimas para a produção de leite com baixo teor de lactose foram identificadas como sendo tempos entre 80 e 110 minutos e concentração da enzima entre 9 e 15%. Assim, é possível afirmar que a β -galactosidase produzida por *Lentinus tigrinus* CCMB 553 e *Ganoderma lucidum* CCMB 601 apresenta potencial relevante para aplicação industrial, com características adequadas e resultados satisfatórios para a produção de alimentos deslactosados que podem ser utilizados por pacientes com intolerância à lactose.

PALAVRAS-CHAVE: Aplicações; β -galactosidase; caracterização; enzimas.

APPLICATION OF β -GALACTOSIDASES PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM THE BRAZILIAN SEMIARID REGION

ABSTRACT

Fungal enzymes represent more than half of the enzymes on the market, shared across different industrial sectors. Within this group, hydrolases are the most extensively studied and commercially demanded, as they catalyze substrate hydrolysis through the addition of water. Lactose intolerance is a condition that affects the ability to digest lactose, causing symptoms such as diarrhea, abdominal pain, bloating, and flatulence. This study aimed to purify, immobilize, and apply β -galactosidases produced by filamentous fungi isolated from the Brazilian semiarid region in milk delactosation, using submerged fermentation and lactose as an inducer. Response Surface Methodology was applied to identify the optimal conditions for obtaining lactose-reduced products using β -galactosidase produced by *Lentinus tigrinus* CCMB 553 and *Ganoderma lucidum* CCMB 601, considering the variables time (60 to 180 min) and enzyme concentration (5 to 15%)

through Doehlert design. The optimal conditions for producing low-lactose milk were identified as times between 80 and 110 minutes and enzyme concentrations between 9 and 15%. Thus, it can be stated that β -galactosidase produced by *Lentinus tigrinus* CCMB 553 and *Ganoderma lucidum* CCMB 601 presents relevant potential for industrial application, with suitable characteristics and satisfactory results for the production of lactose-free foods that can be consumed by patients with lactose intolerance.

KEYWORDS: Applications; β -galactosidase; Characterization; Enzymes

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos e desempenham papéis vitais na manutenção dos ecossistemas, exercendo funções essenciais na decomposição, reciclagem de nutrientes e simbiose (BAHRAM; NETHERWAY, 2022; POURIS et al., 2024). Os fungos filamentosos destacam-se pela capacidade de produzir metabólitos com aplicabilidade em diversos setores industriais, incluindo polissacarídeos, ácidos graxos poliinsaturados, enzimas, aminoácidos, vitaminas, minerais e pigmentos (DE PAZ et al., 2023; ROUSTA et al., 2024). *Lentinus tigrinus* é um cogumelo comestível com substâncias nutritivas como fibras, carboidratos, proteínas (fenilalanina, treonina e tirosina), lipídios, minerais, vitaminas, carotenoides, ácido ascórbico, tocoferóis e ergosterol (RAGASA et al., 2018).

As enzimas são amplamente empregadas nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética devido à alta especificidade, simplicidade de reações e baixos subprodutos (DUAN et al., 2022). O mercado de enzimas industriais ultrapassou 6 bilhões de dólares em 2022, com cerca de metade destinada à indústria de alimentos (SANTOS et al., 2024). As hidrolases, como amilases, lipases, celulases, proteases e poligalacturonase, são as mais estudadas e comercialmente demandadas, catalisando a hidrólise de seus substratos e sendo exploradas em setores como têxtil, bebidas, biocombustíveis e farmacêutico (EL-GENDI et al., 2022; NEVES JUNIOR et al., 2021). As enzimas, proteínas altamente especializadas, desempenham papéis cruciais em processos biológicos e industriais, como síntese de moléculas essenciais e melhoramento de procedimentos tecnológicos (MESBAH, 2022).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os fungos *Lentinus tigrinus* CCMB 553 e *Ganoderma lucindum* CCMB 601 foram obtidos da Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB), UEFS, e preservados em Ágar Batata Dextrose a 4 °C. Para produção da β -galactosidase, 1 mL de suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) foi inoculado em 100 mL de meio contendo extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L), peptona (5 g/L) e lactose (10 g/L), incubado a 28 °C por 7 dias em agitador rotativo (150 rpm). A biomassa foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min e utilizada para extração enzimática com Triton X-100 5 % por 12 h a 28 °C. A atividade da β -galactosidase foi determinada com ONPG, medindo-se o nitrofenol liberado a 420 nm. Para aplicação na deslactoseação, 10 mL de leite integral receberam 1 mL do extrato enzimático, incubado a 37 °C por 1 h, seguido de aquecimento a 100 °C por 5 min e adição de HCl 0,5 mol/L por 10 min. A glicose foi determinada pelo método glicose-peroxidase, e a porcentagem de hidrólise calculada pela razão entre a glicose na amostra tratada e na amostra controle. Os dados foram analisados com Statistic 12.0 e Microsoft Excel 2019.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores reais e codificados utilizados no planejamento experimental Doehlert, empregado para identificar as condições ótimas de aplicação da β -galactosidase na produção de leite deslactosado. Ela também mostra as respostas observadas em cada ponto experimental, bem como os valores esperados e os resíduos correspondentes.

TABELA 1-Planejamento experimental Doehlert utilizado na determinação das condições ótimas de aplicação da β -galactosidase de *L. tigrinus* na redução do teor de lactose no leite

Exp.	Tempo (min)	Enzima (%)	Resposta encontrada (P.H)	Resposta predita (P.H)	Resíduo
1	60 (-0,5)	15 (+0,866)	481,8182	489,3939	-7,5758
2	120 (+0,5)	15 (+0,866)	490,9091	483,3333	+7,5758
3	30 (-1)	10 (0)	254,5455	246,9697	+7,5758
4C	90 (0)	10 (0)	527,2727	533,3333	-6,0606

4C	90 (0)	10 (0)	554,5455	533,3333	+21,2121
4C	90 (0)	10 (0)	518,1818	533,3333	-15,1515
5	150 (+1)	10 (0)	390,9091	398,4848	-7,5758
6	60 (-0,5)	5 (-0,866)	218,1818	225,7576	-7,5758
7	120 (+0,5)	5 (-0,866)	390,9091	383,3333	+7,5758

A Tabela 2 apresenta dados semelhantes, focando na produção de leite com baixo teor de lactose, detalhando as respostas observadas da hidrólise da lactose, as respostas previstas e os resíduos, expressos em porcentagem de hidrólise (% P.I). Esses resultados permitem avaliar a eficácia da enzima e determinar as condições ideais de tempo e concentração para maximizar a deslactoseação do leite, garantindo maior aplicabilidade industrial e consistência nos produtos finais.

TABELA 2- Planejamento experimental Doehlert utilizado na determinação das condições ótimas de aplicação da β -galactosidase de *Ganoderma lucinum* CCMB 601.

Exp.	Tempo (min)	Enzima (%)	Resposta encontrada (P.H)	Resposta prevista (P.H)	Resíduo
1	60 (-0,5)	15 (+0,866)	300,0000	306,0606	-6,0606
2	120 (+0,5)	15 (+0,866)	490,9091	484,8485	+6,0606
3	30 (-1)	10 (0)	327,2727	321,2121	+6,0606
4C	90 (0)	10 (0)	536,3636	527,2727	+9,0909
4C	90 (0)	10 (0)	518,1818	527,2727	-9,0909

4C	90 (0)	10 (0)	527,2727	527,2727	0,0000
5	150 (+1)	10 (0)	563,6364	569,6970	-6,0606
6	60 (-0,5)	5 (-0,866)	245,4545	251,5152	-6,0606
7	120 (+0,5)	5 (-0,866)	327,2727	321,2121	+6,0606

CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado, observou-se que *Lentinus tigrinus* e *Ganoderma lucindum*, isolados do semiárido nordestino, apresentam potencial para produzir β -galactosidase, permitindo sua aplicação na produção de alimentos com baixo teor ou isentos de lactose. Esses microrganismos mostraram-se promissores como fontes de enzimas para a indústria alimentícia e farmacêutica, podendo ser utilizados na produção de alimentos deslactosados ou como nutracêuticos, auxiliando na digestão de produtos lácteos por pacientes com intolerância à lactose. A metodologia aplicada evidenciou a viabilidade de uso desses microrganismos na obtenção de produtos deslactosados. Pesquisas futuras poderão avaliar o potencial de outros microrganismos, além de purificar e imobilizar as enzimas obtidas, visando melhorar o rendimento da aplicação, já que a enzima imobilizada pode ser reutilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, T. L. et al. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 191, p. 881–898, 2021.
2. BANERJEE G, et. al. Chemical extraction and optimization of intracellular β galactosidase production from the bacterium *Arthrobacter oxydans* using BoxBehnken design of response surface methodology. *Acta Aliment.* v.45, p.93–103, 2016. DOI: 10.1556/066.2016.45.1.12.
3. DUAN, F. et al. Recent innovations in immobilization of β -galactosidases for industrial and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, v. 61, p. 108053, 2022.

4. DENG, Z. et al. Strategies for lactase immobilization and delivery to relieve lactose intolerance. *Trends in Food Science & Technology*, v. 143, p. 104244, 2024.
5. HASSAN, M. E. Enhancement of β -galactosidase catalytic activity and stability through covalent immobilization onto alginate/tea waste beads and evaluating its impact on the quality of some dairy products. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 278, p. 134810, 2024.
6. İNANAN, T. Cryogel disks for lactase immobilization and lactose-free milk production. *LWT*, v. 154, p. 112608, 2022.
7. LIU, W. et al. A novel cold-adapted phospho- β -galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 166, p. 760–770, 2021.
8. MIAO, M. et al. Engineering the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for making lactose-free and no-sugar-added yogurt. *Journal of Dairy Science*, 2024.
9. SANTOS, et al. Production, characterization and application of polygalacturonase produced by *Lentinus tigrinus* CCMB 553. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 58, p. 103216, 2024.
10. SHI, X. et al. Engineering the optimum pH of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 6, 2022.
11. VENKATESWARULU, T. C. et al. Biochemical and molecular characterization of lactase producing bacterium isolated from dairy effluent. *Journal of King Saud University*, v. 32, p. 1581–158, 2020.
12. WAHAB, W. A. A. et al. Low-lactose yoghurt production using β -galactosidase: An integrated study for the enzyme and its application. *International Dairy Journal*, v. 151, p. 105864, 2024.
13. ZAMMAN, U. et al. Identification, kinetics and thermodynamic analysis of novel β -galactosidase from *Convolvulus arvensis* seeds: An efficient agent for delactosed milk activity. *International Journal*, 2024.