

## PROSPECÇÃO DE BETA GALACTOSIDASE EM ESPÉCIES DE *PENICILLIUM*

Gabriel Bandoch (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Wagner Mansano Cavalini. (Pós-graduando - PBC), Cristina Giatti Marques de Souzailva (Orientador), e-mail: gabrielbandoch@gmail, cgmsouza@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas /Maringá, PR.

### Bioquímica- Bioquímica de Microrganismos

**Palavras-chave:** lactase, *P. notatum*, hipolactasia

#### Resumo:

A enzima  $\beta$ -galactosidase tem grande importância comercial, uma vez que a hidrólise da lactose é de interesse da indústria de alimentos, a fim de proporcionar o consumo de produtos lácteos por intolerantes à lactose, bem como evitar a cristalização do leite condensado. A  $\beta$ -galactosidase também catalisa a reação de transgalactosilação, onde a lactose serve como doador de galactosil e um aceptor para formar di, tri ou galactooligossacarídeos. Atualmente, os galactooligossacarídeos (GOS) têm sido considerados prébióticos com ação benéfica ao intestino, porque a presença destas biomoléculas favorece o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos no cólon intestinal. Embora a lactose seja um dissacarídeo comum do leite, a  $\beta$ -galactosidase tem ampla distribuição entre bactérias e fungos. O fungo filamentosos *Aspergillus oryzae* é um excelente produtor da enzima juntamente com a levedura *Kluyveromyces lactis*. Outras espécies de fungos são produtoras, como as do gênero *Penicillium*. O objetivo deste trabalho foi prospectar a enzima  $\beta$ -galactosidase em diferentes espécies de *Penicillium*. Seis isolados foram inoculados em placas de petri contendo meio EPL, deixados em estufa a 28 °C por 2-3 dias. O reagente cromogênico da glicose oxidase/peroxidase foi adicionado sobre as colônias para revelar a presença de glicose. *P. notatum* se destacou em relação ao crescimento e produção da enzima formando halo de cor rosa. Em meio mínimo de Vogel e lactose a 2%, o melhor tempo para produção da enzima foi o de quatro dias (0,15 U/mL), sendo que a principal produção foi intracelular, no entanto se faz necessário estudo de otimização da produção.

#### Introdução

A enzima  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23,  $\beta$ -galactosídeo galactohidrolase) tem grande importância comercial uma vez que a hidrólise da lactose é de interesse da indústria de alimentos. Esta enzima tem habilidade em clivar resíduos D-galactosil de polímeros, como polissacarídeos, oligossacarídeos ou metabólitos secundários. As  $\beta$ -galactosidases polissacarídeo-específicas incluem aquelas que atacam polímeros pécticos e xiloglucanos (Housein, 2002). A principal aplicação é na indústria de alimentos para obtenção de leite e derivados sem lactose a fim de proporcionar o consumo por indivíduos intolerantes à lactose. A enzima também é

utilizada para evitar a cristalização da lactose no leite condensado. Outra reação catalisada pela  $\beta$ -galactosidase é a reação de transgalactosilação em que a lactose serve como doador de galactosil e um aceptor para formar di, tri ou galacto-oligossacarídeos (GOS). Atualmente os GOS têm sido considerados prébióticos com ação benéfica no cólon intestinal exercendo papel de fibra (Santos, 2009). A lactase comercial é produzida por microrganismos. Entre os fungos filamentosos a  $\beta$ -galactosidase de *A. oryzae* já é bem caracterizada e utilizada em formulações para uso doméstico. Os fungos do gênero *Penicillium* são considerados promissores produtores de compostos bioativos de diferentes classes (Park et. al, 2016). Alguns estudos com o gênero mostram que também são produtores de  $\beta$ -galactosidases (Nagy et.al, 2001). Desta forma, o objetivo deste estudo foi prospectar a enzima  $\beta$ -galactosidase em espécies de *Penicillium*.

## Materiais e métodos

**Seleção:** foram avaliados os isolados de *P. veridicatum*, *P. griseum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. notatum* (Banco de isolados do LBM-DBQ/UEM). Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio EPL (extrato de levedura, peptona e lactose 1%). As placas permaneceram em estufa a 28 °C até a formação de colônias (2-5 dias). Uma camada de agarose (0,45%) combinada ao reagente da glicose oxidase/peroxidase na proporção de 7:3, foi sobreposta às placas inoculadas. A formação de um halo cor de rosa indicou a presença da glicose originada da hidrólise da lactose.

**Manutenção e cultivo:** os fungos foram mantidos em tubos inclinados com meio de BDA. Para o cultivo em meio líquido, foram repicados no mesmo meio e deixados para crescer em estufa a 28±2 °C. Após 5-7 dias uma suspensão de esporos foi preparada acrescentando-se 10 mL de água destilada ao tubo com o fungo e 1 mL da suspensão ( $1 \times 10^6$  esporos) foi inoculado em meio líquido contendo sais de Vogel (1956) e lactose 2%. Após inoculo, os frascos permaneceram em incubadora com agitação orbital a 28 ± 2 °C por tempo determinado.

**Determinação da atividade da  $\beta$ -galactosidase:** o micélio, separado do meio de cultura por filtração, foi macerado com areia e tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,5 e centrifugado em centrifuga refrigerada. Cem microlitros do extrato foram acrescentados a 500 $\mu$ L de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (1mg/mL) preparado no mesmo tampão. A mistura foi incubada a 40 °C por 30 minutos. Para interromper a reação 2 mL de uma solução de tetraborato de sódio saturada foi acrescentada e a absorbância lida a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de o - nitrofenol por mL por minuto de reação (U/mL).

## Resultados e Discussão

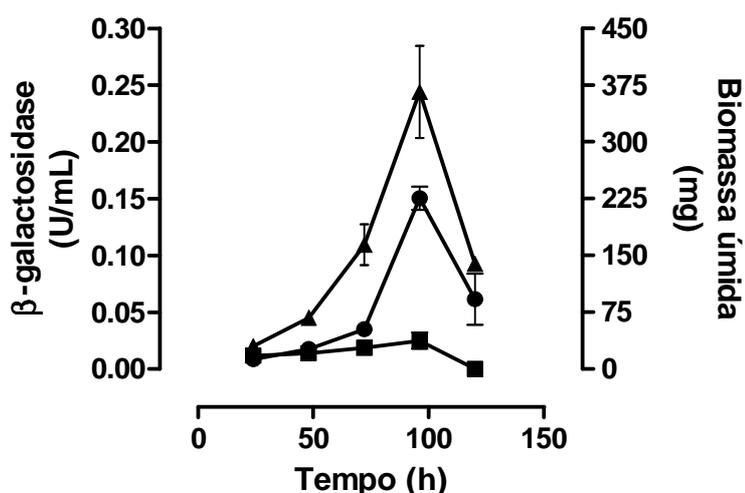
Os fungos escolhidos para o trabalho apresentaram os resultados do teste em meio sólido EPL conforme quadro abaixo:

**Quadro 1.** Prospecção de fungos produtores de  $\beta$  - galactosidase

| Fungo                  | Intensidade da cor | Tempo para aparecimento da cor |
|------------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>P. chrysogenum</i>  | +++                | 1 hora                         |
| <i>P. expansum</i>     | +                  | 6 horas                        |
| <i>P. griseofulvum</i> | +++                | 6 horas                        |
| <i>P. griseum</i>      | +                  | 6 horas                        |
| <i>P. notatum</i>      | +++                | 6 horas                        |
| <i>P. veridicatum</i>  | ++                 | 6 horas                        |

(+++) rosa; (++) pouco rosa; (+) rosa bem fraco

Os fungos foram avaliados em meio líquido contendo sais de Vogel e lactose 2% por 3 dias. *P. notatum* produziu a maior quantidade de enzima (0,14 U/mL) intracelular comparado aos demais isolados. Embora *P. chrysogenum* seja uma espécie citada na literatura por produzir a  $\beta$ -galactosidase intracelular, o fungo não se desenvolveu no meio utilizado. Para os demais fungos avaliados a atividade foi inferior a 0,017 U/mL. Uma curva de crescimento foi realizada para verificar qual melhor tempo de cultivo para a produção da enzima por *P. notatum* (Figura 1). O melhor tempo para produção foi o de quatro dias (0,15 U/mL). Em seguida a produção caiu drasticamente assim como houve queda no crescimento microbiano. Outros trabalhos na literatura também mostram maior produção entre o terceiro e o quarto dias de cultivo. A lactose foi pouco consumida durante o período de cultivo (dados não mostrados) e quase não houve secreção da enzima para o meio extracelular. Na maioria dos fungos a  $\beta$ -galactosidase é intracelular.



**Figura 1** – Curva de crescimento de *P. notatum* em meio de Vogel+lactose 2%. (●)  $\beta$ -galactosidase intracelular; (■)  $\beta$ -galactosidase extracelular; (▲) biomassa úmida. Resultados expressos como média e desvio padrão de cultivos realizados em duplicatas.

## Conclusões

O melhor isolado para a produção de  $\beta$ -galactosidase mostrou ser o *P. notatum* com crescimento mais rápido e halo reativo em meio sólido, no entanto em meio líquido a produção mostrou-se pequena. Modelos de otimização das condições de cultivo em meio líquido necessitam ser utilizados para obtenção de maior quantidade de enzima para fins de produção e aplicação industrial.

## Agradecimentos

PPG/UEM; CNPq; Capes/UEM

## Referências

HUSAIN, Q.  $\beta$  Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, Edinburgh, v. 30, n.1, p. 41–62, 2010.

NAGY, Z., KISS, T., SZENTIRMAI, A., BIRÓ, S. Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam v. 21, p. 24 –29, 2001.

PARK, M. S., SEOBHIN, L., OH,S-Y., CHO, Y. G., LIM,Y. W. Diversity and enzyme activity of *Penicillium* species associated with macroalgae in Jeju Island, **Journal of Microbiology**, Berlin, v. 54, p. 646–654, 2016.

SANTOS, R., SIMIQUELI, A. P. R., PASTORE, G. M. Produção de galacto-oligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 29, n.3, p. 682-686, 2009.

VOGEL, H.J., A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, Ohio, v.13, p. 42-43, 1956.