

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZ FELIPE DE MORAIS COSTA DE JESUS

Produção de β -galactosidase por fungos filamentosos: *screening*, purificação e
caracterização bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA – SP

2020

LUIZ FELIPE DE MORAIS COSTA DE JESUS

Produção de β -galactosidase por fungos filamentosos: *screening*, purificação e caracterização bioquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

J58p Jesus, Luiz Felipe de Moraes Costa de
 Produção de beta-galactosidase por fungos filamentos:
screening, purificação e caracterização bioquímica / Luiz Felipe de
Moraes Costa de Jesus. – Araraquara : [s.n.], 2020
 126 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
 Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

 1. Enzimas. 2. Fungos filamentosos. 3. Beta-galactosidase.
4. Soro do leite. 5. Oligossacarídeos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de -galactosidase por fungos filamentosos: *screening*, purificação e caracterização bioquímica"

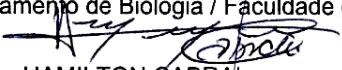
AUTOR: LUIZ FELIPE DE MORAIS COSTA DE JESUS

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto


Prof. Dr. HAMILTON CABRAL

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto


Prof.ª Dr.ª KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 28 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Luiz Felipe de Moraes Costa de Jesus

Nome em citações bibliográficas: JESUS, L. F. M. C.; DE JESUS, L. F. M. C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP. Avenida Bandeirantes, 3900. Vila Monte Alegre, 14040-901 – Ribeirão Preto/SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018 – 2020 - Mestrado em andamento em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Produção de β -galactosidase por fungos filamentosos: *screening*, purificação e caracterização bioquímica, Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães.

2012 – 2017 - Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil. Título: Imobilização de lipase de *Candida rugosa* e *Candida viswanathii* em esferas de alginato de cálcio e produção de éster com atividade antioxidante. Orientador: Ezequiel Marcelino da Silva.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016 - Produção de Cerveja. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2016 - Estação de tratamento de esgoto. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2016 - Estação de tratamento de água e esgoto. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2016 - Produção de Etanol de segunda geração: O pré-tratamento e as etapas biotecnológicas. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016 - Produção de Cerveja. (Carga horária: 2h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2016 - Estação de tratamento de água. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2015 - Vacinas de DNA - da Construção a Produção. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015 - Terapia Gênica: DNA recombinante e silenciamento gênico. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015 - Produção de Etanol de Segunda Geração: Desafios Tecnológicos e Novas Perspectivas. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015 - Oficina de Cervejas: Estilos, Mitos e Harmonização. (Carga horária: 5h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015 - Desenvolvimento de Biomateriais para Mucosa Bucal. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015 - Órgãos Artificiais e Biomecânica. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014 - Introdução à Análise de Proteínas de Defesa de Plantas. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 - Biocombustível uma alternativa energética. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 - Nanomateriais: Estruturas, Propriedades e Aplicações. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2016 – 2017 – Voluntário do Programa de Iniciação Científica. Título do Projeto: Imobilização de lipase de *Candida rugosa* e *Candida viswanathii* em

esferas de alginato de cálcio e produção de éster com atividade antioxidante. Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

2014 – 2015 - Bolsista do Programa de Extensão. Título do Projeto: I Mini Feira e Mostra de Ciências Genéticas da UFT. Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

JESUS, L. F. M. C.; FERREIRA, L. A.; DECHANDT, C. R. P. Degradação lignocelulósica por hidrólise enzimática visando à produção de Etanol. Revista Técnico-Científica do IFSC, v. 2, p. 52-61, 2019.

Resumos publicados em anais de congressos

JESUS, L. F. M. C.; ORNELA, P. H. O. ; GUIMARAES, L. H. S. Optimization of the β -galactosidase production by *Trichoderma* sp. under solid-state fermentation using CCRD. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

JESUS, L. F. M. C.; GUIMARAES, L. H. S. Production and purification of β -galactosidase from *Trichoderma* sp. under submerged fermentation using whey as carbon source. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

JESUS, L. F. M. C.; SILVA, V. T. F.; SILVA, E. M. Lipases de *Candida* sp. imobilizadas em esferas de alginato de cálcio por ligação covalente. In: III Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2018. v. 39.

JESUS, L. F. M. C.; SILVA, A. F.; SILVA, V. C. F.; APOSTOLOVA, K. H. Elucidação das Ciências Genéticas através de uma Feira de Ciências em Gurupi - TO. In: VI Congresso Farmacêutico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016, Araraquara. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies. Araraquara: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2016. v. 37.

JESUS, L. F. M. C.; ALMEIDA, S. G. C.; FELIX, M. K. C.; CARRIJO, R. S.; AGUIAR, R. W. S.; VIANA, K. F.; BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, A. S. R. Seleção de fungos filamentosos com atividade de poligalacturonase. In: V Congresso Farmacêutico da UNESP e I Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas. Araraquara: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2015. v. 36.

Apresentação de Trabalhos

JESUS, L. F. M. C.; GUIMARAES, L. H. S. Production and purification of β -galactosidase from *Trichoderma* sp. under submerged fermentation using whey as carbon source. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

JESUS, L. F. M. C.; ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Optimization of the β -galactosidase production by *Trichoderma* sp. under solid-state fermentation using CCRD. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

JESUS, L. F. M. C.; SILVA, V. T. F.; SILVA, E. M. Lipases de *Candida* sp. imobilizadas em esferas de alginato de cálcio por ligação covalente. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

JESUS, L. F. M. C.; SILVA, A. F.; SILVA, V. C. F.; APOSTOLOVA, K. H. Elucidação das Ciências Genéticas através de uma Feira de Ciências em Gurupi - TO. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

JESUS, L. F. M. C.; APOSTOLOVA, K. H. I Mini Feira e Mostra de Ciências Genéticas da UFT. 2016. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

JESUS, L. F. M. C.; ALMEIDA, S. G. C.; FELIX, M. K. C.; CARRIJO, R. S.; VIANA, K. F.; BARBOSA, L. C. B.; AGUIAR, R. W. S.; CANGUSSU, A. S. R. Seleção de fungos filamentosos com atividade de poligalacturonase. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTOS, K. S.; **JESUS, L. F. M. C.**; REIS, M. P. Inúmeras aplicações na medicina tradicional popular e silvícola a partir de óleo-resina da copaíba. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO DE EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

Congresso Brasileiro de Microbiologia. Production and purification of β -galactosidase from *Trichoderma* sp. in submerged fermentation using whey as carbon source. 2019. (Congresso).

VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Lipases de *Candida* sp. imobilizadas em esferas de alginato de cálcio por ligação covalente. 2018. (Congresso).

II Semana Acadêmica de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. 2016.

VI Congresso Farmacêutico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Elucidação das ciências genéticas através de uma feira de ciências em Gurupi-TO. 2016. (Congresso).

V Congresso Farmacêutico da UNESP. Seleção de fungos filamentosos com atividade de poligalacturonase. 2015. (Congresso).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Laudecy, por todo apoio, dedicação, amor e carinho durante toda a minha vida. Esta vitória é sua mamãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por toda a força, proteção, amor e por me conceder a oportunidade de realizar esta etapa tão importante para mim.

À minha mamãe Laudecy de Moraes, razão do meu viver, agradeço a Deus por tê-la em minha vida! Obrigado pelos ensinamentos, apoio, por sempre acredita em mim e pelo seu grande amor. Você é meu exemplo de vida! Te amo imensamente e eternamente.

Ao meu irmão, Luiz Eduardo, por vim a este mundo juntamente comigo, por todo apoio e carinho. Esta conquista é sua também!

Aos meus avós, Maria e Adolfo, por todo amor, carinho e ensinamentos. Obrigado pela constante dedicação a nossa família. Sou tão grato por fazer parte desta família.

A minha tia, Edilene Moraes, uma mulher guerreira que faz de tudo para sempre manter a família unida, sua alegria me contagia. Obrigado por todo apoio, carinho e amor.

Aos meus tios, Antônio Moraes, Antônio Edson e Edmilson por todo apoio, ensinamento e carinho durante toda minha vida.

Aos meus primos, Adriel, Marcela e Victor Gabriel que são mais que primos, são meus irmãos mais novos. Obrigado por todo carinho!

À minha prima Alinne, minha irmã de vida. Obrigado por todo amor e carinho. Obrigado por ser minha companhia nas férias, pelas conversas e risadas. Amo você demais!

Ao meu Pai, Ocevaldo, por todo apoio financeiro, que mesmo não sendo próximos, foi uma das pessoas essenciais para a conclusão desta etapa e por sempre estar presente nas realizações dos meus sonhos.

À Carlos Roberto, o presente que Ribeirão Preto me deu. Obrigado por todo apoio, companheirismo, amizade e por sempre acreditar no meu potencial. Obrigado por sempre estar presente no meu dia a dia, por escutar minhas

reclamações diárias e pelos conselhos sempre otimistas. Você foi essencial para esta conquista!

À Leandro Ribeiro, um grande amigo que São Paulo me presenteou. Obrigado pelos momentos compartilhados, pela amizade e conversas. São 2 anos de convivência com muitas alegrias, tristezas e discussões, mas não poderia ter um melhor roommates do que você!

À Larissa Damacena, minha amiga de vida, obrigado por todo amor, carinho e pela torcida, por sempre estar junto de mim e por fazer minhas férias sempre mais felizes. Te amo demais!

À Raiza Ticiane, obrigado pela amizade, carinho e pela torcida, que apesar da distância sempre está junto de mim.

Às minhas amigas Camila, Karen e Sâmilla, obrigado pela amizade, conversas e carinho. Obrigado por sempre me acolherem as minhas idas a Araraquara e tornar tudo o mais divertido possível.

Às minhas amigas Samara e Verônica, obrigado por todos os momentos compartilhados, amizade e carinho.

À Isabela Amatto, esta pessoa de Luz que o destino me presenteou. Obrigado amiga pela amizade, carinho e pelos melhores conselhos otimistas. Obrigado por tornar meus dias mais leves e felizes. Agradeço a Deus pela sua amizade. Você é luz Isa.

À Chadia Maestrello, uma grande amizade que São Paulo me reservou. Obrigado por todos momentos compartilhados, pela sua amizade e carinho, por sempre me ajudar sem medir esforços. Agradeço muito a Deus por sua amizade. Melhor pessoa!

À Rayza Morganna, minha grande amiga paraibana. Obrigado pela amizade, carinho e momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. Obrigado por me entender e as vezes reclamar de São Paulo comigo. Te admiro demais, sua nordestina forte e guerreira!

À Camila Guedes, minha amiga que iniciou essa jornada do mestrado juntamente comigo. Obrigado pela amizade, conversas e companhias durante as idas a Araraquara.

À Fernanda Aracri, obrigado por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório, pela sua amizade, brincadeiras e risos.

À Pedro Henrique, obrigado pelo companheirismo, pelas conversas, brincadeiras e por sempre está disposto a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Luís Henrique, pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos e orientação. Sou muito grato! Muito Obrigado!

Ao técnico Maurício, pelo auxílio e suporte no laboratório durante o desenvolvimento deste projeto.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Química da Unesp-Araraquara por estarem sempre a disposição quando foi necessário, em especial aos secretários da Pós-Graduação em Biotecnologia, pela atenção.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, Muito obrigado!

*“Aprender a dizer “não” é uma arte.
É não sentir-se egoísta pelo fato de
atender primeiros às suas
necessidades.”*

Fred Elboni

RESUMO

Conhecida por sua importância na indústria de alimentos e no tratamento de pessoas intolerantes a lactose, a enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) promove a hidrólise da lactose nos monossacarídeos galactose e glicose. Algumas β -galactosidases ainda catalisam reações de transgalactosilação produzindo galactooligossarídeos (GOS), que são prebióticos. Diante disto, este estudo visou à seleção de uma linhagem de fungo filamentoso produtora de β -galactosidase, seguida da caracterização e aplicação da enzima no tratamento de efluente da indústria láctea. Entre as 10 linhagens de fungos filamentosos inicialmente estudadas, *Trichoderma* sp. foi o melhor produtor de β -galactosidase, sendo cultivado em Fermentação Submersa (FSbm) e Fermentação em Estado Sólido (FES). A maior produção de β -galactosidase por este fungo em FSbm (28 U/L) foi obtida em meio Nakao-lactose modificado adicionado de 3% (v/v) de soro de leite, pH inicial ajustado para 6, mantido sob agitação (120 rpm) por 312 h, a 30 °C. Quando utilizada FES a maior produção enzimática, 2,67 U/g de substrato, foi observada na presença de farelo de trigo umedecido com água de torneira (1:1,65; m/v), mantido a 30 °C por 187 h. A β -galactosidase produzida em FSbm apresentou temperatura ótima de atividade de 55 °C e tempo de meia vida (T_{50}) de 90 min de 35-45 °C. O pH ótimo aparente de atividade foi 4,2 e T_{50} de 180 min quando mantida em pH 4. A atividade enzimática foi aumentada na presença de Mn^{2+} e inibida na presença de íons ferro e de SDS. A β -galactosidase produzida em FES apresentou temperatura e pH ótimos de atividade de 55°C e 4,5, respectivamente. A atividade catalítica foi mantida por até 180 min quando incubada nas temperaturas de 35-45 °C, e acima de 50% quando mantida em pH ácidos e alcalinos por até 24 h. Ainda apresentou resistência a diversos compostos químicos. As β -galactosidases produzidas em FSbm e FES foram capazes de hidrolisar o soro de queijo oriundo da indústria láctea, reduzindo o teor de lactose. Além disto, a β -galactosidase produzida via FES catalisou reação de transgalactosilação, produzindo GOS. Deste modo, o fungo *Trichoderma* sp. mostrou-se como um interessante produtor de β -galactosidases com propriedades importantes para possíveis aplicações industriais.

Palavras-chaves: β -galactosidase; *Trichoderma*; GOS; transgalactosilação.

ABSTRACT

The enzyme β -galactosidase (EC 3.2.1.23), known because its importance in the food industry and in the treatment of lactose intolerant people, promotes the hydrolysis of lactose in the monosaccharides galactose and glucose. Some β -galactosidases also catalyze transgalactosylation reactions producing galactooligosaccharides (GOS), which are prebiotics. In view of this, this study aimed the selection of a strain of filamentous fungus producing β -galactosidase, followed by characterization and application of the enzyme in the treatment of effluent from the dairy industry. Among the 10 strains of filamentous fungi initially studied, *Trichoderma* sp. was the best producer of β -galactosidase, being grown in Submerged Fermentation (SbmF) and Solid State Fermentation (SSF). The greatest production of β -galactosidase by this fungus in SbmF (28 U/L) was obtained in modified Nakao-lactose medium added with 3%(v/v) whey, initial pH adjusted to 6, kept under agitation (120 rpm) for 312 h at 30 °C. When SSF was used, the highest enzyme production, 2.67 U/g of substrate was observed in the presence of wheat bran moistened with tap water (1:1.65; w/v), maintained at 30 °C for 187 h. The β -galactosidase produced in SbmF showed optimum activity at 55 °C and half-life (T_{50}) of 90 min from 35-45 °C. The apparent optimum pH of activity was 4.2 and T_{50} of 180 min when maintained at pH 4. The enzymatic activity was increased by Mn^{2+} and inhibited by iron ions and SDS. The β -galactosidase produced in SSF had optima temperature and pH of activity at 55 °C and 4.5, respectively. The catalytic activity was maintained for up to 180 min when incubated from 35-45 °C, and above 50% when maintained at acidic and alkaline pH for up to 24 h. It also presented resistance to several chemical compounds. The β -galactosidases produced in SbmF and SSF were able to hydrolyze the cheese whey from the dairy industry, reducing its lactose content. In addition, β -galactosidase produced via FES catalyzed the transgalactosylation reaction, producing GOS. Thus, the fungus *Trichoderma* sp. was an interesting producer of β -galactosidases with important properties for possible industrial applications.

Keywords: β -galactosidase; *Trichoderma*; GOS; transgalactosylation.

ABREVIATÓES

°C – graus Celsius	Mm – milímetro
BDA - Batata Dextrose Ágar	mg – miligrama
BSA – Albumina de Soro Bovino	mmol.L ⁻¹ – milimolar
cm - centímetros	min – minutos
DEAE - Diethylaminoethyl	m/v - massa por volume
DTT – ditiotreitól	PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
EDTA – ácido etileno diamino tetracético	pH – potencial hidrogeniônico
FES – Fermentação em Estado Sólido	rpm – rotações por minuto
FSbm – Fermentação Submersa	s – segundo
h - horas	SDS – dodecil sulfato de sódio
g – grama	SR – Segato Rizzatti
<i>g – força centrífuga</i>	v/v – volume por volume
GOS - Galactooligossacarídeos	µg – micrograma
kDa - mil Daltons	µL – microlitros
L – litros	µmol – micromol
M – molar	U - unidade de atividade
MM – Meio Mínimo	UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular básica dos isômeros α -lactose e β -lactose.....	23
Figura 2 - Mecanismo de hidrólise e absorção da lactose no organismo.	25
Figura 3 - Rotas de conversão da lactose pela enzima β -galactosidase.....	27
Figura 4 - Estrutura tridimensional do monômero de β -galactosidase de <i>Trichoderma reesei</i>	29
Figura 5 - Mecanismo de reação da β -galactosidase na formação de GOS. ...	36
Figura 6 - Esquema simplificado dos experimentos realizados.	39
Figura 7 - Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -galactosidase extracelular.	59
Figura 8 - Efeito da concentração do soro de leite na produção de β -galactosidase extracelular em FSbm por <i>Trichoderma</i> sp.	61
Figura 9 - Influência do tempo de cultivo do fungo <i>Trichoderma</i> sp. na produção de β -galactosidase extracelular.	63
Figura 10 - Produção de β -galactosidase extracelular por <i>Trichoderma</i> sp. em função de diferentes fontes de nitrogênio	64
Figura 11 - Perfil cromatográfico em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-celulose	67
Figura 12 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% para fração contendo β -galactosidase secretada por <i>Trichoderma</i> sp.	67
Figura 13 - Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Sepharose CL-6B para a β -galactidase extracelular produzida por <i>Trichoderma</i> sp.	71
Figura 14 - Perfil proteico obtido por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 10%) para β -galactosidase extracelular produzida por <i>Trichoderma</i> sp.	72
Figura 15 - Influência da temperatura e do pH na atividade da β -galactosidase secretada pelo fungo <i>Trichoderma</i> sp. em FSbm.	74
Figura 16 - Estabilidade térmica da β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp. produzida em FSbm	76
Figura 17 - Estabilidade ao pH da β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp. produzida em FSbm	77
Figura 18 - Tratamento do soro de queijo com filtrado bruto contendo β -galactosidase de <i>Trichoderma</i> sp.	81

Figura 19 - Perfil cromatográfico em camada delgada dos produtos de reação obtidos pela ação da β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp.	83
Figura 20 - Perfil cromatográfico em High Performace Liquid Chromatography dos produtos de reação da β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp.	84
Figura 21 - Gráfico de Pareto das variáveis independentes sobre a atividade enzimática da β -galactosidase produzida por <i>Trichoderma</i> sp. em FES.....	92
Figura 22 - Gráficos de contorno	93
Figura 23 - Influência da temperatura e do pH na atividade da β -galactosidase extracelular do fungo <i>Trichoderma</i> sp. em FES	96
Figura 24 - Determinação da estabilidade térmica e ao pH da β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp. produzida em FES	97
Figura 25 - Tratamento do soro de queijo usando extrato bruto contendo β -galactosidase de <i>Trichoderma</i> sp.....	101
Figura 26 - Perfil cromatográfico em camada delgada dos produtos de hidrólise do soro de queijo pela β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp.....	103
Figura 27 - Perfil cromatográfico em High Performace Liquid Chromatography dos produtos de hidrólise do soro de queijo pela β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp.	104
Figura 28 - Perfil cromatográfico em camada delgada dos produtos de transgalactosilação da lactose pela β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp. em FES.....	105
Figura 29 - Perfil cromatográfico em High Performace Liquid Chromatography da produção de GOS catalisada pela β -galactosidase extracelular de <i>Trichoderma</i> sp. cultivado em FES	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de espécies de fungos filamentos produtores de β -galactosidase.	32
Tabela 2 - Níveis e valores das variáveis independentes tempo de cultivo, concentração de esporos usados no inóculo e proporção entre substrato sólido e solução umectante usados no planejamento experimental (DCCR).	47
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2^3 (DCCR).	48
Tabela 4 - Seleção de fungos filamentosos produtores de β -galactosidase pelo método de ensaio em placa.	55
Tabela 5 - Produção de β -galactosidase por diferentes fungos filamentosos cultivados em FSbm.	57
Tabela 6 - Purificação da β -galactosidase extracelular produzida por <i>Trichoderma</i> sp. em FSbm.	67
Tabela 7 - Precipitação de β -galactosidase em diferentes concentrações de sulfato de amônio.	69
Tabela 8 - Purificação da β -galactosidase extracelular produzida por <i>Trichoderma</i> sp. em FSbm.	71
Tabela 9 - Efeito de diferentes sais na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo <i>Trichoderma</i> sp. cultivado em FSbm.	78
Tabela 10 - Efeito de diferentes compostos químicos na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo <i>Trichoderma</i> sp. cultivado em FSbm	80
Tabela 11 - Produção de β -galactosidase em FES por <i>Trichoderma</i> sp. em função do substrato sólido.	86
Tabela 12 - Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FES sobre a produção de β -galactosidase extracelular por <i>Trichoderma</i> sp.	88
Tabela 13 - Matriz do delineamento composto central rotacional.	90
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade de β -galactosidase produzida por <i>Trichoderma</i> sp. em FES segundo o DCCR.	91
Tabela 15 - Valores mínimos e máximos testados, e valores críticos de tempo de cultivo, concentração do inóculo e proporção entre substrato sólido e solução umectante para máxima produção de β -galactosidase.	94

Tabela 16 - Efeito de diferentes sais na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo <i>Trichoderma</i> sp. cultivado em FES.....	99
Tabela 17 - Efeito de compostos químicos na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo <i>Trichoderma</i> sp. cultivado via FES	100
Tabela 18 - Parâmetros gerais das β -galactosidases produzidas por <i>Trichoderma</i> sp. cultivado em FSbm e FES.....	107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Lactose.....	23
1.2 Intolerância à lactose	24
1.3 A enzima β -galactosidase	27
1.4 Aplicações da β -galactosidase.....	32
1.4.1 Hidrólise da lactose	33
1.4.2 Produção de Galactooligossacarídeos (GOS).....	35
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivos geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Manutenção das linhagens em laboratório.....	40
3.2 Preparo da suspensão de esporos	40
3.3 Seleção de fungos filamentosos produtores de β -galactosidase	40
3.3.1 Seleção qualitativa em meio solidificado	40
3.3.2 Seleção quantitativa em caldo	41
3.4 Obtenção do filtrado extracelular e do extrato intracelular	41
3.5 Determinação da atividade enzimática.....	42
3.6 Quantificação de proteínas	42
3.7 Produção de β -galactosidase por fungo filamentoso em Fermentação Submersa (FSbm)	43
3.7.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de β -galactosidase em FSbm.....	43
3.7.2 Produção de β -galactosidase em função do tempo de cultivo em FSbm	43
3.7.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de β -galactosidase em FSbm.....	44
3.7.4 Produção de β -galactosidase em FSbm em função do meio de cultivo	44
3.8 Purificação de β -galactosidase secretada por <i>Trichoderma</i> sp. em FSbm	44
3.8.1 Precipitação com sulfato de amônio	44
3.8.2 Purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) ...	45
3.8.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephacrose CL-6B)	45
3.9 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	45
3.10 Produção de β -galactosidase em Fermentação em Estado Sólido (FES)	46

3.11	Planejamento experimental.....	47
3.12	Caracterização bioquímica parcial das β -galactosidases secretadas por <i>Trichoderma</i> sp. em FSbm e FES	49
3.12.1	Influência da temperatura e do pH ótimos na atividade enzimática	49
3.12.2	Avaliação da termoestabilidade e estabilidade ao pH	49
3.12.3	Influência de diferentes compostos na atividade β -galactosidásica	49
3.13	Aplicação das β -galactosidases secretadas por <i>Trichoderma</i> sp. ...	50
3.13.1	Hidrólise do efluente de indústria de queijos	50
3.13.2	Produção de Galactooligosacarídeos (GOS).....	50
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Seleção de fungos filamentosos produtores de β -galactosidase	54
4.2	Produção de β -galactosidase extracelular por <i>Trichoderma</i> sp. cultivado em FSbm	58
4.2.1	Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de β -galactosidase extracelular	58
4.2.2	Produção de β -galactosidase extracelular em função do tempo de cultivo	61
4.2.3	Influência das fontes de nitrogênio na produção de β -galactosidase extracelular em FSbm	63
4.2.4	Influência de diferentes meios de cultura na produção de β -galactosidase	65
4.3	Purificação de β -galactosidase secretada por <i>Trichoderma</i> sp.....	66
4.3.1	Cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)	66
4.3.2	Precipitação com sulfato de amônio 40-60%.....	68
4.3.3	Cromatografia de exclusão molecular (Sephacrose CL-6B).....	69
4.4	Caracterização bioquímica da β -galactosidase secretada por <i>Trichoderma</i> sp. em FSbm	73
4.4.1	Influência da temperatura e do pH sobre a atividade da β -galactosidase	73
4.4.2	Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH.....	75
4.4.3	Influência de diferentes sais e outros compostos na atividade β -galactosidásica.....	77
4.5	Aplicações da β -galactosidase.....	80
4.5.1	Hidrólise do efluente de indústria láctea	80
4.5.2	Produção de Galactooligosacarídeos (GOS).....	81
4.6	Produção de β -galactosidase em Fermentação em Estado Sólido (FES) por <i>Trichoderma</i> sp.	86
4.7	Influência das soluções umectantes na produção de β -galactosidase	87

4.8	Otimização das condições de cultivo de <i>Trichoderma</i> sp. em FES utilizando o Planejamento Experimental	88
4.9	Caracterização bioquímica da β -galactosidase extracelular produzida por <i>Trichoderma</i> sp. em FES.....	94
4.9.1	Influência da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática .	94
4.9.2	Determinação da estabilidade térmica e estabilidade ao pH da β -galactosidase extracelular	96
4.9.3	Influência de diferentes sais e outros compostos na atividade β -galactosidásica extracelular	97
4.10	Aplicação da β -galactosidase	100
4.10.1	Hidrólise do efluente de indústria láctea	100
4.10.2	Produção de galactooligossacarídeo (GOS)	104
4.11	Comparação das β -galactosidasas.....	107
5.	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	109

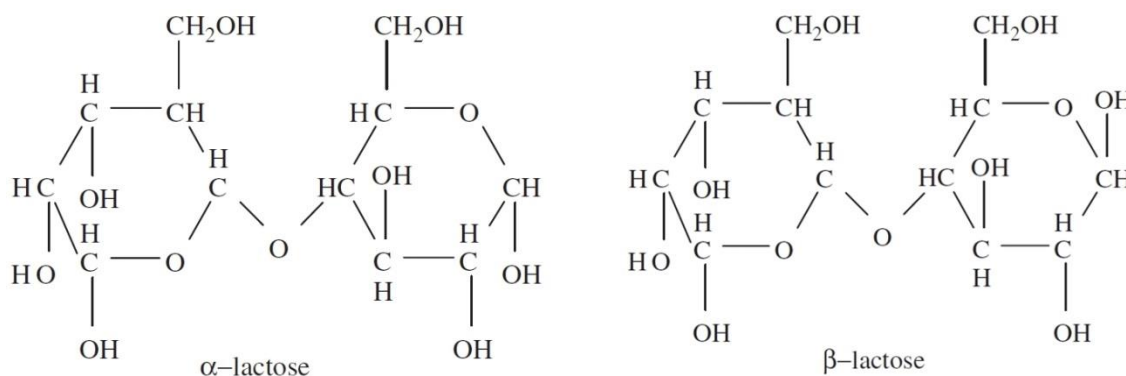
1. INTRODUÇÃO

1.1 Lactose

A lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopirranose) é um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical α -D-glicose unidos por ligação glicosídica β -1,4 (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; KLEIN et al., 2013; NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017; GOMES, 2018). Esse dissacarídeo possui um carbono anomérico associado à glicose e que não está envolvido na ligação glicosídica. Desta forma, a lactose é considerada um açúcar redutor por estar livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000).

Este dissacarídeo pode ser encontrado em duas formas isoméricas, α -lactose e β -lactose, as quais possuem diferentes propriedades físicas (Figura 1). A proporção entre esses dois isômeros pode variar, sendo que uma solução de lactose a 25°C apresenta o seu estado de equilíbrio, onde 62,25% da lactose esta na forma β e 37,75% na forma α (CAMPBELL, 2000; FISCHER, 2010; GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

Figura 1 - Estrutura molecular básica dos isômeros α -lactose e β -lactose.



Fonte: GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008.

A lactose, quando em solução, está sujeita ao fenômeno de mutarrotação, processo este que ocorre quando não há um equilíbrio entre os isômeros α -lactose e β -lactose. Desta maneira, uma mudança ocorre na posição da hidroxila e do hidrogênio do grupo redutor da molécula de lactose, fazendo assim que, o isômero α se transforme em β e vice-versa. Este processo é característico de todos os açúcares redutores até que o equilíbrio entre os isômeros seja atingido (FISCHER, 2010; NICKERSON, 1974). As

formas α e β possuem propriedades físicas distintas como, por exemplo, a solubilidade, formação de cristais e o poder edulcorante. Em solução supersaturada e temperaturas abaixo de 93,5°C, a lactose cristaliza sob a forma β -lactose, a forma mais doce. Em temperaturas acima de 93,5°C, a lactose cristaliza sob a forma α -lactose (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; GOMES, 2018). Assim, a mutarrotação da lactose controla a cristalização, processo este responsável pela formação de estruturas arenosas nos produtos lácteos e, conseqüentemente, a precipitação (KISKA et al., 1973; FISCHER, 2010).

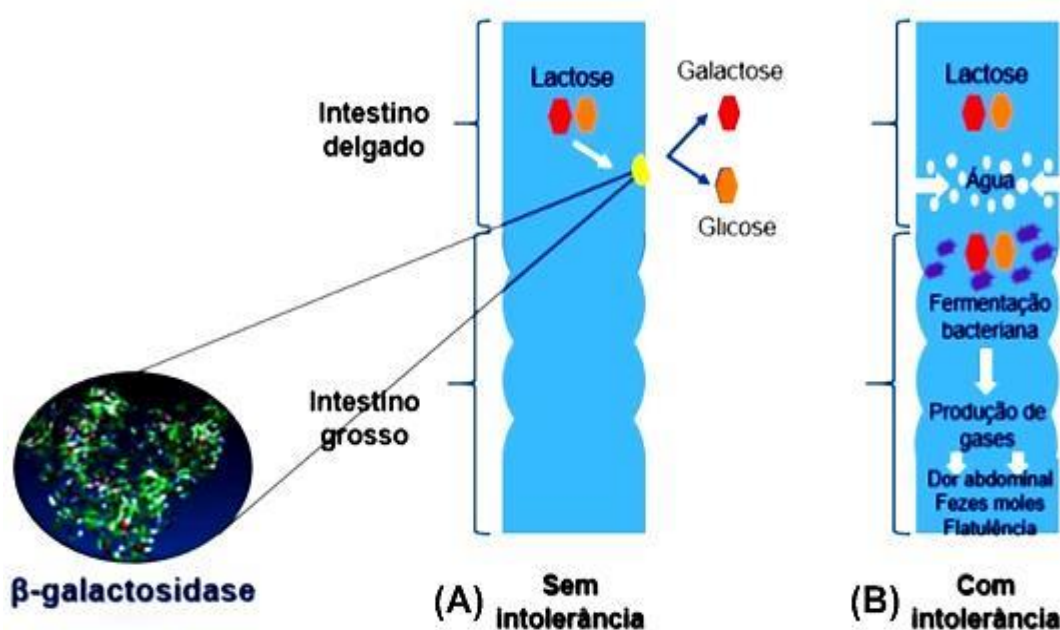
1.2 Intolerância à lactose

A lactose é encontrada no leite materno de mamíferos que possuem placenta, sendo sintetizada nas células alveolares das glândulas mamárias a partir da glicose sanguínea (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; TOMAR, 2014). A lactose é a primeira fonte de carboidrato para mamíferos recém-nascidos e sua absorção ocorre através de transporte ativo pelas células epiteliais do intestino delgado. Posteriormente, é necessário ocorrer hidrólise deste dissacarídeo, pela ação da β -galactosidase, nos monossacarídeos glicose e galactose (MARTARELLO, 2016; CORGNEAU et al., 2017; NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017).

Na espécie humana há uma redução gradativa e fisiológica da atividade da β -galactosidase no organismo que é programada e irreversível após o desmame. Assim, um recém-nascido possui uma atividade da β -galactosidase 10 a 20 vezes maior que um adulto. Estima-se que até três quartos da população mundial adulta possuam alguma dificuldade de absorção da lactose devido aos baixos níveis ou ausência da enzima β -galactosidase no organismo (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; TOMAR, 2014). A maior incidência de intolerância a lactose ocorre em populações orientais, seguidas pelas de origem negra e por último em populações de origem branca (MARTARELLO, 2016; GOMES, 2018). Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, 35% dos brasileiros adultos estão inclusos neste grupo que possuem dificuldade de digerir a lactose (BRASIL, 2017).

Na ausência ou insuficiência da enzima β -galactosidase no intestino delgado, a lactose não é digerida. Assim, conforme a lactose passa pelo cólon, ela é fermentada por bactérias, o que ocasiona a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e liberação de gases como dióxido de carbono, nitrogênio e às vezes metano. Diversos sintomas como cólicas, flatulências, diarreia osmótica e até desnutrição grave podem ser causados pela lactose não absorvida (Figura 2) (HUSAIN, 2010; CORGNEAU et al., 2017; GOMES, 2018). Alguns desconfortos secundários como dor de cabeça, dores musculares e dificuldade de concentração podem ser manifestados pela não absorção da lactose. Esta síndrome clínica manifestada pela incapacidade parcial ou completa de não digerir a lactose é denominada intolerância a lactose (TOMAR, 2014; CORGNEAU et al., 2017).

Figura 2 - Mecanismo de hidrólise e absorção da lactose no organismo: (A) indivíduos que não possuem intolerância a lactose; (B) indivíduos que possuem intolerância.



Fonte: Modificado de GOMES, 2018.

Existem três tipos de intolerância a lactose: a deficiência primária, a deficiência secundária e a deficiência congênita. A deficiência primária, conhecida também como hipolactasia primária, é caracterizada pela má absorção da lactose devido à diminuição da atividade da β -galactosidase no aparelho digestório com o passar dos anos do indivíduo. Assim, a atividade

desta enzima é normal ao nascimento e no período de recém-nascido. Porém, há uma diminuição durante a infância e adolescência, prevalecendo em níveis muito baixos durante a vida adulta e, desta forma, o indivíduo apresentará diversos sintomas e desconfortos quando ingerir alimentos que possuam lactose. A deficiência secundária é uma intolerância adquirida, também conhecida como hipolactasia secundária, ocasionada por condições patológicas que originam alterações da estrutura hidrológica da mucosa intestinal (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; TOMAR, 2014; NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017). É o tipo de intolerância mais comum entre adultos e, ao contrário das outras intolerâncias, este tipo na maioria das vezes é reversível, pois a mucosa pode regenerar-se e a produção de β -galactosidase voltar a níveis normais (MARTARELLO, 2016; CORGNEAU et al., 2017; GOMES, 2018).

A intolerância congênita consiste na ausência da atividade da enzima β -galactosidase e afeta recém-nascidos. A ausência dessa enzima é facilmente identificada, pois nos primeiros dias de nascimento os sintomas são caracterizados por diarreia grave podendo causar desidratação e desnutrição do recém-nascido (CAPPELLO; MARZIO, 2005; HUSAIN, 2010; CORGNEAU et al., 2017). Essa intolerância a lactose parece estar associada a uma mutação no gene lactase-florizina hidrolase, ou seja, é uma doença genética autossômica recessiva, sendo considerada uma condição extremamente rara (DAHLQVIST; GAHRTON; NORDÉN, 1962). Todos os tipos de intolerância a lactose causam desconfortos intestinais ou desconfortos secundários para os indivíduos portadores desta síndrome clínica, e a intensidade desse desconforto varia com a quantidade de lactose que o organismo tolera (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; MARTARELLO, 2016).

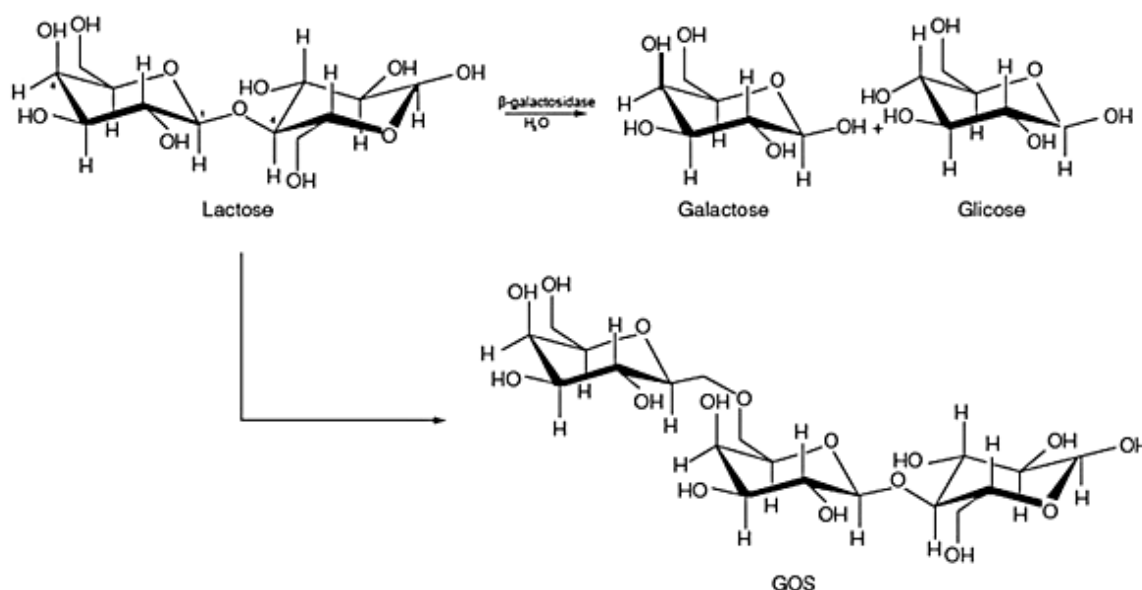
Geralmente o tratamento recomendado para indivíduos intolerantes a lactose é a retirada do leite e seus derivados da dieta alimentar ou a ingestão de alimentos que possuam baixos teores de lactose em sua composição. Entretanto, a restrição alimentar de produtos lácteos pode originar deficiências nutricionais, principalmente em crianças intolerantes a lactose, uma vez que, compromete a absorção de proteínas, riboflavina e cálcio (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; MARTARELLO, 2016; CORGNEAU et al., 2017).

Uma alternativa para intolerantes a lactose é o consumo de produtos que possuam em sua composição a lactose já hidrolisada, melhorando a digestão do leite e derivados lácteos. Além disso, os indivíduos que não são capazes de hidrolisar este dissacarídeo, podem se beneficiar dos nutrientes do leite, evitando a falta de nutrientes essenciais para o organismo. Uma alternativa é a ingestão oral direta da β -galactosidase como suplemento digestivo, sendo comercializado como cápsulas ou comprimidos (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012; CORGNEAU et al., 2017).

1.3 A enzima β -galactosidase

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23), conhecida popularmente como lactase, é uma hidrolase que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas a partir de terminais não redutores presentes em β -galactosídeos, tais como a lactose, convertendo este dissacarídeo nos monossacarídeos glicose e galactose (OLIVEIRA et al., 2011; CARDOSO et al., 2017; GOMES et al., 2018; SILVÉRIO et al., 2018). A β -galactosidase também possui a capacidade de catalisar reações de transgalactosilação, de acordo com as condições de reação, levando a formação de galactooligossarídeos (GOS) (DRAGOSITS et al., 2014), como mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Rotas de conversão da lactose pela enzima β -galactosidase.



Fonte: MARTARELLO, 2016.

A β -galactosidase pode ser obtida a partir de diversas fontes, como vegetais (amêndoas e frutos), animais e microrganismos. Em processos industriais que envolvem a utilização da β -galactosidase, grande parte desta enzima é de origem microbiana. Uma gama de microrganismos é capaz de sintetizar a β -galactosidase, incluindo bactérias como *Escherichia coli* (MATTHEWS, 2005), *Streptococcus thermophilus* (GEIGER et al., 2016), *Bacillus circulans* (YIN et al., 2017) e *Pediococcus acidilactici* (CHANALIA et al., 2018), leveduras como *Pichia pastoris* (NIE et al., 2013) e *Kluyveromyces lactis* (YIN et al., 2017), e fungos filamentosos como *Aspergillus oryzae* (VERA; GUERRERO; ILLANES, 2011; YIN et al., 2017), *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. (ELIZABETH; BUKOLA; TOYIN, 2012).

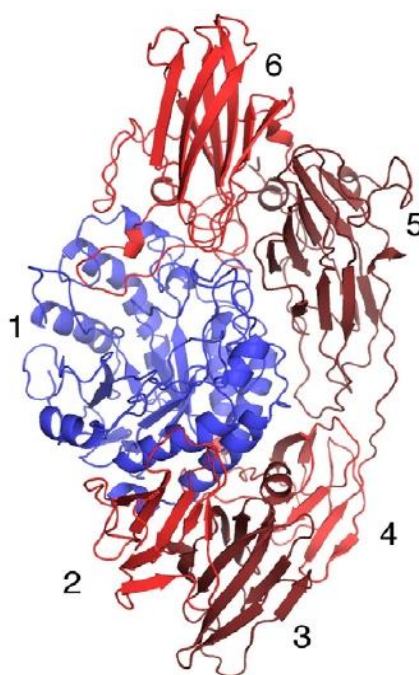
As β -galactosidases de algumas leveduras, como *K. lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e de alguns fungos filamentosos, como *A. niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei* e *Penicillium chrysogenum*, podem ser empregadas na indústria farmacêutica e em produtos lácteos de forma segura, pois possuem status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), favorecendo, desta forma, o estudo desta enzima para utilização e aplicação em escala industrial (FDA, 2015; KAUR; PANESAR; SINGH, 2018; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

As propriedades das β -galactosidases produzidas por fungos filamentosos e leveduras são bastante atrativas para aplicações industriais. As produzidas por leveduras atuam em pH entre 5,0 e 6,5, temperaturas entre 30°C e 40°C, e sua atividade depende de íons metálicos como Mn^{+} , Mg^{+} e K^{+} (JURADO et al., 2002; LIMA, 2014; YIN et al., 2017). β -galactosidases de fungos filamentosos apresentam atividade ótima em pH ácido e temperaturas que variam de 30 °C a 60 °C, tornando-a conveniente para a hidrólise da lactose presente em soro de leite ácido (VAN CASTEREN et al., 2000; EL-BAKRY et al., 2011; KAUR; PANESAR; SINGH, 2015; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

Em relação às estruturas cristalinas das β -galactosidases, existem diversos trabalhos relatando estruturas quaternárias nativas para proteínas produzidas por diferentes microrganismos, estando registradas no *Protein Data*

Bank (PDB). Juers e colaboradores (2001) relataram a primeira estrutura cristalina de β -galactosidase de *E. coli* como um tetrâmero. As β -galactosidasas de *Thermus thermophilus* A4, *Sulfolobus solfataricus* e *Penicillium* sp. também foram elucidadas como trímero, tetrâmero e monômero, respectivamente (HIDAKA et al., 2002; GLOSTER et al., 2004; ROJAS et al., 2004). A Figura 4 mostra a estrutura quartenária da β -galactosidase secretada por *T. reesei*. O monômero é constituído por 986 resíduos de aminoácidos e seis domínios (1 – 6). O domínio N-terminal (1) (resíduos Ala38 – Thr397) é constituído por oito α -hélices e um barril β . Neste domínio é encontrado o sítio ativo da enzima. Os domínios 2 (Ala398 – Asp476), 3 (Tyr477 – Asn577), 4 (Tyr578 – Pro665), 5 (Gly863 – Tyr1023) e 6 (Ser687 – Glu862) são formados por estruturas secundárias denominadas folhas β , todas antiparalelas. No quinto domínio é encontrada a porção C-terminal da proteína (MAKSIMAINEN et al., 2011). Comparada com as β -galactosidasas de leveduras, as de fungos filamentosos são proteínas relativamente pequenas, com ampla faixa de estabilidade ao pH e a temperatura, e não dependem de íons metálicos para sua ação, evidenciando sua vantagem em processos alimentícios.

Figura 4 - Estrutura tridimensional do monômero de β -galactosidase de *T. reesei* formado por seis domínios.



Fonte: MAKSIMAINEN et al., 2011.

Os fungos filamentosos se destacam dentre os produtores de β -galactosidase pela sua flexibilidade metabólica, habilidade de secretar enzimas para o meio extracelular e capacidade de crescerem em vários substratos. A secreção de enzimas facilita o processo de recuperação e purificação enzimática, o que é extremamente interessante para propósitos industriais (MARTARELLO, 2016; CARDOSO et al., 2017). A adaptação a alterações ambientais é algo crucial para o desenvolvimento dos fungos filamentosos. Através da variação do padrão de expressão gênica pode ocorrer uma resposta adaptativa nas vias metabólicas intracelulares e/ou na síntese de enzimas extracelulares (ESPESO et al., 1993). A disponibilidade de fontes carbono está envolvida diretamente na adaptação do fungo filamentoso, uma vez que mecanismos de regulação na expressão de genes que codificam enzimas podem variar de acordo com a necessidade do fungo em utilizar a fonte de carbono energeticamente mais favorável (GOMES, 2018; GAO; WU; WU, 2019). Outro fator crucial para a adaptação dos fungos filamentosos é o método de fermentação utilizado para seu crescimento, já que diferentes morfologias, enzimas e metabólitos podem ser expressos por um mesmo fungo filamentoso quando submetido a diferentes tipos de fermentações (ESPESO et al., 1993; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MANAN; WEBB, 2017).

Considerando a produção de enzimas microbianas, diferentes formas de fermentação podem ser adotadas, como a Fermentação Submersa (FSbm), Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação por Biofilmes (FB) (GASPAROTTO, 2014; MANAN; WEBB, 2017). Atualmente, para obtenção de β -galactosidases fúngicas, os métodos de fermentação utilizados são FSbm e FES, utilizando diferentes fontes de carbono, como relatado em diversos trabalhos (Tabela 1).

A principal diferença entre a FSbm e FES é a quantidade de água livre, visto que na FES não há água livre no processo, tornando-a bastante adequada para cultivo de fungos filamentosos. Além disto, a FES permite a utilização de maiores concentrações de substrato, pois é menos suscetível à inibição por este; há ausência de repressão catabólica, permitindo assim uma maior produção; os produtos gerados possuem maior estabilidade; a ausência de água minimiza as chances de contaminação por bactérias e a possibilidade

de utilizar subprodutos agroindustriais como substrato sólido. Por outro lado, o difícil controle das condições de cultivo, como temperatura, umidade, transferência de oxigênio e o acesso reduzido aos nutrientes, limita sua aplicação industrial (YAZID et al., 2017; MANAN; WEBB, 2017). Em contrapartida, a FSbm possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, devido a possibilidade de se controlar os parâmetros do processo fermentativo (MARTARELLO, 2016; GOMES, 2018). Contudo, há maiores chances de contaminação, devido à quantidade de água livre e o produto obtido apresenta-se diluído, necessitando de processos de separação e purificação, aumentando os custos de produção (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Tabela 1 - Exemplos de espécies de fungos filamentos produtores de β -galactosidase.

Fungo	Fermentação	Fonte de carbono	Referência
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Submersa	Farelo de casca de laranja	ANDRADRES et al., 2015
<i>Aspergillus foetidus</i>	Submersa	Casca de soja	MARTARELLO et al., 2019.
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	Submersa	Soro de leite e Licor de milho	CARDOSO et al., 2017.
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	Sólida	Palha de arroz, palha de trigo e casca de amendoim	KAZEMI; KHAYATI; FAEZI-GHASEMI, 2016.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sólida	Casca de arroz e farelo de trigo	NIZAMUDDIN; SRIDEVI; NARASIMHA, 2008.
<i>Aspergillus terreus</i>	Sólida	Casca de romã	VYDIA et al., 2014
<i>Aspergillus tubingensis</i> GR1	Sólida	Farelo de trigo e soro de leite	RAOL et al., 2015(b)
<i>Aspergillus uvarum</i>	Submersa	Lactose	SILVÉRIO et al., 2018.
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Sólida	Farelo de trigo	KAUR; PANESAR; SINGH, 2018.
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Submersa	Casca de maracujá	ANDRADRES et al., 2015
<i>Trichoderma reesei</i>	Sólida	Farelo de trigo	ADALBERTO et al., 2006.

Fonte: Autor.

1.4 Aplicações da β -galactosidase

As β -galactosidases possuem potencial de aplicação em diversos setores, como na indústria farmacêutica, de alimentos e no tratamento de efluentes de indústrias lácteas (EL-BAKRY et al., 2011; GEIGER et al., 2016; CARDOSO et al., 2017; CORGNEAU et al., 2017), catalisando reações de hidrólise da lactose ou reações de transgalactosilação. As principais aplicações das reações de hidrólise estão no desenvolvimento de novos produtos para

intolerantes à lactose e em modificações das características sensoriais de alimentos lácteos (MARTARELLO, 2016; GOMES, 2018). Na transgalactosilação, a atividade da β -galactosidase reside na biossíntese de galactooligossacarídeos (DRAGOSITS et al., 2014; SILVÉRIO et al., 2018).

1.4.1 Hidrólise da lactose

O processo de hidrólise da lactose é um processo promissor e bastante explorado no nível industrial, pois permite o desenvolvimento de novos produtos e fármacos para consumidores intolerantes a lactose (CARDOSO et al., 2017; GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2016; RHIMI et al., 2010; SILVÉRIO et al., 2018) e, oferece vantagens tecnológicas para processos industriais, como a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos, aumento do poder adoçante pela hidrólise deste carboidrato e a diminuição dos impactos ambientais causados pelos efluentes de indústrias lácteas (GEIGER et al., 2016; GOMES, 2018).

Considerando a obtenção de produtos próprios para consumo por intolerantes a lactose, existem dois métodos para produção do leite hidrolisado, a hidrólise ácida e a enzimática. A hidrólise enzimática consiste no uso da enzima β -galactosidase e permite condições mais suaves de temperatura e pH durante o processo, ao contrário da hidrólise ácida que demanda o uso de ácidos fortes e temperaturas elevadas, causando problemas como a desnaturação de proteínas, coloração indesejável e rendimentos baixos, além do alto custo de processamento (HUSAIN, 2010; MARTARELLO, 2016). Desta maneira, a hidrólise enzimática é um método mais interessante no nível industrial considerando a demanda de produtos que contenham em sua composição a lactose já hidrolisada ou com teores reduzidos desse carboidrato.

A enzima β -galactosidase é amplamente utilizada na indústria láctea, uma vez que, ao ser adicionada ao leite antes do consumo, possibilita a prevenção ou redução de sintomas associados à má digestão da lactose por indivíduos intolerantes (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; LIMA, 2014; MARTARELLO, 2016). Atualmente, de acordo com a legislação brasileira, a lactose presente no leite deve estar hidrolisada no mínimo 95% para que um

produto seja considerado seguro para o consumo por pessoas intolerantes (BRASIL, 2017). Além disto, o leite com lactose hidrolisada possibilita a obtenção de vários produtos lácteos, como creme de leite, iogurtes, leite condensado, queijos, pão de queijo e sorvetes, permitindo o consumo desses produtos por pessoas intolerantes (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

Além da fabricação de produtos lácteos sem ou com baixos teores de lactose, a aplicação da β -galactosidase evita a cristalização desse dissacarídeo. Devido a sua baixa solubilidade em água, a lactose pode ser cristalizada em produtos lácteos como sorvetes e leite condensado, causando problemas de arenosidade no processamento desses produtos (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; JUAJUN et al., 2011; MARTARELLO, 2016). Estes problemas são evitados pelos produtos de reação da hidrólise da lactose, pois os monossacarídeos (glicose e galactose) possuem maior solubilidade e poder edulcorante comparado à lactose. Desta maneira, a lactose hidrolisada pode ser utilizada como xaropes alimentícios para aplicações na confeitaria devido ao seu alto poder edulcorante (LIMA, 2014; MARTARELLO, 2016).

Outra aplicação da enzima β -galactosidase consiste na hidrólise enzimática do soro de leite. Estima-se que cerca de 160 milhões de toneladas de soro de leite sejam produzidos na indústria de laticínios anualmente, correspondendo aproximadamente a 6 milhões de toneladas de lactose (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). Grande parte deste soro é utilizada na indústria de produtos lácteos, como na produção de bebidas lácteas. Entretanto, ainda há um grande desperdício deste subproduto originando problemas para o meio ambiente. Há relatos que mostram que a lactose de soro de leite é responsável pelo aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) na água, causando, desta forma, enorme impacto ambiental (GEIGER et al., 2016). Uma alternativa para a diminuição do impacto ambiental causado pelo soro de leite é a possibilidade de sua reutilização, bem como dos nutrientes contidos nele (EL-BAKRY et al., 2011). O soro de leite possui grande quantidade de lactose e, desta forma, sua utilização para a conversão deste dissacarídeo em monossacarídeos é bastante atrativa, principalmente por hidrólise enzimática (KLEIN et al., 2013; RAOL et al., 2015a). Pode ainda ser usado na obtenção de

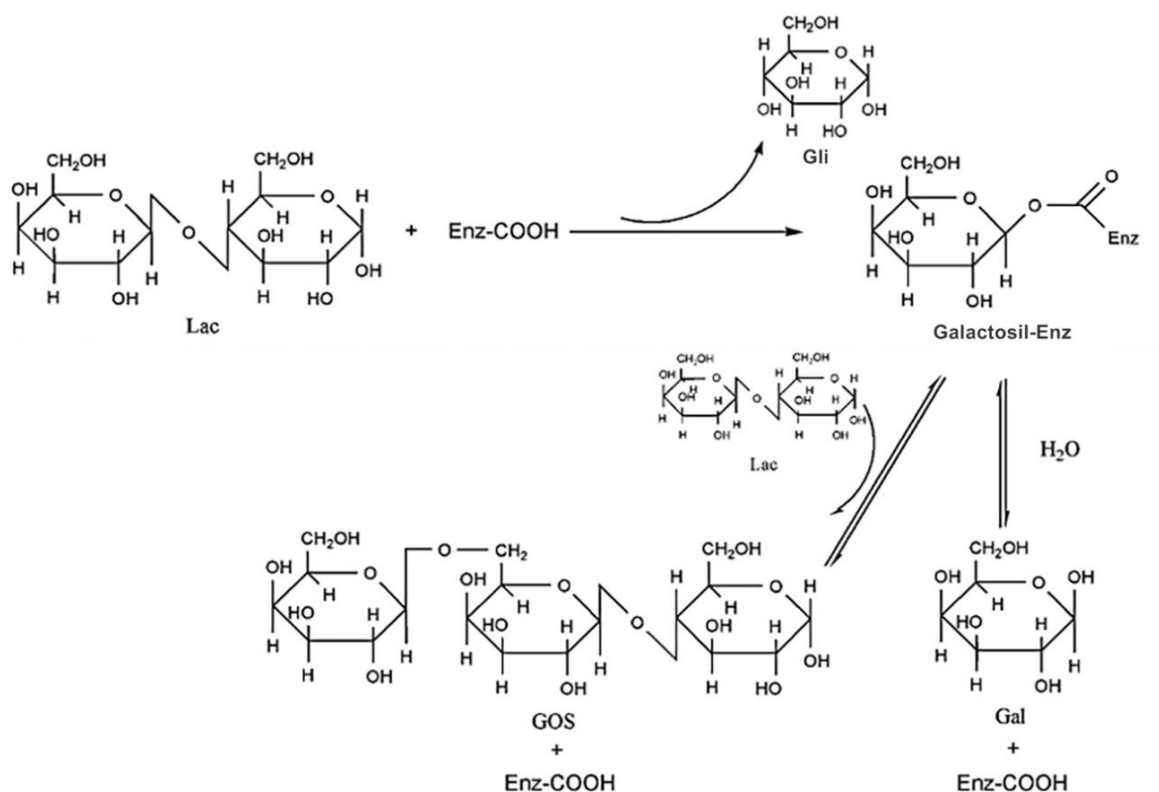
GOS através da reação de transgalactosilação, além de servir como fonte de carbono e indutor para a produção de β -galactosidase por microrganismos (CORZO-MARTINEZ et al., 2015; YIN et al., 2017).

1.4.2 Produção de Galactooligossacarídeos (GOS)

Além da capacidade de realizar hidrólise, a β -galactosidase também possui a capacidade de catalisar reações de transgalactosilação para formação de galactooligossacarídeos (GOS) (DRAGOSITS et al., 2014). GOS são oligossacarídeos compostos por uma molécula de galactose ligada à lactose, formados de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose. Sua formação ocorre em altas concentrações de β -galactosidase e de substratos ricos em lactose. Este dissacarídeo atua como doador de unidades galactosil, ocorrendo a transferência do resíduo D-galactosil para outra molécula de lactose (CARDOSO et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2018; GAO; WU e WU, 2019).

Na Figura 5 é apresentado o mecanismo de reação para a formação de GOS, catalisada pela enzima β -galactosidase. Primeiramente ocorre a formação do complexo intermediário galactosil-enzima e a liberação de glicose através da clivagem da ligação β -1,4 da lactose. Em seguida, a molécula de galactose do complexo intermediário é transferida para outra molécula de lactose levando à formação do GOS, o que é favorecido quando há alta concentração de lactose no meio reacional. Por outro lado, a hidrólise pode ser um processo competitivo, transferindo a galactose do complexo formado para a água (MARTARELLO, 2016; CARDOSO et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2018; GAO; WU e WU, 2019).

Figura 5 - Mecanismo de reação da β -galactosidase na formação de GOS.



Fonte: GAO, WU e WU, 2019.

Os GOS são moléculas de carboidratos não digeríveis com atividade bifidogênica. Sua ingestão proporciona um aumento na população de bifidobactérias no colón, suprimindo a atividade de bactérias putrefativas e, assim, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos e produção de ácidos orgânicos de cadeia curta (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; TOMAR, 2014; NIVETHA; MOHANASRINIVASAN, 2017). Além disso, atuam na redução do nível de colesterol sérico, absorção de cálcio da dieta e na síntese de vitaminas do complexo B, proporcionando diversos benefícios à saúde humana. Desta forma, GOS afetam benéficamente a composição da microbiota do intestino humano, sendo considerados prebióticos (MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012; XAVIER; RAMANA; SHARMA, 2018).

Além disso, estes carboidratos estão sendo aplicados em produtos industrializados por serem moléculas não cariogênicas, possuírem baixos valores calóricos e atuarem na diminuição da taxa glicêmica do sangue. Os GOS possuem características físico-químicas industrialmente atrativas, devido

sua alta estabilidade em condições variadas de temperatura e pH, possibilitando seu uso em uma variedade de produtos alimentícios, como leite em pó e iogurtes (TOMAR, 2014; XAVIER; CARDOSO et al., 2017; RAMANA; SHARMA, 2018; SILVÉRIO et al., 2018).

Desta maneira, estudar a produção de β -galactosidases por fungos filamentosos é de suma importância, visto que essas enzimas podem ser aplicadas em diferentes processos industriais e no tratamento de efluentes de indústrias lácteas, o que consolida a relevância deste estudo, podendo impactar positivamente a sociedade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

O objetivo deste trabalho foi selecionar uma linhagem de fungo filamentoso produtora de β -galactosidase, determinando-se as melhores condições de cultivo em Fermentação Submersa (FSbm) e Fermentação em Estado Sólido (FES) para máxima produção enzimática, purificando-a, caracterizando-a bioquimicamente e aplicando-a.

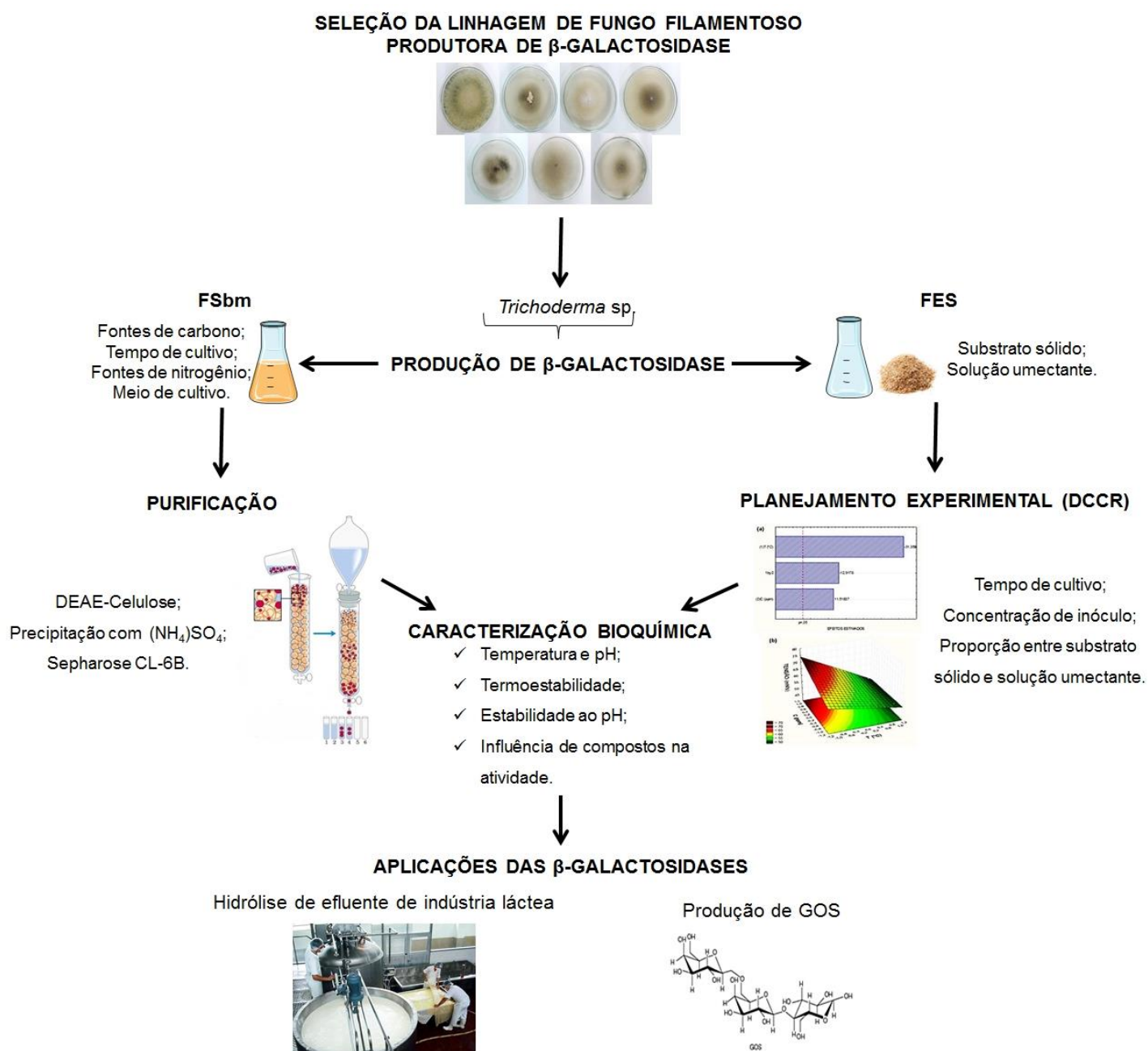
2.2 Objetivos específicos

- Selecionar uma linhagem de fungo filamentoso produtor de β -galactosidase;
- Padronizar as melhores condições de cultivo para produção de β -galactosidase em FSbm e em FES;
- Purificar a β -galactosidase produzida em FSbm;
- Caracterizar bioquimicamente as β -galactosidases extracelulares produzidas em FSbm e FES;
- Analisar a capacidade hidrolítica das β -galactosidases produzidas sobre o soro de queijo;
- Avaliar a capacidade das β -galactosidases produzidas na produção de GOS através da reação de transgalactosilação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto – São Paulo. A Figura 6 descreve simplificada os procedimentos realizados no presente trabalho.

Figura 6 - Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.



Fonte: Autor.

3.1 Manutenção das linhagens em laboratório

Os fungos filamentosos selecionados para o trabalho estão estocados na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, do Departamento de Biologia da FFCLRP – USP. Para a seleção foram utilizados os fungos *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus thermomutatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* e *Trichoderma* sp. A manutenção das linhagens em laboratório foi realizada em meio BDA (Batata Dextrose Agar) em tubos de ensaio inclinados, previamente autoclavados por 20 minutos (130°C; 1,5 atm), e incubados em estufa a 30°C durante 5 dias, sendo posteriormente utilizados ou armazenados a 4°C por até 30 dias. Repiques periódicos das linhagens foram feitos sempre que necessário.

O fungo filamentoso selecionado foi preservado pelo método Castellani, que consiste em colônias fúngicas crescidas em meio de cultura e depositadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939).

3.2 Preparo da suspensão de esporos

No tubo contendo a cultura do fungo, em meio BDA, foram adicionados 10 mL de água destilada previamente autoclavada (20 minutos, 121°C, 1,5 atm). Posteriormente, foi feita a raspagem da cultura com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada. Após a raspagem, a suspensão contendo os esporos foi filtrada em gaze estéril e em seguida padronizada em contador de células automático (BIORAD TC20), sendo a concentração final ajustada para 10^6 esporos/mL. A suspensão de esporos foi utilizada para inocular os meios de cultivos para condução da FSbm e da FES.

3.3 Seleção de fungos filamentosos produtores de β -galactosidase

3.3.1 Seleção qualitativa em meio solidificado

Os fungos filamentosos foram inoculados em placas de Petri contendo 20 mL de meio Nakao-lactose modificado (NAKAO et al., 1994), descrito

abaixo, com pH inicial ajustado para 6,0 e autoclavado a 121°C por 20 minutos. O inóculo foi feito depositando os esporos do fungo, com uma alça de platina previamente esterilizada, no centro do meio contido na placa, com a mesma invertida, para evitar o espalhamento dos esporos. As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 120 horas, sendo mensurados os diâmetros das colônias fúngicas formadas a cada 24 horas com auxílio de um paquímetro.

Composição do meio de cultura Nakao-lactose modificado (NAKAO et al., 1994)

- NaCl.....5,0 g
- KH₂PO₄.....3,0 g
- MgSO₄.7H₂O.....0,01 g
- MnCl₂.....0,004 g
- Peptona.....7,0 g
- Ágar.....20 g
- Lactose.....30 g
- Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

3.3.2 Seleção quantitativa em caldo

Na seleção quantitativa os fungos filamentosos foram cultivados em Fermentação Submersa (FSbm) em 25 mL de meio Nakao-lactose modificado (NAKAO et al., 1994) (pH 6,0), previamente autoclavado a 121°C por 20 minutos. Para os cultivos de cada linhagem foram utilizados lactose como fonte de carbono. O inóculo foi realizado adicionando-se 1 mL da suspensão de esporos (10⁶ esporos/mL para cada linhagem testada) e os cultivos foram mantidos a 30°C, por 72 horas a 120 rpm.

3.4 Obtenção dos filtrado extracelular e do extrato intracelular

Após serem realizadas as fermentações, os cultivos foram filtrados sob vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman n°1, obtendo-se o caldo

de cultura livre de células, denominado de filtrado bruto extracelular. O micélio obtido foi macerado com areia previamente tratada com ácido clorídrico, em gral de porcelana mantido em banho de gelo e, posteriormente, ressuspenso em água destilada e centrifugado a $10.000 \times g$, durante 10 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi denominado de extrato bruto intracelular. Ambos, filtrado e extrato, foram dialisados contra água destilada por 24 horas a 4°C e usados para a determinação da atividade enzimática.

3.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade da β -galactosidase foi determinada pelo método glicose-oxidase, baseado na determinação da glicose produzida pela hidrólise da lactose, através de um kit enzimático-colorimétrico Glicose - PP (Gold Analisa Diagnóstica[®]), como descrito por Bergmeyer e Bernt (1974). Primeiramente foi feita uma curva padrão de glicose (0 a 1 mmol/L). Como substrato foi utilizado a lactose (1% m/v) dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mmol/L, pH 5,0. Para o ensaio da atividade enzimática foram adicionados, em um tubo de ensaio, 250 μL de substrato lactose e 250 μL da amostra contendo a enzima, de modo a se obter um volume final de 500 μL . A reação foi conduzida durante 5 minutos, a 40°C e sua interrupção aconteceu por choque térmico (banho-maria, 100°C por 5 minutos). Após o resfriamento, foram recolhidos 200 μL do meio reacional, e em um novo tubo adicionado com 800 μL do kit enzimático-colorimétrico Glicose – PP. A reação foi conduzida durante 10 minutos, a 37°C , esperando-se a formação de uma coloração rósea, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro com o comprimento de onda ajustado para 505 nm. A unidade de atividade enzimática de β -galactosidase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

3.6 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976), a qual baseia-se na interação entre o Coomassie Brilliant Blue G-250 com regiões contendo grupos aromáticos das proteínas, formando um complexo colorido que possui a máxima absorção de cor na faixa de 596

nm. A curva analítica foi feita utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL de amostra.

3.7 Produção de β -galactosidase por fungo filamentoso em Fermentação Submersa (FSbm)

O fungo filamentoso *Trichoderma* sp. foi cultivado em Fermentação Submersa (FSbm), inicialmente em meio Nakao-lactose (pH 6,0) modificado (NAKAO et al., 1994). As culturas em FSbm foram obtidas mediante inóculo 1 mL da suspensão de esporos na concentração a 10^6 esporos/mL da espécie selecionada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, e padronizadas as melhores condições de cultivo em função da fonte de carbono, tempo de cultivo, fonte de nitrogênio e meio de cultura. Todos os cultivos foram realizados em duplicata. Os filtrados obtidos foram empregados para determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas, como descrito nos itens 3.5 e 3.6, respectivamente.

3.7.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de β -galactosidase em FSbm

A influência de diferentes fontes de carbono na produção de β -galactosidase foi analisada usando carboidratos (3% m/v; amido, glicose, lactose, maltose e sacarose) e diferentes subprodutos agroindustriais (3% m/v; farelo de arroz, farelo de aveia, farelo de laranja, farelo de milho, farelo de trigo, farinha de soja e soro de leite). A influência de diferentes concentrações (0,5% a 5% (v/v)) de soro de leite sobre a produção enzimática foi também analisada. Os cultivos foram mantidos a 30°C, por 72 horas a 120 rpm e pH inicial 6,0.

3.7.2 Produção de β -galactosidase em função do tempo de cultivo em FSbm

Após a seleção da melhor fonte de carbono e sua concentração, foram conduzidas as FSbm a 30°C, 120 rpm por diferentes períodos (24 a 384 horas) e a cada 24 horas os filtrados foram ensaiados para atividade enzimática e quantificação de proteínas conforme anteriormente descrito.

3.7.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de β -galactosidase em FSbm

As fontes de nitrogênio orgânicas (extrato de carne e extrato de levedura) e fontes inorgânicas (cloreto de amônio, nitrato de amônio e sulfato de amônio) na concentração de 0,7% (m/v) foram adicionadas aos meios de cultivo, separadamente, e analisadas suas influências sobre a produção da β -galactosidase. Todos os cultivos foram mantidos a 30°C, por 312 horas a 120 rpm e pH inicial 6,0.

3.7.4 Produção de β -galactosidase em FSbm em função do meio de cultivo

A produção de β -galactosidase em função de diferentes meios de cultura foi avaliada, sendo estes o meio Czapeck Dox (GULATI, SAXENA e GUPTA, 1997); o meio Khanna modificado (KHANNA, SUNDARI e KUMAR, 1995); o meio Mínimo (HILL et al., 2001); o meio SR modificado (RIZZATTI et al., 2001); o meio Vogel (VOGEL, 1964); e o meio Nakao-lactose modificado (NAKAO et al., 1994), como mostrados no Anexo 1. Os cultivos foram mantidos a 30°C, por um período de 312 horas a 120 rpm e pH inicial 6,0.

3.8 Purificação de β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. em FSbm

Para a purificação da β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. cultivado em meio Nakao-lactose modificado por 312 horas de cultivo, foram utilizadas diferentes estratégias, como precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e cromatografia de exclusão molecular (Sephacrose CL-6B).

3.8.1 Precipitação com sulfato de amônio

O filtrado extracelular obtido do cultivo de *Trichoderma* sp. por 312 horas em meio Nakao-lactose modificado foi dialisado contra água destilada a 4°C por 24 horas e, posteriormente, submetido à precipitação pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40-60% de saturação), como descrito por Kamran e colaboradores (2019). Após a incubação por 18 horas a 4°C, a suspensão foi centrifugada a

10.000 x *g*, por 10 min, a 4°C, e o precipitado foi ressuspenso em tampão McIlvaine 100 mmol/L, pH 4,2. A solução foi dialisada por 24 horas contra água destilada a 4°C.

3.8.2 Purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

O filtrado extracelular obtido do cultivo de *Trichoderma* sp. em FSbm, previamente dialisado como descrito no item anterior, foi submetido a cromatografia de troca iônica DEAE-celulose (2 x 12 cm) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,0. Após a aplicação de 300 mL da amostra, a enzima foi eluída mediante aplicação de um gradiente linear de NaCl (0-1,5 mol/L) no mesmo tampão, com vazão ajustada para 1,5 mL/min. As frações coletadas (3 mL/fração) foram utilizadas para a leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro e determinação da atividade enzimática da β -galactosidase como descrito no item 3.5. As frações que apresentaram atividade β -galactosidásica foram reunidas em um único *pool*, dialisadas por 24 horas (4°C) contra água destilada, liofilizadas e analisadas por SDS-PAGE 10%.

3.8.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephacrose CL-6B)

As proteínas precipitadas com sulfato de amônio, após diálise e liofilização, foram solubilizadas em solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5 adicionado de 100 mmol/L de KCl e, então, aplicadas em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sepharose CL-6B (1 x 67,5 cm), previamente equilibrada e eluída com este mesmo tampão. A vazão foi ajustada para 0,4 mL/min e as frações (1 mL/tubo) que apresentaram atividade β -galactosidásica foram reunidas em um único *pool*, dialisadas por 24 horas (4°C) contra água destilada, liofilizadas e analisadas por SDS-PAGE 10%.

3.9 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Os processos de purificação foram acompanhados por SDS- PAGE, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970).

Amostras obtidas a partir de cada metodologia de purificação utilizada foram liofilizadas e, em seguida, ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 40 mmol/L pH 6,8; glicerol 8%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; e DTT 200 mmol/L), incubadas a 96°C por 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. O gel de empacotamento continha acrilamida:bis-acrilamida (30:1) 5%; Tris-HCl 380 mmol/L pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1 µL/mL de TEMED e o gel de separação acrilamida:bis-acrilamida (30:1) 10%; Tris-HCl 380 mmol/L pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 0,4 µL/mL de TEMED. Foram aplicados 120 µg de proteínas para cada amostra, separadamente no gel, o qual foi submetido à corrida eletroforética com voltagem ajustada para 90 V, 40 mA, em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mmol/L; glicina 250 mmol/L; SDS 0,1%), por aproximadamente 60 min.

Após a corrida os géis foram corados em solução de Coomassie Blue R (Coomassie Brilliant Blue R 0,25% (m/v) em metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)) durante 30 min e descorados em solução descorante (metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)). Como marcador de massa molecular, foi utilizado o *Precision Plus Protein "Kaleidoscope" Standards* (BIO-RAD®) com massa molecular variando de 10 a 250 kDa.

3.10 Produção de β -galactosidase em Fermentação em Estado Sólido (FES)

Na Fermentação em Estado Sólido (FES) a espécie selecionada como melhor produtora de β -galactosidase em FSbm foi inoculada em 5 g de diferentes substratos sólidos (bagaço de cana-de-açúcar, casca de laranja, farelo de arroz, farelo milho, farelo soja, farelo trigo, farinha de aveia e farinha de centeio), umidificados com 5 mL de diferentes soluções umectantes (água destilada, água de torneira, sais Czapeck, sais de Khanna, sais SR, sais de Vogel e soro de leite). As fermentações foram conduzidas por 120 horas a 30°C. Ao término dos cultivos, 50 mL de água destilada gelada foram adicionados as FES e, então, submetidas à agitação de 140 rpm por 20 minutos a 4°C. Em seguida, os cultivos foram filtrados sob vácuo em funil Büchner utilizando papel de filtro Whatman n° 1 e centrifugados a 10.000 x g,

por 10 min, a 4°C. Os filtrados livres de células foram dialisados contra água destilada por 24 horas a 4°C e usados para determinação da atividade enzimática extracelular, bem como na determinação da concentração proteica como descrito nos itens 3.5 e 3.6, respectivamente.

3.11 Planejamento experimental

Para seleção das melhores condições de cultivo do fungo filamentoso *Trichoderma* sp. em FES, visando a produção de β -galactosidase, foi realizado um planejamento experimental ²³, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR). Foram consideradas as variáveis independentes tempo de cultivo, concentração de inóculo e proporção entre substrato sólido e solução umectante. Através de análises prévias das variáveis independentes foram determinadas os níveis superiores (+1) e inferiores (-1), adicionados de pontos axiais ($+\alpha$, $-\alpha$) e triplicata no ponto central (0) como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Níveis e valores das variáveis independentes tempo de cultivo, concentração de esporos usados no inóculo e proporção entre substrato sólido e solução umectante usados no planejamento experimental (DCCR) para avaliar a produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp. em FES. Onde $\alpha = 1,68$.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Tempo (dias)	X_1	3	5	8	11	13
Inóculo 10^x (esporos/mL)	X_2	3	4	5	6	7
Proporção subst. sólido :sol. umectante (1:x)	X_3	0,7	1	1,5	2	2,34

Nas condições descritas anteriormente, foram realizados 17 ensaios, sendo a matriz do DCCR preparada utilizando o software STATISTICA[®] versão 12.5 Avaliação (StatSoft, Inc.), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2^3 (DCCR), com valores codificados e reais, adicionada de pontos centrais em triplicata, para produção de β -galactosidase de *Trichoderma* sp. em FES. Onde $\alpha = 1,68$.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	Tempo (dias)	Inóculo (10 ^x) (esporos/mL)	Proporção 1: x (substrato sólido: sol. umectante)
1	-1	-1	-1	5	4	1
2	-1	-1	+1	5	4	2
3	-1	+1	-1	5	6	1
4	-1	+1	+1	5	6	2
5	+1	-1	-1	11	4	1
6	+1	-1	+1	11	4	2
7	+1	+1	-1	11	6	1
8	+1	+1	+1	11	6	2
9	- α	0	0	2,95	5	1,5
10	+ α	0	0	13,0	5	1,5
11	0	- α	0	8	3,31	1,5
12	0	+ α	0	8	6,68	1,5
13	0	0	- α	8	5	0,66
14	0	0	+ α	8	5	2,34
15	0	0	0	8	5	1,5
16	0	0	0	8	5	1,5
17	0	0	0	8	5	1,5

A equação do modelo matemático proposto com o planejamento experimental foi formulada de acordo com a Equação 1.

$$\gamma_i = \beta_0 + \beta_1 a + \beta_2 b + \beta_3 c + \beta_{11} a^2 + \beta_{22} b^2 + \beta_{33} c^2 + \beta_{12} ab + \beta_{13} ac + \beta_{23} bc + \varepsilon_i$$

Onde a, b e c são variáveis referentes aos fatores; β_0 (ponto de interseção), β_1 , β_2 , β_3 (referentes aos efeitos lineares), β_{11} , β_{22} , β_{33} (referentes aos efeitos quadráticos) e β_{12} , β_{13} , β_{23} (referentes aos efeitos de interação dupla) são coeficientes de regressão obtidos pelo método de mínimos quadrados; e ε é o erro experimental correspondente a γ (atividade enzimática).

3.12 Caracterização bioquímica parcial das β -galactosidases secretadas por *Trichoderma* sp. em FSbm e FES

3.12.1 Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática

A influência da temperatura de reação sobre a atividade das β -galactosidases foi determinada na faixa de 30 °C a 70 °C com variação de 5 °C. Já para a influência do pH na atividade enzimática foi utilizado o tampão McIlvaine (100 mmol/L) (McILVAINE, 1921), com valores de pH variando de 2,0 a 6,0, com intervalos de 0,5. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.12.2 Avaliação da termoestabilidade e estabilidade ao pH

As β -galactosidases de *Trichoderma* sp. produzidas via FSbm e FES foram utilizadas em ensaios de termoestabilidade e estabilidade ao pH. Para determinação da termoestabilidade as enzimas foram incubadas em diferentes temperaturas (35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C) por diferentes períodos de tempo (20 min, 60 min, 120 min, 180 min e 1440 min). Após o tempo de incubação alíquotas foram retiradas e mantidas em banho de gelo, sendo posteriormente utilizadas na reação enzimática para se avaliar a estabilidade térmica.

Para determinação da estabilidade ao pH as enzimas foram incubadas em tampão McIlvaine (100 mmol/L) com diferentes valores de pH (3, 4, 5, 7, 9) por diferentes períodos de tempo (20 min, 60 min, 120 min, 180 min e 1440 min), a 4°C. Após o tempo de incubação as amostras foram utilizadas na reação enzimática. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.12.3 Influência de diferentes compostos na atividade β -galactosidásica

O efeito de vários compostos químicos como sais (AgNO_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , KH_2PO_4 , KI , MgCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , MnSO_4 , NaBr , NaH_2PO_4 , NaNO_3 , NH_4F e ZnSO_4), β -mercaptoetanol, ureia e EDTA na concentração final de 1mmol/L; detergentes (SDS, Triton X – 100 e Tween-20) na concentração de 0,01% (v/v); e solventes orgânicos (metanol, acetonitrila,

etanol, acetona, isopropanol e n-butanol) na concentração de 1% (v/v), sobre a atividade β -galactosidásica foi avaliado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.13 Aplicação das β -galactosidases secretadas por *Trichoderma* sp.

3.13.1 Hidrólise do efluente de indústria de queijos

Foi verificado o potencial hidrolítico dos filtrados brutos contendo β -galactosidase de *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm e em FES sobre o efluente da indústria de produção de queijos. A amostra do efluente foi adicionada aos filtrados bruto, separadamente, nas proporções 1:0,5 e 1:1 (v/v) e incubadas a 37°C por um período de 72 horas. Durante o tempo de incubação alíquotas foram retiradas com 2, 4, 24, 48 e 72 horas, e fervidas por 5 minutos. Como controles foram utilizadas amostras do efluente adicionadas, separadamente, a água destilada e aos filtrados brutos contendo enzima inativada nas proporções 1:0,5 e 1:1 (v/v).

Alíquotas de cada uma das reações foram analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography*, *TLC*), utilizando como fase móvel uma solução constituída por acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: propanol: água destilada (2,5:1:0,5:0,1:0,15 v/v/v/v/v). A placa foi revelada com uma solução de orcinol 0,2% em ácido sulfúrico: metanol (1:9 v/v). Os produtos da hidrólise do soro de queijo também foram analisados por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japan) equipado com detector de índice refrativo e coluna EC 250/4.6 Nucleosil 100 NH₂ (30 x 0,75 cm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mantida a 60 °C. Como fase móvel foi utilizada acetonitrila 82% (v/v). Como padrões para ambas as análises foram utilizados glicose (10 g/L), galactose (10 g/L) e lactose (10 g/L).

3.13.2 Produção de Galactooligosacarídeos (GOS)

A produção de GOS foi realizada em banho metabólico com agitação constante, utilizando soluções de lactose e os filtrados bruto contendo β -galactosidase de *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm e FES, separadamente. Inicialmente, foram preparadas as soluções de lactose com diferentes

concentrações (10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 70%) em tampão McIlvaine (100 mmol/L), pH 4,5. As misturas de reação foram preparadas mantendo a proporção 1:0,5 (v/v) entre enzima e substrato. Estas misturas foram incubadas na temperatura de 37 °C por um período de 24 h e finalizou em banho fervente, a 100 °C, durante 5 minutos. As amostras foram analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography, TLC*) e quantitativamente por *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Foram utilizados como padrões glicose (10 mg/mL), galactose (10 mg/mL) e lactose (10 mg/mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados em duas partes:

- Parte I: Produção e caracterização de β -galactosidase extracelular por fungos filamentosos em Fermentação Submersa (FSbm);
- Parte II: Produção e caracterização de β -galactosidase extracelular por *Trichoderma* sp. cultivado em Fermentação em Estado Sólido (FES).

Parte I

Produção e caracterização de β -galactosidase extracelular por fungos filamentosos em Fermentação Submersa (FSbm)

4.1 Seleção de fungos filamentosos produtores de β -galactosidase

O ensaio em placa de ágar é um método qualitativo que consiste em avaliar a capacidade do microrganismo crescer no meio contendo lactose como única fonte de carbono. Na Tabela 4 pode ser observado que das 10 linhagens fúngicas testadas, 9 apresentaram crescimento no meio de cultura Nakao-lactose modificado, no período de 120 horas. Com 24 horas de cultivo apenas 3 linhagens apresentaram crescimento, com diâmetros das colônias variando entre 1,12 e 7,5 mm. Após 72 horas de cultivo, 8 linhagens fúngicas exibiram crescimento no meio de cultivo atingindo diâmetros de crescimento entre 4,75 e 39,0 mm, com destaque para as espécies *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus microsporus* e *Trichoderma* sp. Interessantemente, o fungo *Aspergillus niger* não cresceu no meio de cultivo contendo lactose. Para as linhagens *A. phoenicis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *R. microsporus* e *Trichoderma* sp. a medida da colônia tornou-se impossível devido ao crescimento fúngico sobre toda a superfície do meio em 120 horas de cultivo.

Tabela 4 - Seleção de fungos filamentosos produtores de β -galactosidase pelo método de ensaio em placa.

Microrganismo	Diâmetros de crescimento dos microrganismos (mm)		
	24 horas	72 horas	120 horas
<i>Aspergillus caespitosus</i>	NC	NC	30,50 $\pm$ 0
<i>Aspergillus terreus</i>	NC	4,75 $\pm$ 0,35	27,20 $\pm$ 0,35
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	NC	7,00 $\pm$ 0,70	24,20 $\pm$ 1,06
<i>Aspergillus parasiticus</i>	NC	7,50 $\pm$ 2,12	35,00 $\pm$ 0
<i>Aspergillus phoenicis</i>	5,12 $\pm$ 0,17	35,70 $\pm$ 0	*
<i>Aspergillus nidulans</i>	NC	12,20 $\pm$ 1,06	*
<i>Aspergillus japonicus</i>	1,12 $\pm$ 0,17	13,00 $\pm$ 1,41	*
<i>Aspergillus niger</i>	NC	NC	NC
<i>Rhizopus microsporus</i>	7,50 $\pm$ 0,70	39,00 $\pm$ 3,50	*
<i>Trichoderma</i> sp.	NC	26,80 $\pm$ 1,62	*

NC - Não foi observado crescimento do microrganismo neste período.

* - Não foi possível medir o diâmetro da colônia devido o crescimento sobre toda a superfície do meio no período.

Silvério e colaboradores (2018) ao estudar o potencial de produção dessa enzima por 50 linhagens de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Altenaria*, *Fusarium* e *Penicillium*, dentre outras, observaram que 12 espécies fúngicas exibiram um maior crescimento no meio de cultivo contendo lactose após 168 horas, mostrando que essas espécies foram potenciais produtoras de β -galactosidase. Elizabeth, Bukola e Toyin (2012) analisaram a produção da enzima β -galactosidase por 20 linhagens fúngicas do gênero *Trichoderma* isoladas de amostras de solo, sendo que seis espécies (*T. viride*, *T. arundinaceum*, *T. fertile*, *T. longibrachiatum*, *T. crassum*, e *T. asperellum*) mostraram potencial de produção da enzima pelo crescimento em meio solidificado contendo lactose.

Entretanto, a seleção em placa deve ser associada a uma seleção quantitativa e a utilização da FSbm para quantificação da enzima β -

galactosidase deve ser empregada (KAMRAN et al., 2016). Deste modo, considerando que 9 linhagens de fungos filamentosos foram capazes de crescer no meio Nakao-lactose solidificado, o potencial para a produção da enzima, na forma extracelular e intracelular, em FSbm também foi analisado.

Na Tabela 5 observa-se que a maior atividade intracelular (1,9 U/L) foi obtida para a enzima produzida pelo fungo *A. japonicus* e a maior atividade extracelular, de 4,91 U/L, para a β -galactosidase produzida pelo fungo do gênero *Trichoderma*. Levando-se em consideração a atividade total, somatória das atividades enzimáticas extracelular e intracelular, e as atividades específicas, os fungos *A. japonicus* (2,1 U/L e 0,195 U/mg de prot.) e *Trichoderma* sp. (6,0 U/L e 0,110 U/mg de prot.) foram os melhores produtores nas condições de cultivo testadas, visto que as outras espécies não produziram níveis detectáveis de β -galactosidase extracelular. Foi verificado também que ocorreu o crescimento das espécies fúngicas no tempo de cultivo empregado, com exceção do *A. phoenicis*.

O catabolismo da lactose em fungos filamentosos pode ocorrer de duas maneiras: pela ação da β -galactosidase no meio extracelular, onde ocorre a hidrólise da lactose e subsequente absorção dos monômeros formados, e/ou a absorção desse dissacarídeo seguida por hidrólise intracelular (SEIBOTH et al., 2007; DINIZ et al., 2012; FEKETE et al., 2016). Para este processo ocorrer é necessária a presença de permeases de lactose que são proteínas transmembranares (FEKETE et al., 2002; FEKETE et al. 2012), o que pode explicar os resultados observados neste trabalho, considerando a ausência da β -galactosidase extracelular nos cultivos de *A. terreus* e *A. thermomutatus*. A lactose pode ter sido transportada para o interior das células e então hidrolisada pela β -galactosidase mantida intracelularmente. Embora Fekete e colaboradores (2016) tenham identificado a presença de duas permeases de lactose, denominadas de *LacpA* e *LacpB*, em *A. nidulans*, a linhagem utilizada neste trabalho não foi capaz de produzir níveis detectáveis de β -galactosidase, intra ou extracelularmente, assim como também observado para *A. caespitosus* e *A. parasiticus*.

Tabela 5 - Produção de β -galactosidase por diferentes fungos filamentosos cultivados em FSbm utilizando o meio Nakao-lactose modificado contendo 3% (m/v) de lactose, a 30°C por 72 horas de cultivo agitado.

Microrganismo	Extracelular		Intracelular	
	Atividade enzimática (U/L)	Proteínas totais (mg/L)	Atividade enzimática (U/L)	Proteínas totais (mg/L)
<i>A. caespitosus</i>	0	14,70 $\pm$ 0,50	0	47,90 $\pm$ 0,60
<i>A. terreus</i>	0	7,63 $\pm$ 1,00	1,10 $\pm$ 0,30	14,46 $\pm$ 2,00
<i>A. thermomutatus</i>	0	7,95 $\pm$ 1,10	1,37 $\pm$ 0,23	38,40 $\pm$ 1,84
<i>A. parasiticus</i>	0	4,10 $\pm$ 1,60	0	17,51 $\pm$ 3,07
<i>A. phoenicis</i> *	---	---	---	---
<i>A. nidulans</i>	0	5,86 $\pm$ 1,10	0	38,25 $\pm$ 2,34
<i>A. japonicus</i>	0,23 $\pm$ 0,05	3,37 $\pm$ 1,73	1,90 $\pm$ 0,05	24,20 $\pm$ 0,77
<i>R. microsporus</i>	0	9,50 $\pm$ 0,70	1,00 $\pm$ 0,46	77,54 $\pm$ 4,01
<i>Trichoderma</i> sp.	4,91 $\pm$ 0,05	52,71 $\pm$ 2,02	1,09 $\pm$ 0,05	76,41 $\pm$ 1,70

* - Não apresentou crescimento.

Os resultados revelaram que apesar de 9 linhagens fúngicas apresentarem potencial de produção da β -galactosidase em meio solidificado contendo lactose como única fonte de carbono, apenas duas linhagens apresentaram potencial para produção da forma extracelular da enzima em FSbm. Além disto, essas duas linhagens foram capazes de crescer no meio solidificado que continha lactose como única fonte de carbono, evidenciando o potencial de produção de β -galactosidase extracelular. Desta forma o fungo filamentoso *Trichoderma* sp. foi selecionado para prosseguimento da pesquisa visando a produção da enzima extracelular.

Nos estudos de produção de β -galactosidase por fungos filamentosos descritos na literatura, as espécies mais investigadas pertencem ao gênero *Aspergillus*. Saad (2004), ao estudar fungos filamentosos isolados de solos e pertencentes a este gênero, observou que as espécies *A. carneus* e *A. japonicus* foram as melhores produtoras de β -galactosidase extracelular, com atividade enzimática de 420 U/L e 520 U/L, respectivamente. No presente estudo, entre as 8 espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, apenas *A. japonicus* sintetizou β -galactosidase extracelular, porém em uma quantidade

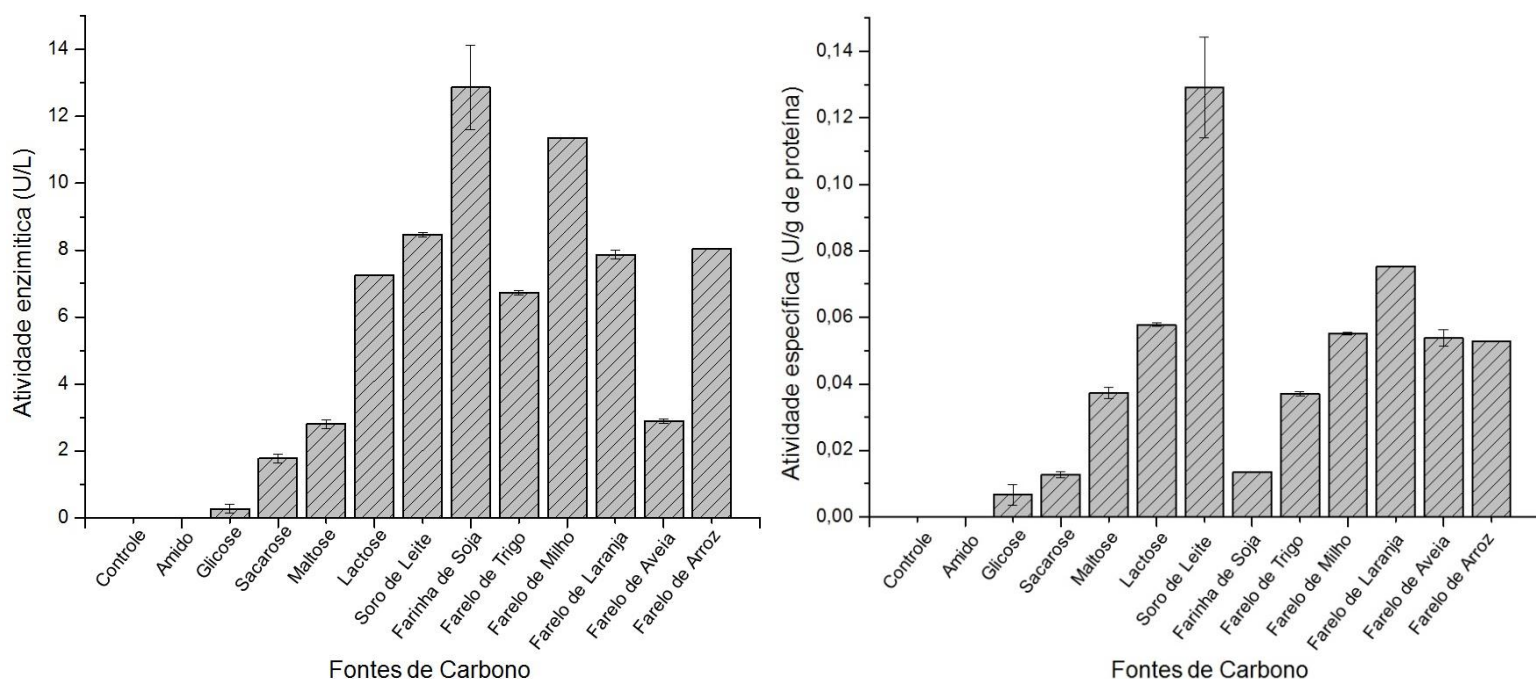
menor às relatadas na literatura. Poucos trabalhos reportaram o potencial dos fungos do gênero *Trichoderma* na síntese dessa enzima. Elizabeth, Bukola e Toyin (2012) verificaram que as atividades das β -galactosidases, foram de $3,28 \times 10^{-4}$ U/L e $5,21 \times 10^{-4}$ U/L, para as espécies de *T. longibrachiatum* e *T. crassum*, respectivamente, após 72 horas de cultivo. Adalberto (2005), ao estudar potencial de produção dessa enzima por outras espécies de *Trichoderma* após 120 horas de cultivo, obteve valores de atividades enzimáticas de 0,0052 U/L para *T. reesei* FTRP e 0,010 U/L para *T. reesei* FTKO-39.

4.2 Produção de β -galactosidase extracelular por *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm

4.2.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de β -galactosidase extracelular

A fonte de carbono é um fator importante na produção de β -galactosidase por microrganismos, uma vez que esta enzima é principalmente sintetizada na presença de indutores, como a lactose (NAGY et al., 2001a; SAAD, 2004). No presente estudo foi verificada a influência de diferentes carboidratos e produtos agroindustriais na produção dessa enzima. A farinha de soja e o farelo de milho induziram as melhores produções enzimáticas (12,8 U/L e 11,3 U/L, respectivamente) como pode ser observado na Figura 7A. Outras fontes de carbono também favoreceram a produção da enzima, como o farelo de arroz (8,0 U/L), farelo de laranja (7,8 U/L), lactose (7,2 U/L) e soro de leite (8,5 U/L). Entretanto, pode-se observar que para algumas fontes a produção da enzima não foi expressiva. A presença de alguns carboidratos como a glicose e galactose, em grandes quantidades, pode suprimir a síntese da β -galactosidase (NAGY et al., 2001; MARTARELLO, 2016).

Figura 7 - Efeito de diferentes fontes de carbono (3% m/v) sobre a produção de β -galactosidase extracelular (A) e atividade específica extracelular (B) de *Trichoderma* sp. cultivado no meio Nakao-lactose modificado por 72 horas a 120 rpm a 30°C.



Fonte: Autor.

A utilização de subprodutos lignocelulósicos e de soro de leite foi a que mais favoreceu a produção da β -galactosidase. Isto pode ser explicado pelo fato que, inicialmente, os componentes estruturais dos produtos agroindustriais (proteínas e polissacarídeos, entre outros) devem ser hidrolisados extracelularmente em compostos como oligômeros e monômeros, e assim, estes são transportados através da parede celular dos fungos (GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2010). Considerando a natureza lignocelulósica dos resíduos usados é possível que o fungo tenha produzido enzimas do complexo celulolítico, as quais hidrolisaram tais substratos, disponibilizando monômeros prontamente assimiláveis, favorecendo assim o crescimento do fungo *Trichoderma* sp. e, conseqüentemente, a produção de β -galactosidase (ARANTES e MILAGRES, 2009; AGUIAR e FERRAZ, 2011; LOMBARD et al., 2014). Além disto, diversos trabalhos mostram que os fungos do gênero *Trichoderma* são ótimos produtores de enzimas do complexo celulolítico (GUERRA et al, 2006; SUN et al., 2011; KAR et al., 2013; PRÉVOT et al.,

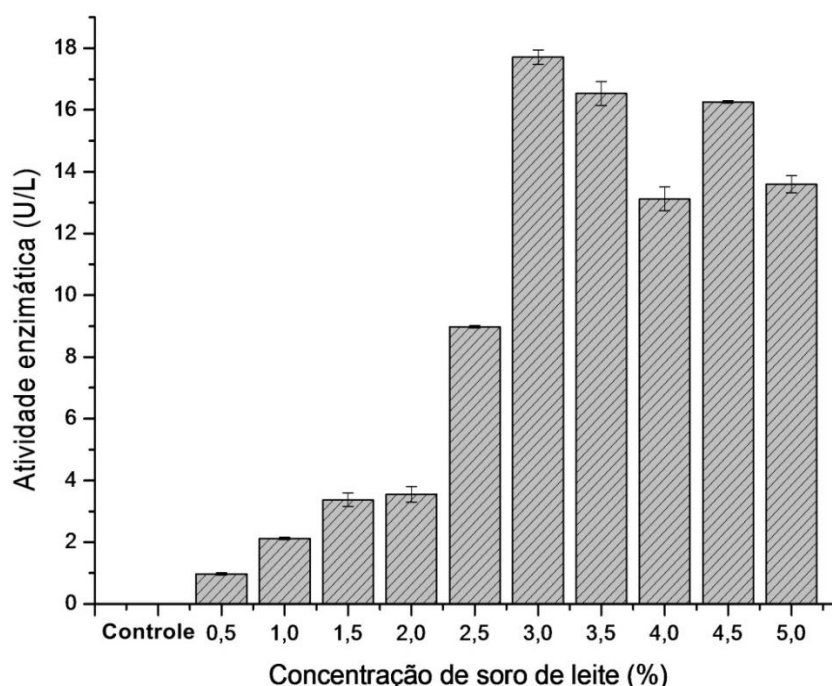
2013), justificando assim o bom crescimento do fungo utilizando subprodutos lignocelulósicos como fonte de carbono. A utilização do soro de leite induziu a produção de β -galactosidase devido à alta concentração de lactose neste subproduto, sendo observada a maior atividade específica (Figura 7B). Segundo Pinto (2010) a lactose é o carboidrato majoritário na composição do soro de leite, compondo em torno de 4,9%. Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos quando se utilizou casca de soja (MORTOZA, 2012; MARTARELLO, 2016), casca de laranja (ANDRADES et al., 2015), farelo de arroz (ANDRADES et al., 2015) e soro de leite (SAAD, 2004; KAUR et al., 2015; CARDOSO et al., 2017) como única fonte de carbono na produção de β -galactosidase por fungos filamentosos.

É importante observar que o *Trichoderma* sp. não foi capaz de sintetizar β -galactosidase em quantidades expressivas na presença do monossacarídeo glicose e outros carboidratos (amido, maltose e sacarose), indicando que a produção desta enzima pelo fungo deve ser induzida. Enzimas induzidas são sintetizadas na presença de um substrato específico, enquanto as enzimas constitutivas não dependem de um substrato específico para serem sintetizadas (GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2010; CALVALCANTI et al., 2017). Outra provável explicação para os valores não significativos na produção da β -galactosidase na presença de glicose no meio é a repressão catábolica por este sacarídeo (MARTARELLO et al., 2019). Nagy e colaboradores (2001), ao estudarem a produção de β -galactosidase e a influência de carboidratos na síntese dessa enzima pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, verificaram que a adição de glicose e de sacarose ao meio reprimiu a produção enzimática. Elizabeth, Bukola e Toyin (2012) observaram que os valores de atividade enzimática das β -galactosidases produzidas por espécies *Trichoderma* na presença de glicose são bem inferiores se comparados aos obtidos na presença de outros carboidratos.

Considerando que um dos objetivos do presente trabalho foi purificar a enzima β -galactosidase, o soro de leite foi escolhido como fonte de carbono para seguir a investigação, pois apesar da farinha de soja exibir uma atividade enzimática considerável, o valor de atividade específica (0,013 U/mg de prot.) não foi expressivo para este propósito do estudo.

Visando a máxima produção de β -galactosidase na presença do soro de leite, a influência de suas diferentes concentrações (0,5 a 5 % v/v) foi verificada. Observa-se na Figura 8 que 3% (v/v) de soro de leite adicionado ao meio Nakao-lactose modificado favoreceu a síntese enzimática pelo fungo *Trichoderma* sp. (17,7 U/L).

Figura 8 - Efeito da concentração do soro de leite na produção de β -galactosidase extracelular em FSbm por *Trichoderma* sp. cultivado no meio Nakao-lactose modificado por 72 horas a 120 rpm a 30°C.



Fonte: Autor.

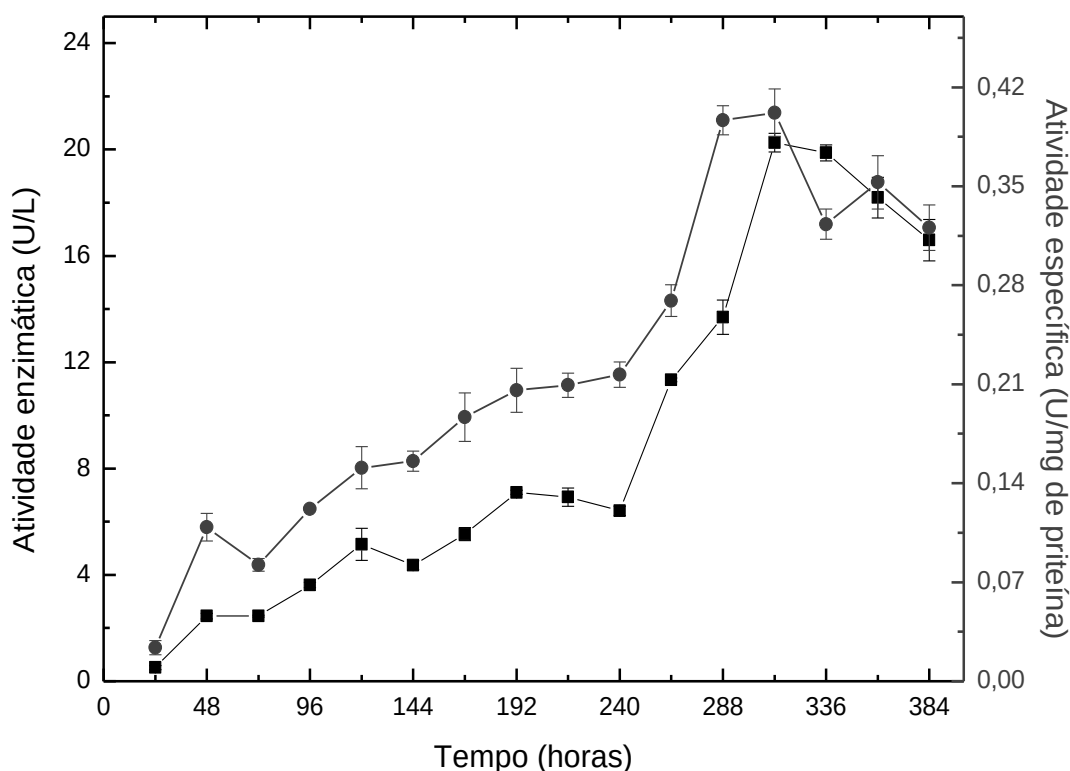
4.2.2 Produção de β -galactosidase extracelular em função do tempo de cultivo

O fungo *Trichoderma* sp. foi cultivado em FSbm por até 384 horas sendo avaliada a cada 24 horas a produção da β -galactosidase e de proteínas totais. Observa-se, através da Figura 9, que em 48 horas de cultivo ocorreu o início da produção da enzima, entretanto somente em 312 horas de cultivo (20 U/L) a secreção da enzima pelo fungo *Trichoderma* sp. foi máxima. O longo período observado para a máxima produção enzimática pode ser explicado pelo fato que inicialmente o fungo utiliza as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis também presentes no soro (glicose e galactose) e posteriormente

a lactose. Desta forma, a enzima em questão atua depois da redução da concentração dessas fontes no meio de cultivo, realizando a hidrólise da lactose presente no soro de leite (ARANTES e MILAGRES, 2009; AGUIAR e FERRAZ, 2011; LOMBARD et al., 2014). Silvério e colaboradores (2018), ao estudar a produção de β -galactosidases por *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus uvarum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium spinulosum*, *Mucor* sp. e *Trametes versicolor* verificaram que a maior secreção ocorreu a partir de 240 horas de fermentação.

Foi verificada uma oscilação nos valores de atividade específica, e isto é explicado pelo fato das proteínas totais variarem bastante no decorrer do cultivo, provavelmente devido às produções concomitantes de outras enzimas, como proteases (ARANTES e MILAGRES, 2009). Martarello (2016), ao estudar a produção da β -galactosidase por *A. foetidus*, verificou que os valores de proteínas totais variaram bastante durante os 16 dias de cultivo, sugerindo que outras enzimas são produzidas para a degradação do substrato.

Figura 9 - Influência do tempo de cultivo do fungo *Trichoderma* sp. na produção de β -galactosidase extracelular (■) e na atividade específica extracelular (●). Cultivo realizado em meio Nakao-lactose modificado contendo 3% (v/v) de soro de leite, 30°C e 120 rpm.



Fonte: Autor.

Considerando que os maiores valores de atividade enzimática e atividade específica foram obtidos com 312 horas de cultivo, este foi o período de fermentação escolhido para continuidade do estudo.

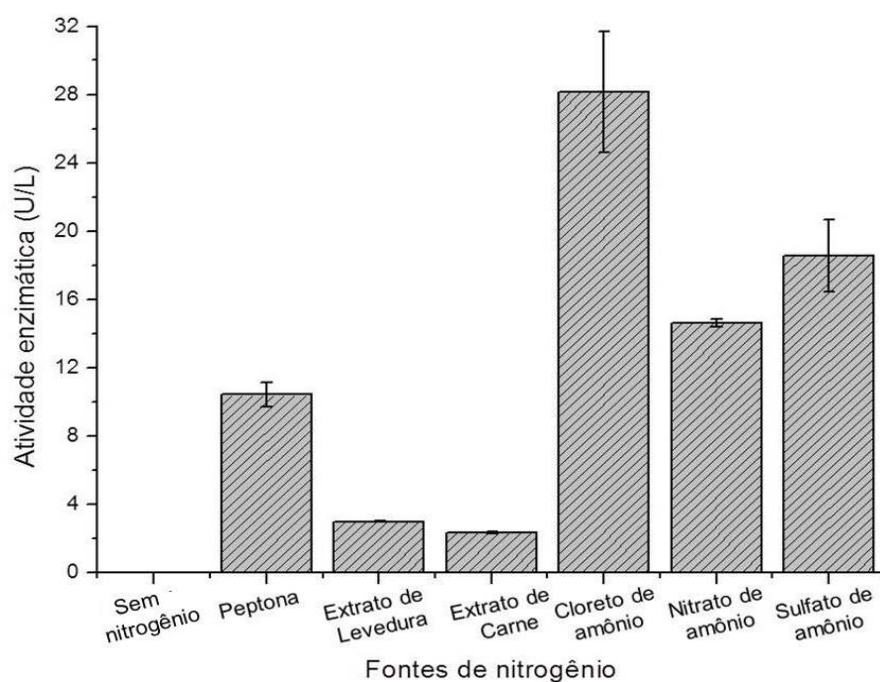
4.2.3 Influência das fontes de nitrogênio na produção de β -galactosidase extracelular em FSbm

Ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas e componentes de parede celular podem ser produzidos através da metabolização de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio pelos microrganismos, tornando-se essenciais para o seu crescimento (ARANTES e MILAGRES, 2009; VIANA, 2017). Deste modo, os efeitos de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas sobre a produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp. foram verificados. De acordo com a Figura 10, as fontes de nitrogênio inorgânicas favoreceram melhor a produção da

enzima. A máxima produção enzimática (28 U/L) foi obtida na presença de cloreto de amônio (NH_4Cl), apresentando também a maior atividade específica (1,43 U/mg de prot.), enquanto na presença de extrato de levedura observou-se a menor produção (2 U/L). Não foi verificada a produção da enzima na ausência da fonte de nitrogênio.

Resultados semelhantes foram relatados para produção de β -galactosidase por espécies de *Trichoderma*, com aumento da síntese enzimática na presença de fontes inorgânicas de nitrogênio (ELIZABETH, BUKOLA e TOYIN, 2012). Por outro lado à maioria dos estudos com β -galactosidase relatam máxima produção na presença de fontes de nitrogênio orgânicas, como extrato de levedura (ELIZABETH, BUKOLA e TOYIN, 2012), extrato de carne (SHARMA e SINGH, 2014) e peptona (NIZAMUDDIN, SRIDEVI e NARASIMHA, 2008; VIANA, 2017), diferindo do obtido no presente trabalho.

Figura 10 - Produção de β -galactosidase extracelular por *Trichoderma* sp. em função de diferentes fontes de nitrogênio (0,7% m/v). Cultivos realizados em meio Nakao-lactose modificado contendo 3% (v/v) de soro de leite, por 312 horas, a 30°C e 120 rpm.



Fonte: Autor.

4.2.4 Influência de diferentes meios de cultura na produção de β -galactosidase

Para o crescimento do microrganismo o meio de cultura deve fornecer todos os nutrientes necessários, como fonte de carbono, nitrogênio e alguns sais. Visando analisar a produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp. em função do meio de cultura, foram utilizados os meios Czapeck Dox modificado, Khanna modificado, Meio mínimo, SR modificado e Vogel, utilizando o meio Nakao-lactose modificado como referência (dados não mostrados). Foi observado crescimento do fungo em todos os meios, mas não foi verificada a produção da enzima quando usados os meios mencionados. Desta forma, a enzima foi secretada pelo fungo *Trichoderma* sp. apenas no meio de cultura referência (Nakao-lactose modificado) com atividade enzimática de 25 U/L $\pm$ 0,76 e atividade específica de 1 U/mg de proteína $\pm$ 0,15.

A presença de alguns íons metálicos para a produção de β -galactosidase é necessária, atuando como ativadores e/ou cofatores enzimáticos (ADALBERTO, 2005; YAMADA et al., 2017). Contudo, alguns íons metálicos quando presentes no meio de fermentação podem inibir a síntese enzimática. A presença de MgSO_4 e MnCl_2 no meio Nakao-lactose pode ter favorecido a máxima produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp. Huber, Roth e Bahl (1996), ao estudar a produção de β -galactosidase por *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, relataram que na ausência dos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} houve redução de 94% na atividade enzimática dessa enzima, comparada quando estes íons estavam presentes no meio de cultivo. Yamada e colaboradores (2017) estudaram a produção de β -galactosidase alcalina pelo fungo *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1 e concluíram que a presença dos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} são essenciais para a produção desta enzima. Os sais CuSO_4 , FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e ZnSO_4 , presentes no meios Czapeck Dox modificado, Khanna modificado e Meio mínimo, podem ter influenciado negativamente a produção dessa enzima, uma vez que é relatado na literatura o efeito inibitório dos íons Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , presentes no meio de cultura, sobre a produção da enzima (SEN, RAY e CHATTOPADHYAY, 2012; CARDOSO et al., 2017; YAMADA et al., 2017).

A seleção das melhores condições para o processo em FSbm permitiu o aumento de 5,7 vezes no valor de atividade β -galactosidásica considerando 312 horas de cultivo realizado em meio Nakao-lactose modificado contendo 3% (v/v) de soro de leite como fonte de carbono, 0,7 (m/v) de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, pH 6,0, a 30°C e 120 rpm.

4.3 Purificação de β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp.

Duas estratégias de purificação foram adotadas a fim de se obter β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. pura, sendo elas a cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e a precipitação com sulfato de amônio 50% seguida de cromatografia de exclusão molecular (Sephacrose CL-6B).

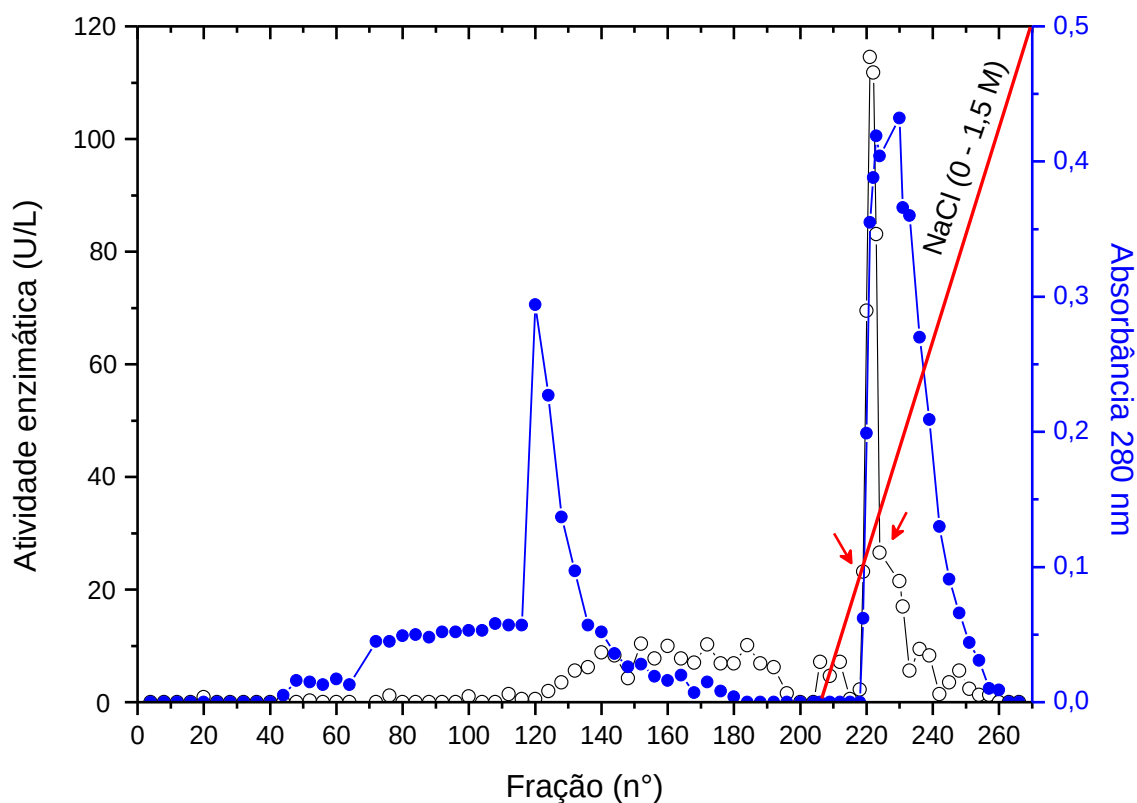
4.3.1 Cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

A Figura 11 mostra o perfil cromatográfico obtido para o filtrado extracelular contendo β -galactosidase e aplicado em coluna cromatográfica DEAE-celulose, sendo observado um único pico de atividade enzimática. As frações com atividade β -galactosidásica interagiram com a resina, sendo o pico de atividade eluído com 387 mmol/L de NaCl. As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas em um único *pool* (frações 219-231), o qual foi dialisado e usado para determinação da atividade enzimática e específica.

Com este procedimento obteve-se fator de purificação de 1,23 vezes e recuperação de 11,2% (Tabela 6). De acordo com a literatura, geralmente, os processos de purificação de β -galactosidase envolvem várias etapas cromatográficas, obtendo fatores de purificação e rendimentos variados (NAKAO et al., 1994; NAGY et al., 2001b; ADALBERTO et al., 2006; ISOBE et al., 2013; LIMA et al., 2016; XIA et al., 2018; KAMRAN et al., 2019).

O processo de purificação em DEAE-celulose foi acompanhado por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 10%), o qual revelou a presença de três bandas proteicas definidas e um arraste de proteínas entre 15 e 25 kDa (Figura 12).

Figura 11 - Perfil cromatográfico em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-celulose para proteínas extracelulares produzidas pelo fungo *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm em meio Nakao-lactose modificado contendo soro de leite como fonte de carbono. Símbolos: absorvância a 280 nm (●); atividade enzimática (○).



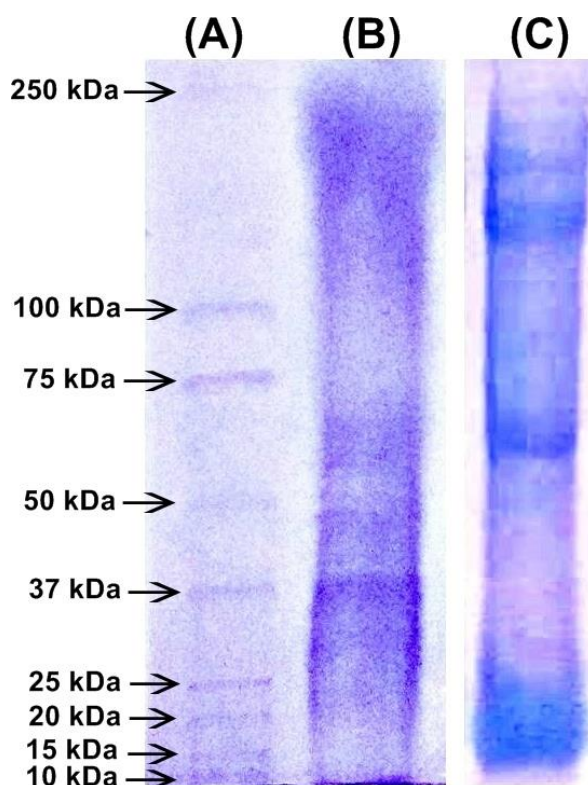
Fonte: Autor.

Tabela 6 - Purificação da β -galactosidase extracelular produzida por *Trichoderma* sp. em FSbm.

Passos	Volume (mL)	Atividade (U totais)	Proteína (mg totais)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação de proteínas (%)	Recuperação de atividade total (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	300	10,5	3,90	2,70	100	100	1
DEAE - celulose	11,5	1,17	0,35	3,32	9,0	11,12	1,23

Fonte: Autor.

Figura 12 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) para fração contendo β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. (A) - marcador de massa molecular; (B) – filtrado bruto extracelular; (C) – pool obtido na cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose).



Fonte: Autor.

Neste trabalho, utilizando cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose), não foi possível purificar completamente a enzima β -galactosidase, e isto é evidenciado pelo perfil proteico obtido em SDS-PAGE. Por este motivo, optou-se por outra estratégia de purificação como apresentado a seguir.

4.3.2 Precipitação com sulfato de amônio 40-60%

A precipitação de proteínas pelo aumento gradativo da concentração de sais é um processo muito importante para separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína (ENGLARD e SEIFTER, 1990; KAMRAN et al., 2019). Observa-se na Tabela 7 que a adição de 50% sulfato de amônio foi a mais eficaz na precipitação da β -galactosidase, com atividade específica de 0,98 U/mg de proteína e recuperação de 27,1%. Resultados semelhantes

foram encontrados por Kamran e colaboradores (2019) ao verificarem a melhor concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para precipitação de β -galactosidase de *Aspergillus nidulans*.

Tabela 7 - Precipitação de β -galactosidase em diferentes concentrações de sulfato de amônio.

Sulfato de amônio (%)	Volume (mL)	Atividade (U totais)	Proteína (mg totais)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação de proteína (%)	Recuperação de atividade total (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	50	1,32	1,48	0,89	100	100	1
40	6	0,29	0,30	0,97	20,3	21,5	1,08
50	6	0,36	0,36	0,98	24,3	27,1	1,10
60	6	0,25	0,25	0,98	16,9	18,6	1,09

Fonte: Autor.

Diversos autores utilizaram a precipitação com sulfato de amônio em etapas de purificação da β -galactosidase. Chiba, Yamada e Isobe (2015) utilizaram como primeiro passo da purificação de uma β -galactosidase do fungo *Teratosphaeria acidotherma* AIE BGA-1 a precipitação com 45% sulfato de amônio, obtendo aumento na atividade específica da enzima, além de um fator de purificação de 2,2 e rendimento de 47%. Raol e pesquisadores (2015) realizaram precipitação de β -galactosidase de *Aspergillus tubigenisis* GR1 com 90% de sulfato de amônio e, obtiveram fator de purificação de 19 vezes com rendimento de 31,83%. Lima e colaboradores (2016) utilizaram como primeiro passo da estratégia de purificação da β -galactosidase de *Kluyvermyces lactis* a precipitação com 85% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e verificaram aumento na concentração e atividade específica da enzima apesar do baixo fator de purificação (1,01). Xia e pesquisadores (2018) também utilizaram a precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20% (m/v) para a β -galactosidase produzida por *Erwinia* sp. E602, obtendo fator de purificação de 1,93 vezes.

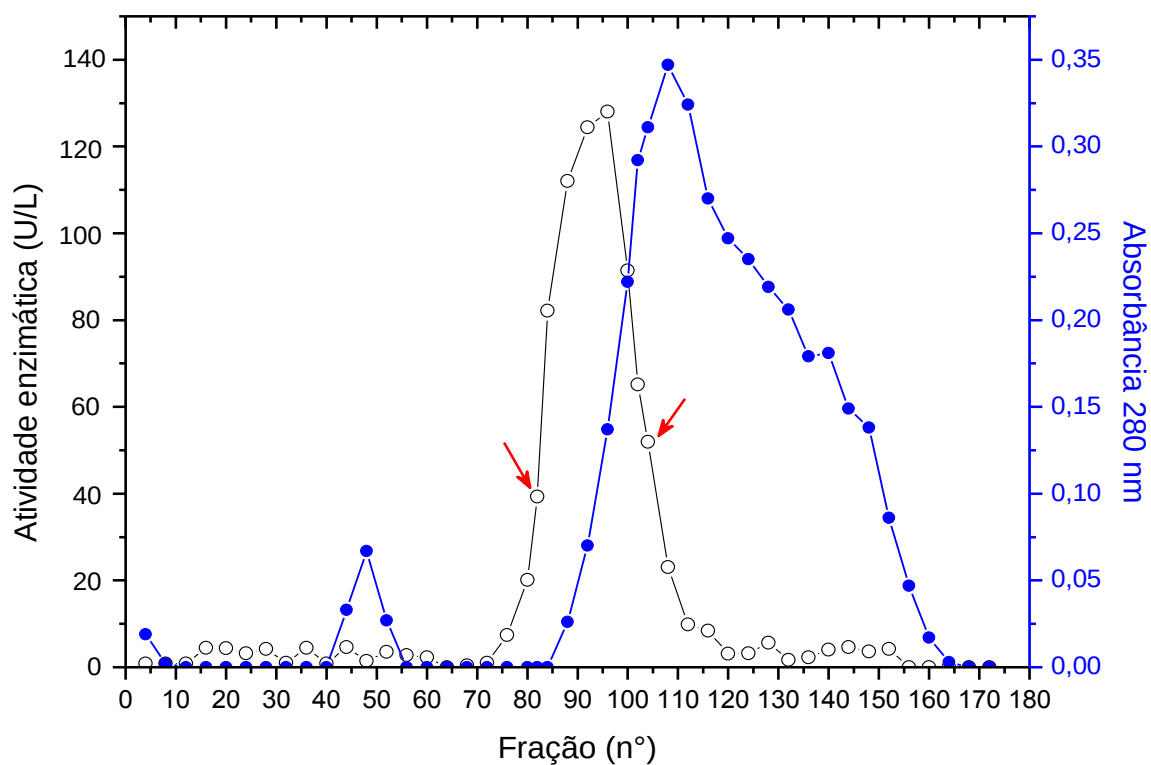
4.3.3 Cromatografia de exclusão molecular (Sephacrose CL-6B)

As proteínas precipitadas com 50% sulfato de amônio foram aplicadas na resina Sepharose CL-6B. A Figura 13 mostra o perfil cromatográfico obtido, identificando-se dois picos de proteínas, sendo a atividade da β -galactosidase

observada apenas no início do segundo pico. As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas em um único *pool*, o qual foi dialisado e usado para determinação da atividade enzimática. A β -galactosidase produzida por *Trichoderma* sp., foi purificada 1,3 vezes com recuperação de 12,3% (Tabela 8).

Os processos de purificação de β -galactosidase envolvem várias etapas cromatográficas. As cromatografias de troca iônica e de exclusão molecular são bastante utilizadas por diversos autores. A β -galactosidase de *T. reesei* FTKO foi purificada 12,9 vezes utilizando, entre os passos de purificação, as colunas de troca iônica DEAE-celulose e de exclusão molecular Sephacryl S-300. O rendimento dessa purificação foi de 4,92% (ADALBERTO et al., 2006). A enzima produzida por *Aspergillus niger* P47C3 foi purificada 5,3 vezes com rendimento de 1,1% (TONELOTTO et al., 2014). A β -galactosidase produzida por *Teratosphaeria acidotherma* AIE BGA-1 foi purificada 2.680 vezes com rendimento de 3,4%, utilizando diversas etapas de purificação, entre elas as cromatografias de troca iônica e de exclusão molecular (CHIBA, YAMADA e ISOBE, 2015). A β -galactosidase de *A. tubingensis* GR1 foi purificada 58,5 vezes utilizando como último passo a coluna Sephadex G-100 com rendimento de 1,4% (RAOL et al., 2015). Neste trabalho utilizando a precipitação com 50% de sulfato de amônio, seguida por cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl CL-6B), não foi possível purificar completamente a enzima, como pode ser observado na Figura 14. Analisando o perfil de proteínas obtido em SDS-PAGE 10%, duas bandas proteicas (37 e 33 kDa) definidas podem ser observadas, bem como outras proteínas de massas moleculares maiores. Há trabalhos que relatam o aparecimento de duas bandas proteicas para a β -galactosidase de fungos filamentosos e de leveduras em SDS-PAGE (LIMA et al., 2016; MARTARELLO, 2016). Nagy e pesquisadores (2001) relataram a purificação de uma β -galactosidase multimérica de 270 kDa secretada por *Penicillium chrysogenum*. Isobe e colaboradores (2013) encontraram uma β -galactosidase produzida por *Teratosphaeria acidotherma* AIE BGA-1 de 140 kDa com duas subunidades, uma de 86 kDa e outra de 50 kDa. Neste trabalho, há possibilidade da presença de uma enzima dimérica secretada por *Trichoderma* sp. em FSbm.

Figura 13 - Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Sepharose CL-6B para a β -galactidase extracelular produzida por *Trichoderma* sp. em FSbm após precipitação com sulfato de amônio 50%. Símbolos: Absorbância a 280 nm (●); Atividade enzimática (○).



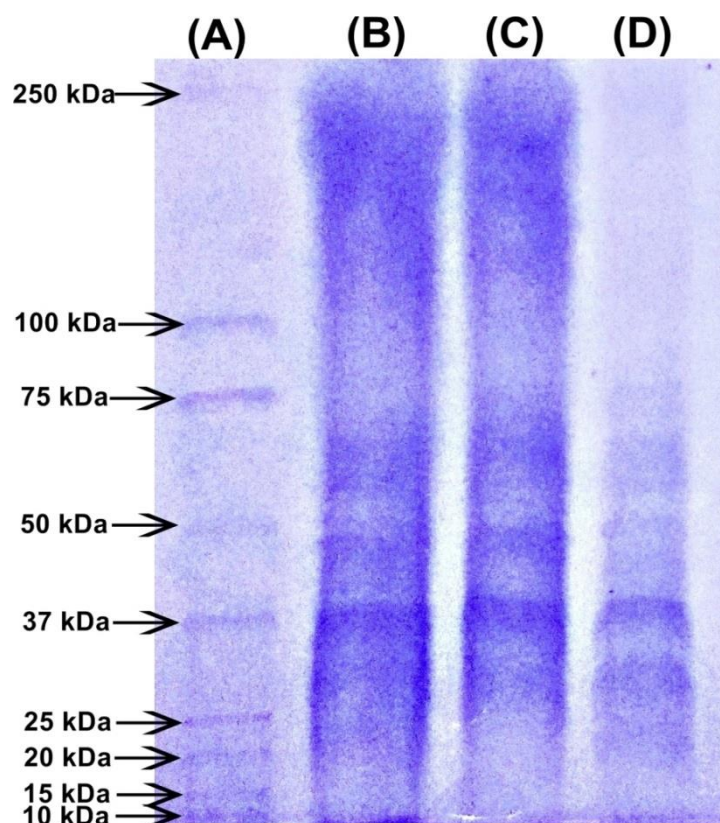
Fonte: Autor.

Tabela 8 - Purificação da β -galactosidase extracelular produzida por *Trichoderma* sp. em FSbm.

Passos	Volume (mL)	Atividade (U totais)	Proteína (mg totais)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação de proteínas (%)	Recuperação de atividade total (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	330	13,4	9,3	1,44	100	100	1
Precipitação (50%)	19	4,66	3,0	1,56	32,3	34,7	1,08
Sepharose CL-6B	23	1,65	0,9	1,90	9,7	12,3	1,3

Fonte: Autor.

Figura 14 - Perfil proteico obtido por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 10%) para β -galactosidase extracelular produzida por *Trichoderma* sp. em FSbm: (A) - marcador de massa molecular; (B) – filtrado bruto extracelular; (C) – proteínas obtidas após a precipitação com sulfato de amônio (50% m/v); (D) - *pool* obtido em coluna cromatográfica Sepharose CL-6B.



Fonte: Autor.

Neste trabalho não foi possível purificar totalmente a enzima β -galactosidase, e isto é evidenciado pelos perfis proteicos obtidos pelas eletroforeses desnaturante nas duas estratégias de purificação propostas. Por este motivo, optou-se por continuar o trabalho utilizando o filtrado bruto contendo a β -galactosidase produzida por *Trichoderma* sp. em FSbm.

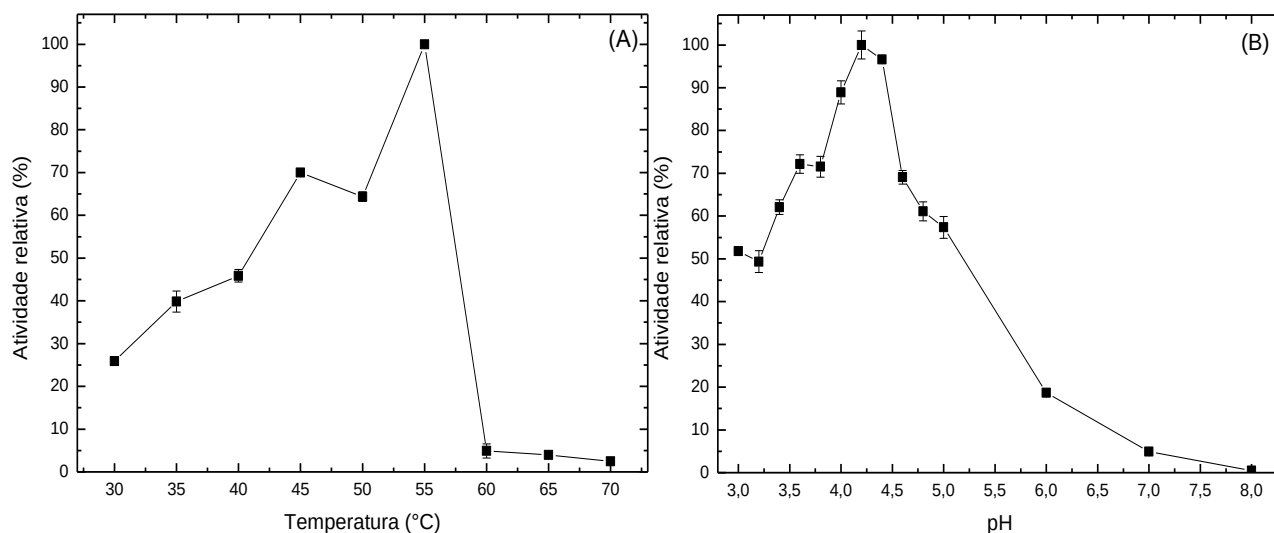
4.4 Caracterização bioquímica da β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. em FSbm

4.4.1 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade da β -galactosidase

As influências da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática da β -galactosidase contida no filtrado bruto produzido em FSbm e dialisado foram avaliadas. Na Figura 15A, observa-se que ocorreu um aumento progressivo na atividade β -galactosidásica a partir de 30 °C, sendo a maior atividade obtida na temperatura de 55°C. Acima desta temperatura a atividade enzimática diminuiu drasticamente, possivelmente pela desnaturação da enzima, provocada pela intensa agitação das moléculas que gera o rompimento das ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima (NELSON; COX, 2014).

De forma geral, as β -galactosidases obtidas de fungos filamentosos atuam melhor entre 50°C e 60°C. Nakkharat e Haltrich (2006) verificaram temperatura ótima de 50°C para a β -galactosidase produzida pelo fungo *Talaromyces thermophilus*. Ao estudar β -galactosidases produzidas pelos fungos *A. brasiliensis*, *A. restrictus*, *A. uvarum*, *P. brevicompactum*, *P. italicum*, *P. spinulosum*, *Mucor* sp. e *T. versicolor*, Silvério e colaboradores (2018) verificaram que todas as enzimas produzidas apresentaram maior atividade em 55°C. Yamada e colaboradores (2017), ao estudar a produção dessa enzima por *Teratosphaeria acidotherma* concluíram, após a caracterização bioquímica, que a temperatura ótima de atividade foi de 60°C.

Figura 15 - Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da β -galactosidase secretada pelo fungo *Trichoderma* sp. em FSbm. Em (A) 100% = 34,0 U/L e em (B) 100% = 22,0 U/L.



Fonte: Autor.

Na Figura 15B, observa-se que a β -galactosidase produzida por *Trichoderma* sp. apresentou maior atividade no pH 4,2. A partir do pH 4,5 houve uma diminuição gradativa da atividade enzimática, chegando a zero no pH 8,0. O comportamento dessa enzima perante o pH foi similar ao relatado em outros trabalhos, onde a enzima mostrou atividade ótima em pH ácido. Silvério e colaboradores (2018) verificaram que β -galactosidases produzidas por *A. restrictus*, *A. uvarum*, *P. brevicompactum*, *P. italicum*, *P. spinulosum*, *Mucor* sp. e *T. versicolor* apresentaram maiores atividades em pH entre 3,0 e 4,5. Cardoso e colaboradores (2017), ao estudarem a produção dessa enzima por *A. lacticoffeatus*, observaram comportamento similar ao encontrado neste trabalho, com melhor pH de atividade de 4,5 e redução gradativa da atividade em valores de pH acima deste valor. Sabe-se que o grau de acidez do meio pode afetar diretamente a estrutura proteica das enzimas, uma vez que estas são estabilizadas por ligações de hidrogênio, ligações covalentes, ligações eletrovalentes, entre grupos carboxílicos e amínicos livres, e as cadeias laterais presentes nos aminoácidos. Dependendo do pH do meio, íons da estrutura proteica são protonados ou desprotonados. Em pH básico, pode ocorrer a conversão do íon $-\text{NH}_3^+$ em $-\text{NH}_2$ podendo manter o grupamento $-\text{COO}^-$ com carga inalterada. Desta forma, este deixa de contribuir para a estabilização da

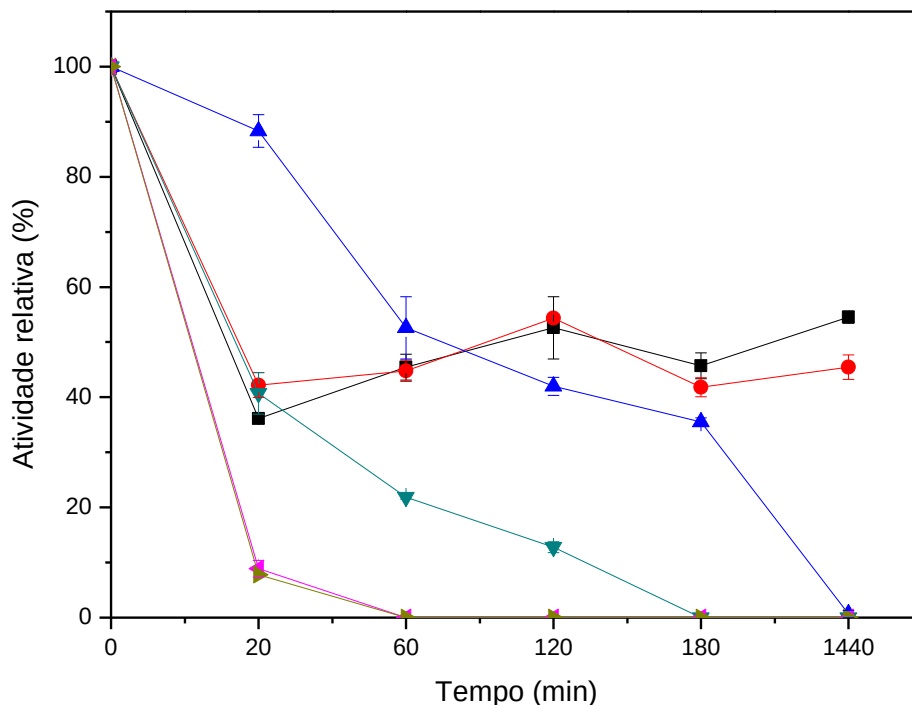
conformação proteica e os grupos com mesma carga começam a se repelir, favorecendo o desenovelamento da cadeia peptídica (NELSON; COX, 2014).

4.4.2 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH

As Figuras 16 e 17 mostram os resultados obtidos para a avaliação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp.

Os resultados obtidos para termoestabilidade (Figura 16) mostram que, quando incubada nas temperaturas de 35 °C e 40 °C, para os primeiros 20 min de incubação, a β -galactosidase apresenta uma queda da atividade enzimática e mantém-se constante, com algumas variações, até o período de 1440 min. Para a estabilidade a 45 °C observa-se uma diminuição de 10% na atividade enzimática em 20 min de incubação. Após este período nota-se uma queda progressiva na atividade β -galactosidásica até 1440 min. Já para a termoestabilidade a 50 °C, 55 °C e 60 °C ocorreu uma queda drástica nos primeiros 20 min de incubação e após 60 min não foi verificada a presença de atividade β -galactosidásica nas temperaturas de 55 °C e 60 °C. A enzima apresentou um tempo de meia vida (T_{50}) de 90 min para as temperaturas de 35 °C, 40 °C e 45 °C, já para as temperaturas de 55 °C e 60 °C o T_{50} foi em torno de 12 min. Na literatura são relatadas diferentes termoestabilidades para as β -galactosidases de origem microbiana. A β -galactosidase de *A. nidulans* foi estável a 40 °C e manteve 100% da sua atividade durante 120 min. Quando incubada a 50°C e 60 °C perdeu 30% e 95%, respectivamente, de sua atividade neste mesmo período (KAMRAN et al., 2018). A enzima produzida por *A. niger* foi estável a 50 °C por um período de 1440 min (MARTARELLO et al., 2019), enquanto a β -galactosidase de *A. japonicus* perdeu 100% da sua atividade em 300 min nesta mesma temperatura (SAAD et al., 2004). Já a β -galactosidase secretada por *Aspergillus tubingensis* GR1, no período de 180 min, reteve 49%, 45% e 38% de sua atividade nas temperaturas de 55 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente (RAOL et al., 2015).

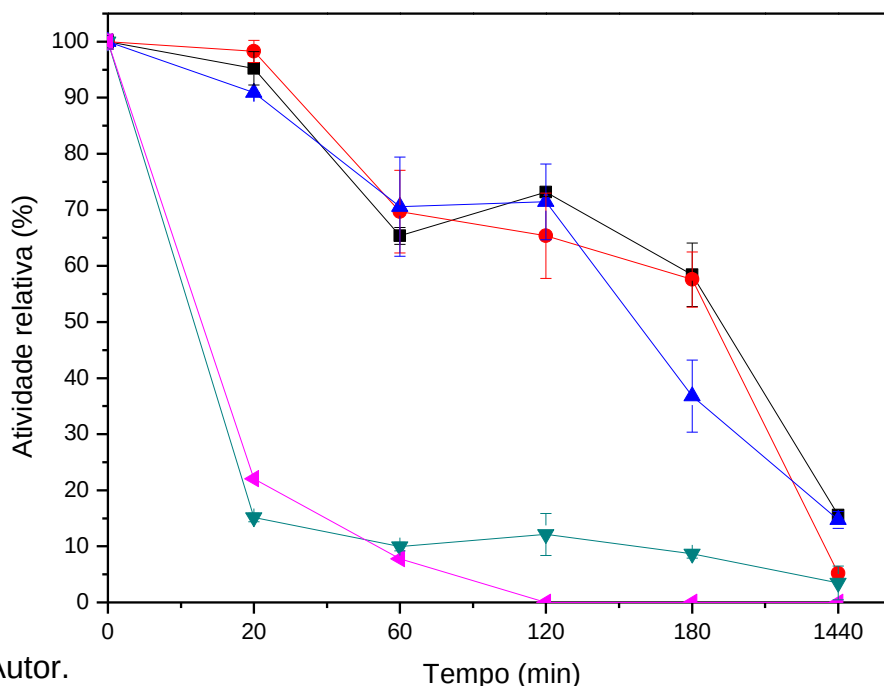
Figura 16 - Estabilidade térmica da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. produzida em FSbm a 35 °C (■), 40 °C (●), 45 °C (▲), 50 °C (▼), 55 °C (◆) e 60 °C (▷) por diferentes períodos de tempo (20 a 1440 minutos). 100% = $32,0 \pm 0,5$ U/L.



Fonte: Autor.

Os resultados obtidos para a estabilidade ao pH (Figura 17) mostram que a β -galactosidase incubada nos primeiros 20 min perdeu pouco da sua atividade nos valores de pH 3, 4 e 5. Após este período foi possível observar uma redução gradativa na atividade β -galactosidásica, chegando a 20% do valor inicial após 1440 min de incubação. Além disto, foi obtido um T_{50} de 160 min quando a amostra enzimática foi mantida em pH 5 e T_{50} acima de 180 min mantendo esta amostra em pH 3 e 4. Em pH 7 e 9 houve uma redução drástica na atividade β -galactosidásica com 20 min de incubação, cerca de 77% e 85%, respectivamente. Quando mantida no pH 7 e 9 por 1440 min, houve redução de 97% e 100% de sua atividade, respectivamente. A maioria dos trabalhos encontrados em literatura relatam a estabilidade da β -galactosidase em pH ácido (CARDOSO et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2018). β -galactosidase de *A. tubingensis* GR1 incubada durante 1440 min manteve 100% da sua atividade em pH 3,5, 4,5 e 5,5. Já em pH 7,5 e 8,5 ocorreu uma redução de 78% e 85%, respectivamente, na atividade β -galactosidásica (RAOL et al., 2015).

Figura 17 - Estabilidade ao pH da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. produzida em FSbm, incubou-se a enzima em variados pH: 3,0 (■); 4,0 (●); 5,0 (▲); 7,0 (▼) e 9,0 (◄) por diferentes períodos de tempo (20 a 1440 minutos). 100% = $32,0 \pm 0,5$ U/L.



Fonte: Autor.

4.4.3 Influência de diferentes sais e outros compostos na atividade β -galactosidásica

A ativação ou inibição das enzimas pode estar relacionada com a presença ou ausência de íons, através da influência direta sobre as estruturas terciárias das enzimas. Além disto, a presença de íons pode causar alterações nas propriedades cinéticas das enzimas, bem como interferência na solubilidade e modificações na carga global da molécula (NELSON; COX, 2014).

No presente estudo, a β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. foi ativada na presença de AgNO_3 , MnCl_2 e MnSO_4 , com destaque para MnCl_2 , que foi capaz de aumentar em 130,1% a atividade β -galactosidásica (Tabela 9). Outros autores relatam o aumento da atividade enzimática na presença de Mn^{2+} para as β -galactosidas de *Aspergillus tubingensis* GR1 (RAOL et al., 2015), *Guehomyces pullulans* 17-1 (SONG et al., 2011), *Streptococcus thermophilus* LMD9 (RHIMI et al., 2010) e *Teratosphaeria acidotherma* AIU

BGA-1 (YAMADA et al., 2017). Houve uma redução da atividade β -galactosidásica na presença dos sais CoCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , KI , MgCl_2 , MgSO_4 , NH_4F e ZnSO_4 , destacando-se KI , MgSO_4 e FeCl_3 que conduziram a reduções de 42,9%, 49,1% e 52,4%, respectivamente. Diversos trabalhos demonstram o efeito inibitório dos íons Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} sobre a atividade β -galactosidásica (SEN, RAY e CHATTOPADHYAY, 2012; CARDOSO et al., 2017; YAMADA et al., 2017). Song e colaboradores (2010) observaram uma redução na atividade enzimática da β -galactosidase de *G. pullulans* 17-1 na presença dos sais FeCl_3 e MgSO_4 . A inibição da atividade β -galactosidásica na presença de Co^{2+} e Zn^{2+} foi relatada para a β -galactosidase de *A. tubingensis* GR1 (RAOL et al., 2015).

Tabela 9 - Efeito de diferentes sais na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm. 100% = $32,0 \pm 0,5$ U/L.

Sais (1 mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
AgNO_3	$154,7 \pm 8,2$
BaCl_2	$81,7 \pm 2,7$
CaCl_2	$84,1 \pm 1,4$
CoCl_2	$59,5 \pm 2,4$
CuSO_4	$59,5 \pm 6,3$
FeCl_3	$47,6 \pm 0$
KH_2PO_4	$81,7 \pm 2,7$
KI	$57,1 \pm 4,1$
MgCl_2	$57,9 \pm 5,9$
MgSO_4	$62,5 \pm 2,0$
MnCl_2	$230,1 \pm 1,4$
MnSO_4	$163,6 \pm 5,9$
NaBr	$74,6 \pm 7,6$
NaH_2PO_4	$87,3 \pm 1,3$
NaNO_3	$100,8 \pm 1,3$
NH_4F	$62,7 \pm 1,3$
ZnSO_4	$63,5 \pm 7,2$

Fonte: Autor.

Outros compostos químicos que podem influenciar a atividade enzimática da β -galactosidase são os surfactantes, quelantes, desnaturantes e solventes orgânicos. A Tabela 10 mostra que apenas na presença de metanol ocorreu aumento na atividade β -galactosidásica. Já na presença dos solventes orgânicos acetona, acetonitrila, butanol, etanol e isopropanol ocorreu uma redução na atividade enzimática, com destaque para acetonitrila e butanol, com diminuição de 31,8% e 51,6%, respectivamente. Solventes orgânicos podem favorecer no aumento da solubilidade de substratos não polares, aumentar a estabilidade térmica da enzima, diminuir as reações secundárias dependentes de água e eliminar contaminação microbiana (CHHOKAR et al., 2010). Alguns trabalhos relatam a estabilidade da β -galactosidase em solventes orgânicos, como as produzidas por *A. nidulans* (KAMRAN et al., 2018) e *Halorubrum lacusprofundi* (KARAN et al., 2013), que mantiveram as atividades catalíticas na presença de etanol, isopropanol e metanol.

As menores atividades da enzima foram observadas na presença de SDS (27,8%) e β -mercaptoetanol (49,2%). Song e colaboradores (2010) verificaram a diminuição de 90% da atividade da β -galactosidase do isolado de *G. pullulans* 17-1 na presença do surfactante SDS. Diferente dos resultados encontrados no presente estudo, Kamran e pesquisadores (2018) demonstraram que na presença do SDS a atividade inicial da β -galactosidase de *A. nidulans* foi mantida. A diminuição da atividade β -galactosidásica na presença de β -mercaptoetanol pode estar relacionada a capacidade deste composto em clivar pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteínas da estrutura proteica da enzima (ALVES, 2017; CHHOKAR et al., 2010).

Os demais compostos apresentaram apenas uma pequena redução em relação ao controle, com manutenção da atividade β -galactosidásica entre 73 e 80%. A diminuição de 27% da atividade catalítica da β -galactosidase de *Trichoderma* sp. foi verificada na presença uréia, diminuição esta causada pela capacidade deste composto químico em alterar a conformação da estrutura terciária de enzimas, promovendo a desnaturação.

Tabela 10 - Efeito de diferentes compostos químicos na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm. 100% = $32,0 \pm 0,5$ U/L.

Compostos	Atividade relativa (%)
Controle	100
Acetona (1%)	$80,1 \pm 1,4$
Acetonitrila (1%)	$68,2 \pm 1,4$
Butanol (1%)	$48,4 \pm 1,3$
EDTA (1mM)	$79,3 \pm 6,9$
Etanol (1%)	$82,5 \pm 5,5$
Isopropanol (1%)	$91,2 \pm 2,7$
Metanol (1%)	$108,7 \pm 1,3$
SDS (1mM)	$27,8 \pm 1,4$
Triton X-100 (0,01%)	$73,8 \pm 6,3$
Tween - 20 (0,01%)	$90,4 \pm 4,8$
Uréia (1mM)	$73,0 \pm 1,4$
β -mercaptoetanol (1mM)	$49,2 \pm 1,3$

Fonte: Autor.

4.5 Aplicações da β -galactosidase

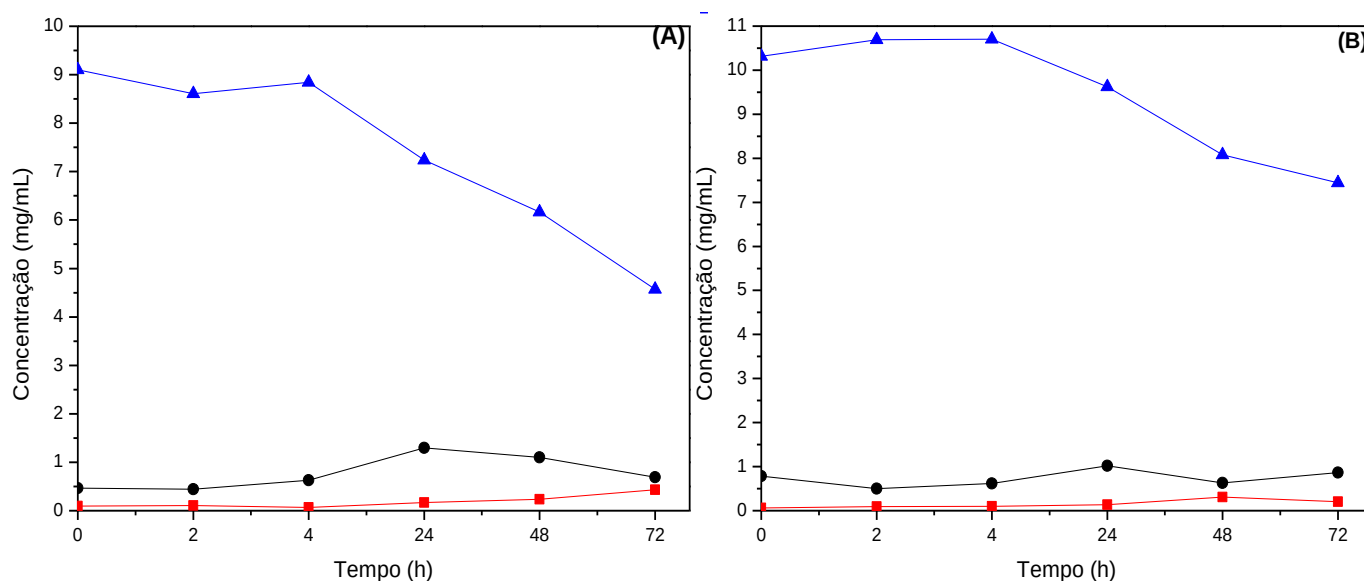
4.5.1 Hidrólise do efluente de indústria láctea

Amostras de efluente de indústria láctea obtidas do processo de produção de queijos foram tratadas durante 72 horas com o filtrado bruto contendo β -galactosidase de *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm.

É possível observar na Figura 18A que o uso do filtrado bruto contendo β -galactosidase no tratamento do efluente em proporções iguais (1:1 v/v) possibilitou a redução da concentração de lactose contida no soro de queijo, principalmente a partir de 24 horas de tratamento, reduzindo em 20,5% e ao final de 72 horas de tratamento 50% da lactose foi removida, evidenciando assim a habilidade hidrolítica da enzima. Na Figura 18B observa-se que na proporção 1:0,5 (v/v) entre o efluente e o filtrado contendo β -galactosidase, foi eficiente na hidrólise da lactose, assim como na proporção 1:1 (v/v), que ocorreu redução de 27,9% no teor de lactose. Houve uma diferença significativa no uso de diferentes quantidades de filtrado bruto durante o

tratamento do soro de queijo. Desta forma, a utilização em proporções iguais do soro de queijo e de β -galactosidase favoreceu a hidrólise da lactose. De acordo com Prenosil e colaboradores (1987), para aplicações industriais da β -galactosidase, a conversão da lactose acima de 75% em glicose e galactose é desejável. No presente trabalho, as taxas de hidrólise foram menores. Uma possível explicação para estes resultados pode ser a inibição competitiva que os produtos de reação, glicose e galactose, exercem sobre a enzima (CARMINATTI, 2001; RODRIGUEZ; CRAVERO; ALONSO, 2008). A galactose possui uma grande capacidade de inibição sobre a β -galactosidase, como observado para as enzimas de *Aspergillus foetidus* (MARTARELLO, 2016), *Aspergillus oryzae* (VERA et al., 2011) e *Kluyveromices* sp. (CARMINATTI, 2001).

Figura 18 - Tratamento do soro de queijo com filtrado bruto contendo β -galactosidase de *Trichoderma* sp. nas proporções 1:1 (A) e 1:0,5 (B) durante 72 horas. Símbolos: lactose ($\blacktriangle$), glicose ($\blacksquare$) e galactose ($\bullet$).



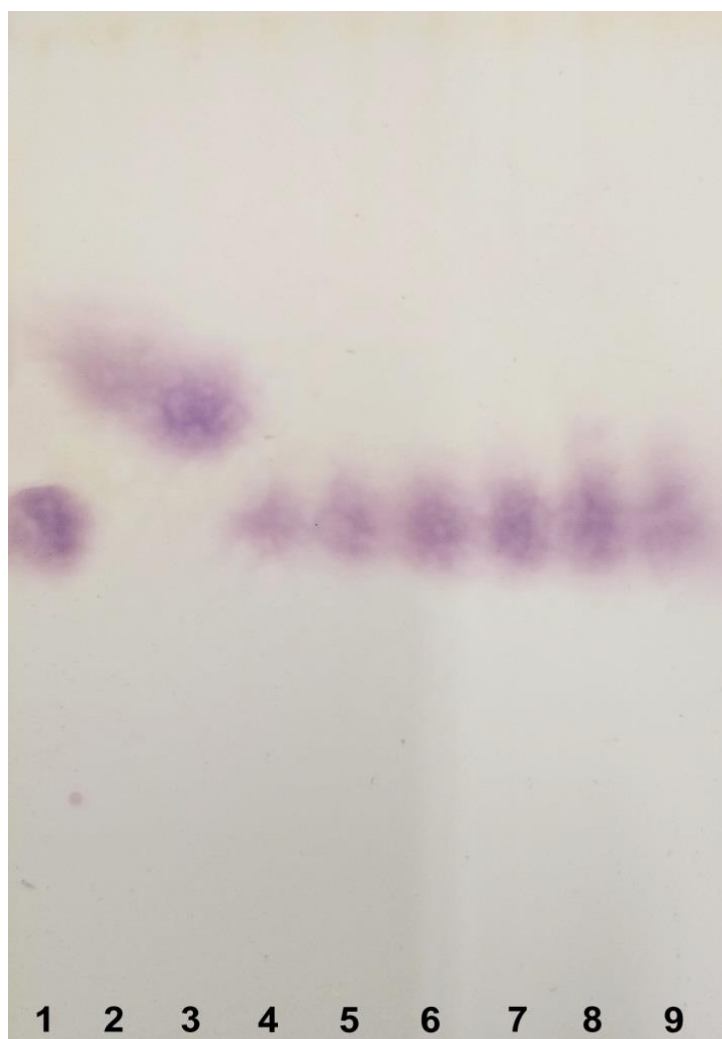
Fonte: Autor.

4.5.2 Produção de Galactooligossacarídeos (GOS)

Foi analisada a habilidade da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. em catalisar a reação de transgalactosilação. Na Figura 19 é apresentado o perfil cromatográfico em TLC dos produtos de reação gerados pela ação da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. sobre diferentes concentrações de lactose, não sendo observada a presença de GOS. A

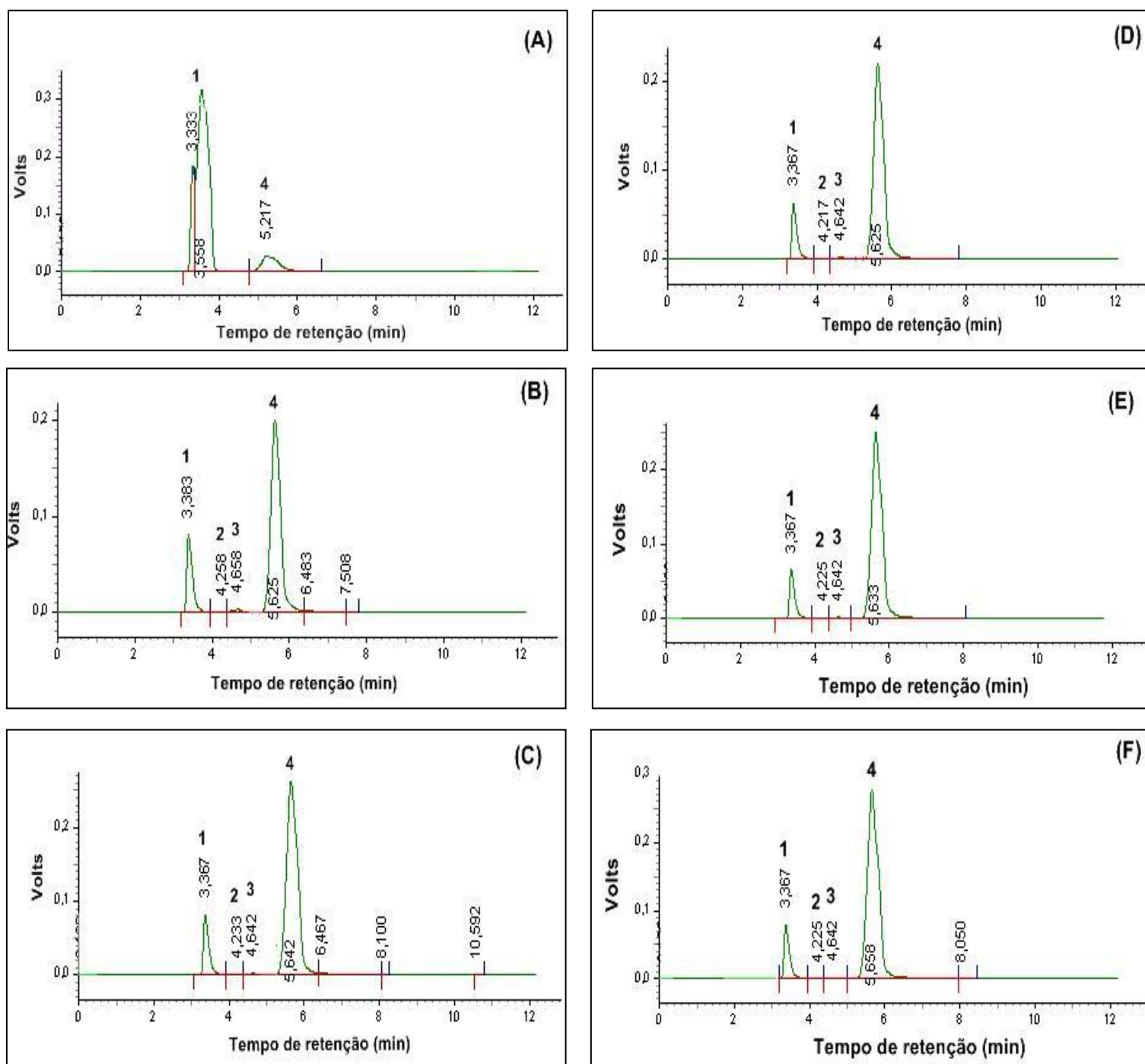
ausência de atividade de transgalactosilação da β -galactosidase é evidenciada pelos perfis cromatográficos obtidos em HPLC. Nota-se, na Figura 20, a ausência de picos que não sejam referentes à formação dos produtos de hidrólise da lactose. Apesar da grande maioria dos trabalhos verificarem a formação de GOS, neste trabalho não foi observada a formação desses oligossacarídeos. Provavelmente ocorreu a inibição da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp., na presença de altas concentrações de lactose ou até mesmo devido a sua baixa atividade enzimática (NAKKHARAT e HALTRICH, 2006; SANTOS; SIMIQUELI; PASTORE, 2009; LIU et al., 2019).

Figura 19 - Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) dos produtos de reação obtidos pela ação da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. em diferentes concentrações de lactose por um período de 24 horas a 37 °C, sendo: (1) Lactose 1% (m/v); (2) Glicose 1% (m/v); (3) Galactose 1% (m/v); (4) Lactose 10% (m/v); (5) Lactose 20% (m/v); (6) Lactose 30% (m/v); (7) Lactose 40% (m/v); (8) Lactose 50% (m/v); (9) Lactose 70% (m/v).



Fonte: Autor.

Figura 20 - Perfil cromatográfico em High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dos produtos de reação da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. sobre diferentes concentrações de lactose: **(A)** Lactose 10% (m/v); **(B)** Lactose 20% (m/v); **(C)** Lactose 30% (m/v); **(D)** Lactose 40% (m/v); **(E)** Lactose 50% (m/v); **(F)** Lactose 70% (m/v) sendo: (1) Água ultrapura; (2) Glicose; (3) Galactose e (4) Lactose.



Fonte: Autor.

Parte II

Produção e caracterização de β -galactosidase extracelular por *Trichoderma* sp. em Fermentação de Estado Sólido (FES)

4.6 Produção de β -galactosidase em Fermentação em Estado Sólido (FES) por *Trichoderma* sp.

De acordo com a Tabela 11, a máxima produção de β -galactosidase foi visualizada quando empregado como substrato sólido o farelo de trigo (0,311 U/g de substrato), sendo o valor de atividade específica (0,154 U/mg de prot.) 2,3 vezes e 2,4 vezes maiores quando comparado aos obtidos com o uso dos substratos sólidos farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente. Foi observado o crescimento do fungo nos substratos sólidos bagaço de cana-de-açúcar, casca de laranja, farinha de aveia, farinha de centeio e farelo de milho; entretanto não houve síntese da enzima de interesse. Os resultados encontrados neste trabalho estão coerentes aos descritos na literatura, onde diversos autores relataram que a utilização do farelo de trigo em FES induz a produção de β -galactosidases por diversas espécies de microrganismos. E isto é explicado pelo alto teor de hemiceluloses, grande disponibilidade de açúcares totais e a presença de nutrientes que favorecem a degradabilidade do farelo de trigo pelos microrganismos (KHAYATI, ANVARI e KAZEMI, 2014; RAOL et al., 2015b; KAUR, PANESAR e SING, 2018).

Tabela 11 - Produção de β -galactosidase em FES por *Trichoderma* sp. em função do substrato sólido.

Substratos	Atividade enzimática (U/g de substrato)	Atividade específica (U/mg de prot.)
Bagaço de cana-de-açúcar	0	0
Casca de laranja	0	0
Farelo arroz	0,083 $\pm$ 0	0,067 $\pm$ 0
Farinha de aveia	0	0
Farinha de centeio	0	0
Farelo de milho	0	0
Farelo de soja	0,055 $\pm$ 0, 004	0,062 $\pm$ 0,004
Farelo de trigo	0,311 $\pm$ 0	0,154 $\pm$ 0

Os cultivos foram realizados em FES por 120 horas, a 30°C, utilizando água de torneira como solução umectante na proporção 1:1 (m/v).

4.7 Influência das soluções umectantes na produção de β -galactosidase

No intuito de melhorar a produção de β -galactosidase em FES, água destilada, água de torneira, sais Czapeck, sais de Khanna, sais de Vogel, sais SR e soro de leite, na proporção 1:1 (m/v), foram testados como soluções para umidificar o farelo de trigo. Na Tabela 12, observa-se que as produções mais expressivas ocorreram na presença de sais de Vogel (1,207 U/g de subst.), sais Czapeck (1,154 U/g de subst.) e água de torneira (1,153 U/g de subst.). Por outro lado, na presença de soro de leite a síntese da enzima foi reduzida (0,50 U/g de subst.). Sais Czapeck e sais de Vogel possuem como constituintes comuns o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) que possivelmente favoreceu a produção da enzima, uma vez que, a presença do íon Mg^{2+} foi relatada como necessária para a produção de β -galactosidase (HUBER, ROTH e BAHL, 1996; YAMADA et al., 2017). Não foram encontrados trabalhos que utilizassem água de torneira como solução umectante para produção dessa enzima em FES, porém é notório que há presença de diversos tipos de sais na água de torneira, o que deve ter favorecido a produção da enzima. Diversos trabalhos encontrados na literatura utilizam soro de leite ou de queijo como solução umectante (RAOL et al., 2015; KAUR, PANESAR e SINGH, 2018). No presente estudo, não foi verificada uma atividade significativa quando se utilizou soro de leite como solução umectante e, provavelmente a ausência de alguns sais tenha afetado negativamente a síntese da enzima em questão. Devido o fácil acesso e o baixo custo, a água de torneira foi selecionada como solução umectante para o farelo de trigo na FES.

Tabela 12 - Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FES sobre a produção de β -galactosidase extracelular por *Trichoderma* sp. empregando como substrato sólido farelo de trigo.

Soluções umectantes 1:1 (m/v)	Atividade enzimática (U/g de substrato)	Atividade específica (U/mg de prot.)
Água destilada	1,051 $\pm$ 0,033	0,611 $\pm$ 0,013
Água de torneira	1,153 $\pm$ 0,033	0,568 $\pm$ 0,018
Sais Czapeck	1,154 $\pm$ 0,120	0,511 $\pm$ 0,003
Sais de Khanna	0,516 $\pm$ 0,024	0,024 $\pm$ 0,014
Sais de Vogel	1,207 $\pm$ 0,057	0,543 $\pm$ 0,048
Sais SR	0,836 $\pm$ 0,002	0,330 $\pm$ 0,002
Soro de leite	0,502 $\pm$ 0,013	0,333 $\pm$ 0,010

Os cultivos foram realizados em FES por 120 horas, a 30°C.

Na Fermentação em Estado Sólido foi observada a máxima síntese de β -galactosidase extracelular pelo fungo *Trichoderma* sp. com farelo de trigo como substrato sólido, umidificado com água de torneira na proporção 1:1 (m/v), por 120 horas a 30°C.

4.8 Otimização das condições de cultivo de *Trichoderma* sp. em FES utilizando o Planejamento Experimental

Os efeitos das variáveis independentes tempo de cultivo, concentração de inóculo e proporção entre o substrato sólido e solução umectante na produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp. em FES foram avaliados utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) com adição de três ensaios no ponto central. De maneira geral, analisando os resultados obtidos, é possível observar que a atividade enzimática da β -galactosidase variou de 0,18 a 2,6 U/g de substrato (Tabela 13). Essa ampla variação reflete a importância da escolha das melhores condições de cultivo para a produção enzimática. As maiores produções enzimáticas foram obtidas nas análises 15, 16 e 17 com 8 dias de cultivo. Quando ocorre um aumento no tempo de cultivo há uma diminuição no valor de atividade enzimática e isto pode ser observado nas análises 9 e 10, em que o aumento no tempo de cultivo houve uma

diminuição de 36% no valor de atividade. O aumento na quantidade de solução umectante favorece ao aumento da atividade enzimática, como mostra nas análises 13 e 14, onde o aumento na proporção entre o substrato sólido e solução umectante ocorreu o aumento de 59% no valor de atividade. A atividade enzimática máxima foi obtida quando *Trichoderma* sp. foi cultivado por 8 dias, com concentração de inóculo de 10^5 esporos/mL e proporção 1:1,5 (m/v) de substrato sólido:solução umectante.

Tabela 13 - Matriz do delineamento composto central rotacional para tempo de cultivo, concentração de inóculo e proporção de substrato sólido e solução umectante. Onde $\alpha = 1,68$.

Nº da análise	Tempo (dias)	Inóculo (10^x) (esporos/mL)	Proporção 1: x (subst. sólido: sol. umectante)	Atividade enzimática (U/g de substrato)
1	5 (-1)	4 (-1)	1 (-1)	0,61
2	5 (-1)	4 (-1)	2 (+1)	1,20
3	5 (-1)	6 (+1)	1 (-1)	0,65
4	5 (-1)	6 (+1)	2 (+1)	1,00
5	11 (+1)	4 (-1)	1 (-1)	0,18
6	11 (+1)	4 (-1)	2 (+1)	0,86
7	11 (+1)	6 (+1)	1 (-1)	0,20
8	11 (+1)	6 (+1)	2 (+1)	0,90
9	2,95 (- α)	5 (0)	1,5 (0)	0,50
10	13,0 (+ α)	5 (0)	1,5 (0)	0,32
11	8 (0)	3,31 (- α)	1,5 (0)	1,02
12	8 (0)	6,68 (+ α)	1,5 (0)	1,42
13	8 (0)	5 (0)	0,66 (- α)	0,72
14	8 (0)	5 (0)	2,34 (+ α)	1,78
15	8 (0)	5 (0)	1,5 (0)	2,50
16	8 (0)	5 (0)	1,5 (0)	2,52
17	8 (0)	5 (0)	1,5 (0)	2,60

De acordo com a análise de variância (ANOVA) (Tabela 14), o efeito quadrático do tempo de cultivo, da concentração do inóculo e da proporção, assim como o efeito linear do tempo de cultivo e da proporção foram significativos a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). As interações entre as variáveis não foram estatisticamente significativas. O valor de R^2 (coeficiente de determinação) obtido foi de 0,98 em concordância com R^2 ajustado de 0,955. Desta forma, obteve-se um nível de confiabilidade de 95,5%,

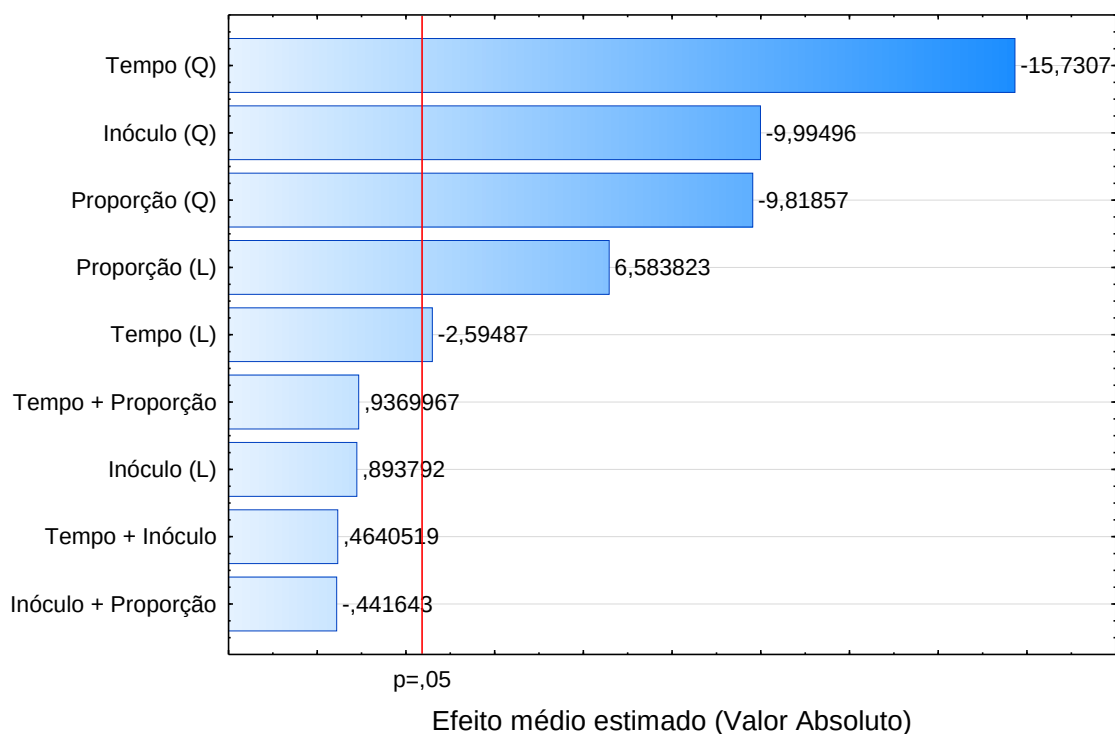
confirmando a alta correlação do planejamento e a equação obtida para o modelo (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Diversos trabalhos utilizaram o planejamento experimental para definir alguns parâmetros fermentativos, como tempo de cultivo e quantidade de substrato sólido, durante produção de β -galactosidase por *Aspergillus foetidus*, com $R^2=0,919$ (MARTARELLO, 2016), *Kluyveromyces marxianus* CCT, com $R^2=0,845$ (MANERA et al., 2011) e *Lactobacillus reuteri* B-14171, com $R^2=0,961$ (GOMES et al., 2018).

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade de β -galactosidase produzida por *Trichoderma* sp. em FES segundo o DCCR.

Variáveis	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F valor	p valor
(1) Tempo de cultivo (L)	0,19133	1	0,19133	6,7334	0,03569
Tempo de cultivo (Q)	7,03155	1	7,03154	247,45	0,00000
(2) Concentração de inóculo (L)	0,02270	1	0,02270	0,7989	0,40112
Concentração de inóculo (Q)	2,83868	1	2,83867	99,899	0,00002
(3) Proporção (L)	1,23172	1	1,23171	43,346	0,00031
Proporção (Q)	2,73937	1	2,73937	96,404	0,00002
1L + 2L	0,00612	1	0,00612	0,2153	0,65670
1L + 3L	0,02495	1	0,02495	0,8780	0,37995
2L + 3L	0,00554	1	0,00554	0,1950	0,67207
Erro	0,19891	7	0,02841		
Soma total dos quadrados	10,11610	16			

De acordo com o gráfico de pareto (Figura 21) os efeitos linear e quadrático do tempo de cultivo e da proporção entre substrato e solução umectante, bem como o efeito quadrático da concentração de inóculo foram significantes ($p \leq 0,05$).

Figura 21 - Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes sobre a atividade enzimática da β -galactosidase produzida por *Trichoderma* sp. em FES.



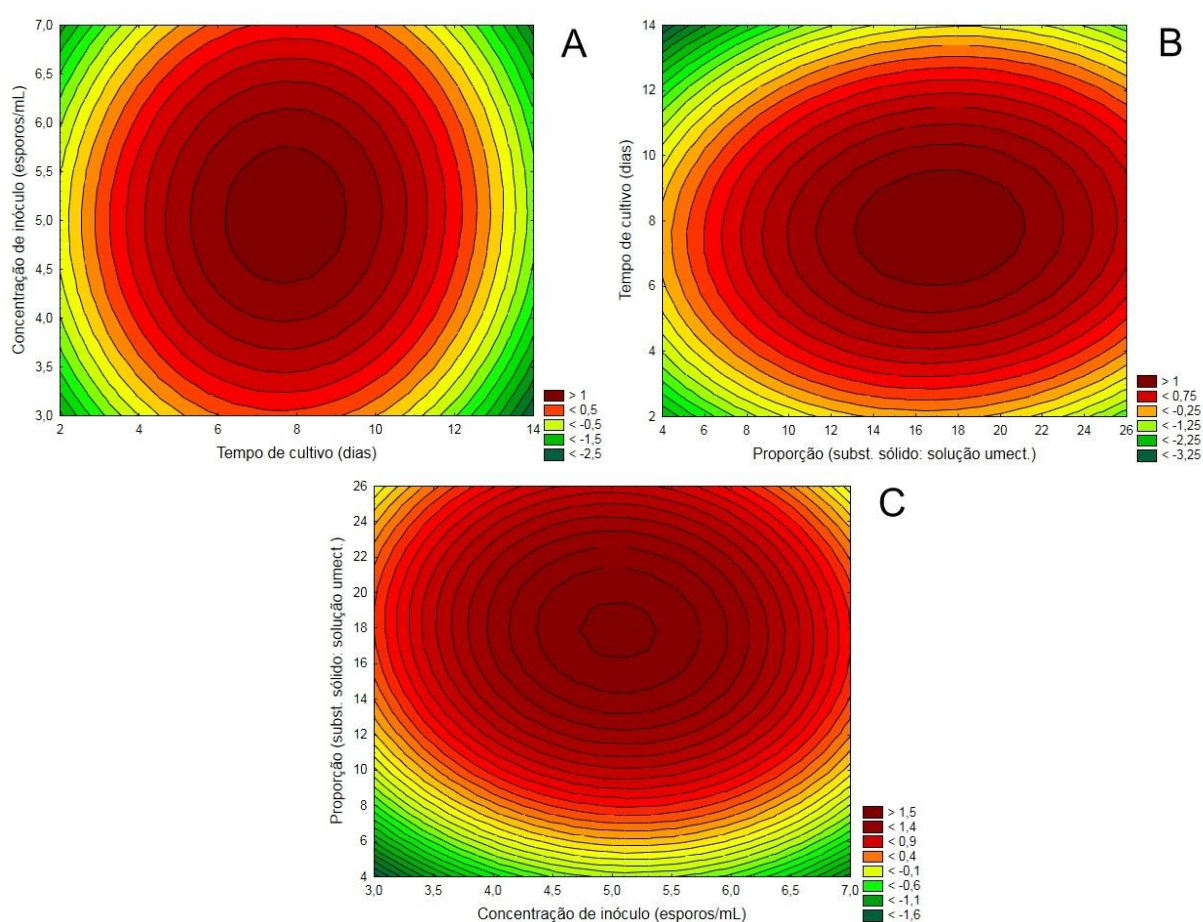
Com base no modelo matemático de 2ª ordem do DCCR, foi obtida a equação geral para a produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp. em FES (Equação 2):

$$\text{Atividade enzimática (y)} = -20,41 + 1,262 \cdot \text{Tempo} + 5,064 \cdot \text{Inóculo} + 0,648 \cdot \text{Proporção} - 0,087 \cdot \text{Tempo}^2 - 0,501 \cdot \text{Inóculo}^2 - 0,020 \cdot \text{Proporção}^2 + 0,009 \cdot (\text{Tempo} \cdot \text{Inóculo}) + 0,004 \cdot (\text{Tempo} \cdot \text{Proporção}) + 0,0005 \cdot (\text{Inóculo} \cdot \text{Proporção})$$

A partir do modelo quadrático obtido foram geradas as superfícies de resposta, considerando-se duas variáveis correlacionadas e mantendo-se uma variável no valor central. A Figura 22A indica que as proporções entre 1:1,2 (m/v) e 1:2 (m/v) entre substrato sólido e solução umectante, e tempo de cultivo entre 6 dias e 9,2 dias proporcionam altos valores na produção enzimática de β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. em FES. Na Figura 22B, observa-se que as concentrações de inóculo entre 4,2 e 6,5 esporos/mL e tempo de cultivo entre 6,2 e 9,5 dias conduzem a valores de atividade enzimática superiores a 1,2 U/g de substrato. Pela Figura 22C observa-se que

as maiores atividades de β -galactosidase são obtidas ao empregar concentrações de inóculo entre 4,2 e 6,5 esporos/mL e proporção entre 1:1,2 (m/v) e 1:2 (m/v) de substrato sólido e a solução umectante.

Figura 22 - Gráficos de contorno para o efeito do tempo de cultivo e da proporção entre substrato sólido e solução umectante **(A)**, efeito da concentração do inóculo e do tempo de cultivo **(B)** e o efeito da proporção entre substrato sólido e solução umectante e da concentração do inóculo **(C)** sobre a produção enzimática de β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. em FES mantendo a proporção entre substrato sólido e solução umectante no ponto central (1:1,5).



Posteriormente, foi calculado, com auxílio do *software*, os valores de tempo de cultivo, concentração de inóculo e proporção entre substrato sólido e solução umectante (Tabela 15) para máxima produção de β -galactosidase por *Trichoderma* sp.

Tabela 15 - Valores mínimos e máximos testados, e valores críticos de tempo de cultivo, concentração do inóculo e proporção entre substrato sólido e solução umectante para máxima produção de β -galactosidase extracelular secretada por *Trichoderma* sp. em FES.

	Valores Mínimos	Valores Críticos	Valores Máximos
Tempo (dias)	2,95	7,80	13,0
Inóculo 10^x (esporos/mL)	3,32	5,00	6,70
Proporção Substrato sólido:sol. umectante (1:x)	0,66	1,65	2,34

Realizando o cultivo nas condições citadas nos valores críticos (7,8 dias; 10^5 esporos/mL e proporção 1:1,65 m/v), a β -galactosidase secretada por *Trichoderma* sp. atingiu 2,67 U/g de subst. (valor experimental) de atividade enzimática, valor semelhante ao valor predito pelo *software* (2,60 U/g de subst.). A atividade enzimática aumentou cerca de 2,32 vezes se comparada aos valores de atividade obtidos antes da otimização das condições de cultivo. Desta forma, foi selecionado 187 horas de tempo de cultivo, concentração de inóculo de 10^5 esporos/mL e proporção 1:1,65 (m/v) entre farelo de trigo e água de torneira para continuidade dos estudos.

4.9 Caracterização bioquímica da β -galactosidase extracelular produzida por *Trichoderma* sp. em FES

4.9.1 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática

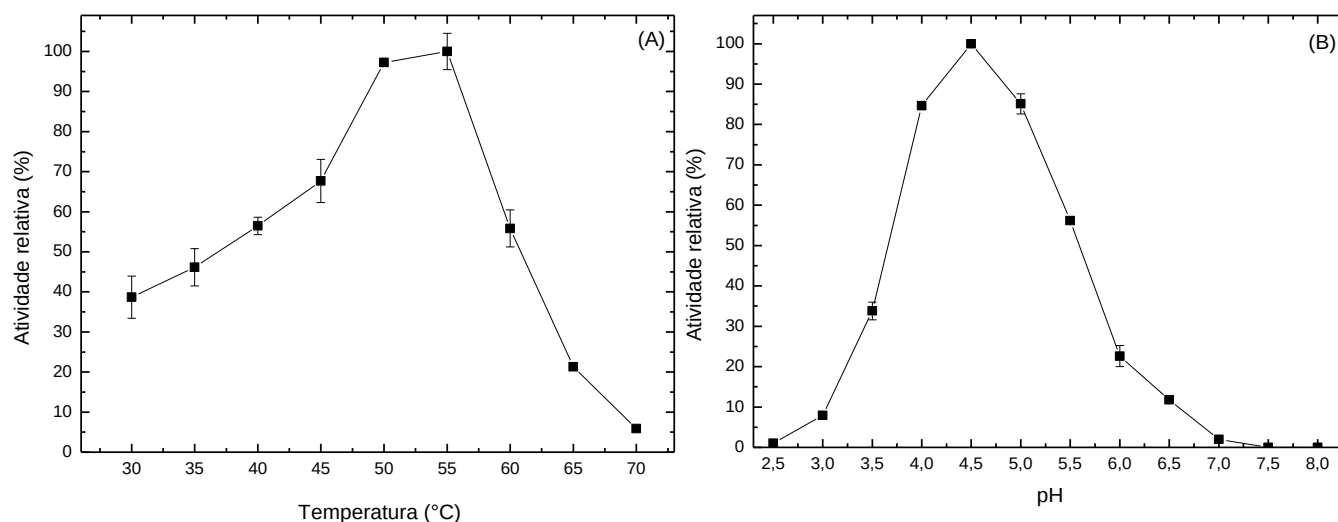
As Figuras 23A e 23B mostram, respectivamente, os melhores valores de temperatura e pH de atividade enzimática para β -galactosidase contida no extrato bruto dialisado produzido em FES pelo fungo *Trichoderma* sp.

Para a influência da temperatura (Figura 23A), observa-se um aumento da atividade a partir de 30 °C, atingindo maiores valores entre 50 °C e 55°C. Acima de 55°C a atividade β -galactosidásica é reduzida drasticamente. Com o aumento da temperatura há um aumento na velocidade de reação, o que pode ser explicado pela maior agitação das moléculas, aumentando as possibilidades de contato entre enzima e substrato. Contudo, se determinada

temperatura for ultrapassada, a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem e ela se desnatura (NELSON; COX, 2014). Possivelmente isto ocorre quando a β -galactosidase é submetida a temperaturas acima de 55 °C. De acordo com Silvério e pesquisadores (2018) as β -galactosidases obtida de fungos filamentosos possuem maior atividade entre 50°C e 60°C. Cardoso e colaboradores (2017) relataram a temperatura de atividade de 55°C para β -galactosidase de *Aspergillus lacticoffeatus*. Martarello e pesquisadores (2019) cultivaram *Aspergillus niger* via FES para produção de β -galactosidase utilizando soja como substrato sólido. Nesta condição, verificaram que a melhor temperatura para a atividade dessa enzima foi de 55 °C. Já as β -galactosidases de *Guehomyces pullalans* 17-1 (SONG et al., 2016), *Aspergillus oryzae* (CAREVIC et al., 2016), *Aspergillus nidulans* (KAMRAN et al., 2018) e *Aspergillus tubingensis* GR1 (RAOL et al., 2015), apresentaram maiores atividades em 50 °C, 55 °C, 60 °C e 65 °C, respectivamente.

Considerando a determinação do melhor valor de pH para a atividade da β -galactosidase contida no extrato bruto dialisado, foi observado um aumento progressivo a partir do pH 3,0 até atingir a maior atividade em pH 4,5, seguida por uma queda a partir do pH 5,0. (Figura 23B). O pH de atividade da β -galactosidase de *Trichoderma* sp. produzida em FES foi similar ao de outras da β -galactosidases descritas na literatura, variando de 4,0 a 5,0 (SILVÉRIO et al. 2018). O pH de atividade da β -galactosidase de *P. chrysogenum* foi 4,0 (NAGY et al., 2001). Para a enzima de *A. niger*, o melhor pH de atividade também foi 4,0 (TONELOTTO et al., 2013). Cardoso e colaboradores (2017), ao estudar a produção dessa enzima por *A. lacticoffeatus*, observaram comportamento similar ao encontrado neste trabalho, com melhor atividade em pH 4,5. De acordo com Kamran e colaboradores (2018), a β -galactosidase *A. nidulans* apresenta pH ótimo de atividade igual a 5,0.

Figura 23 - Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da β -galactosidase extracelular (■) do fungo *Trichoderma* sp. em FES. 100% = 9,40 $\pm$ 0,2 U/g de substrato.



Fonte: Autor.

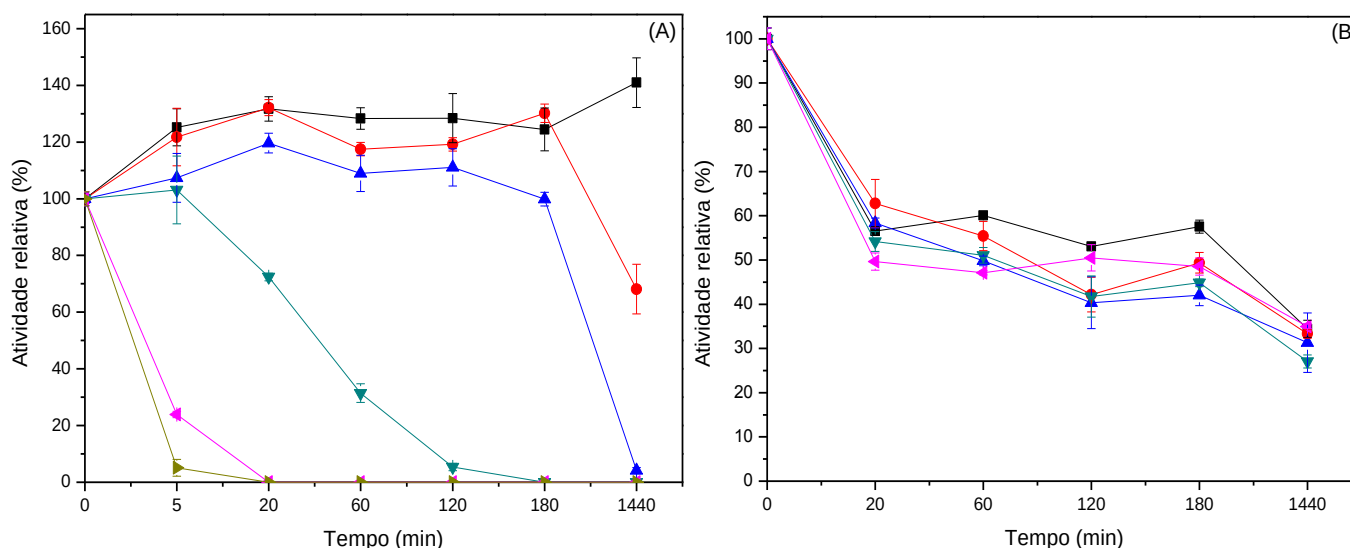
4.9.2 Determinação da estabilidade térmica e estabilidade ao pH da β -galactosidase extracelular

A estabilidade térmica e ao pH foram verificadas para a enzima contida no extrato bruto dialisado produzido por *Trichoderma* sp. em FES. Quando a β -galactosidase foi incubada a 35 °C ocorreu um aumento de 31,7% na sua atividade nos primeiros 20 min de incubação mantendo-se com poucas variações, até 1440 min (Figura 24A). Nas temperaturas de 40 °C e 45 °C a atividade enzimática foi aumentada na ordem de 32,1% e 19,6%, respectivamente, com 20 min de incubação. A partir de 180 min ocorreu diminuição da atividade β -galactosidásica. As menores termoestabilidades foram observadas a 55 °C e 60 °C. A estabilidade térmica das β -galactosidas produzidas por fungos filamentosos pode variar bastante. Kamran e colaboradores (2018) relataram que a enzima de *A. nidulans* foi estável após 120 min de incubação a 40 °C. Já a β -galactosidase de *A. niger* mostrou uma ótima estabilidade a 50 °C após 1440 min de incubação (MARTARELLO et al., 2019).

Ao se analisar a estabilidade ao pH por até 1440 min de incubação, é possível observar na figura 24B que, após 20 min de incubação, a enzima perdeu em torno de 40% de sua atividade para todos os valores de pH

testados. Após este tempo de incubação, a β -galactosidase mantida nos valores de pH 3,0 e 9,0 mostrou poucas variações em sua atividade por até 180 min, sendo que a partir deste instante ocorreu diminuição nos valores de atividade. Após 1440 min de incubação a β -galactosidase reteve 34,4%, 33,2%, 31,3%, 27,0% e 34,9% de atividade nos pH 3, 4, 5, 7 e 9, respectivamente. A maioria dos trabalhos encontrados em relatam a estabilidade da enzima β -galactosidase em pH ácido (RAOL et al., 2015; CARDOSO et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2018). Entretanto a estabilidade ao pH encontrada neste trabalho para β -galactosidase de *Trichoderma* sp. produzida em FES foi diferente das mencionadas na literatura, pois a enzima foi estável em pH ácido, neutro e básico, preservando em torno de 30% de sua atividade após 1440 min de incubação.

Figura 24 - Determinação da estabilidade térmica (A) da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. produzida em FES a 35 °C (■), 40 °C (●), 45 °C (▲), 50 °C (▼), 55 °C (◆) e 60 °C (◀), e estabilidade aos pH 3,0 (■), 4,0 (●), 5,0 (▲), 7,0 (▼) e 9,0 (◆), por diferentes períodos de tempo (5 a 1440 minutos). 100% = $6,54 \pm 0,4$ U/g de substrato.



Fonte: Autor.

4.9.3 Influência de diferentes sais e outros compostos na atividade β -galactosidásica extracelular

Analisando a Tabela 16, observa-se que a atividade β -galactosidásica não foi significativamente alterada pela maioria dos sais usados, mantendo a

atividade enzimática acima de 70%. Houve aumento da atividade β -galactosidásica na presença dos compostos KI, NaBr, NaH_2PO_4 , NaNO_3 e NH_4F , destacando-se KI que foi capaz de ativar a β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp., aumentando em 22,2% sua atividade. Apesar de diversos trabalhos mostrarem o efeito inibitório dos íons Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} sobre a atividade β -galactosidásica (DONG et al., 2013; CARDOSO et al., 2017; YAO et al., 2019; LIU et al., 2019), a enzima de *Trichoderma* sp. não foi afetada. Contudo, o uso dos sais AgNO_3 e MgSO_4 reduziram a atividade da β -galactosidase em 51,4% e 36,0%, respectivamente. Na presença do íon Ag^{2+} as β -galactosidases microbianas de *A. tubingensis* GR1 (RAOL et al., 2015) e *Guehomyces pullulans* 17-1 (SONG et al., 2016) tiveram suas atividades inibidas em mais de 95%, provavelmente por se tratar de um metal pesado. Metais pesados possuem a capacidade de inibir irreversivelmente uma enzima, devido a sua potencial de reagir com grupos sulfidril para formar mercaptonas, as quais agem como redutores das ligações dissulfeto (NELSON; COX, 2014).

Tabela 16 - Efeito de diferentes sais na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo *Trichoderma* sp. cultivado em FES. 100% = $6,54 \pm 0,4$ U/g de substrato.

Sais (1 mmol/L)	Atividade relativa (%)
Controle	100
AgNO ₃	$48,6 \pm 2,2$
BaCl ₂	$84,0 \pm 4,3$
CaCl ₂	$90,1 \pm 6,5$
CoCl ₂	$79,4 \pm 4,3$
CuSO ₄	$70,3 \pm 3,9$
FeCl ₃	$78,3 \pm 3,7$
KH ₂ PO ₄	$83,5 \pm 5,9$
KI	$122,2 \pm 2,5$
MgCl ₂	$70,0 \pm 2,2$
MgSO ₄	$64,0 \pm 2,1$
MnCl ₂	$98,7 \pm 2,8$
MnSO ₄	$94,7 \pm 7,7$
NaBr	$119,1 \pm 6,3$
NaH ₂ PO ₄	$116,1 \pm 4,0$
NaNO ₃	$107,7 \pm 5,3$
NH ₄ F	$112,0 \pm 5,0$
ZnSO ₄	$70,0 \pm 5,1$

Fonte: Autor.

Na Tabela 17 observa-se que a enzima foi capaz de suportar concentrações de 1% de diversos solventes, mantendo sua atividade acima de 80%. Segundo Chhokar e pesquisadores (2010) os solventes orgânicos podem favorecer a maior solubilidade de substratos não polares e aumentar a estabilidade térmica enzimática. Resultados semelhantes foram observados para β -galactosidase de *A. nidulans* (KAMRAN et al., 2018) e *Halorubrum lacusprofundi* (KARAN et al., 2013). Quanto aos surfactantes Triton X-100 e Tween 20, a β -galactosidase manteve sua atividade em 96,4% e 83,3%, respectivamente. A menor atividade foi observada na presença de β -mercaptoetanol. Possivelmente interações que são essenciais para a atividade β -galactosidásica foram perturbadas na presença desse composto químico, uma vez que, o β -mercaptoetanol atua nas interações dissulfeto da enzima, o

que pode causar a diminuição da atividade catalítica. Resultado similar foi encontrado por Raol e colaboradores (2015), que relataram a perda de atividade catalítica da β -galactosidase de *A. tubingensis* GR1 na presença de β -mercaptoetanol.

Tabela 17 - Efeito de compostos químicos na atividade β -galactosidásica extracelular do fungo *Trichoderma* sp. cultivado via FES. 100% = $6,54 \pm 0,4$ U/g de substrato.

Compostos	Atividade relativa (%)
Controle	100
Acetona (1%)	$102,3 \pm 0,3$
Acetonitrila (1%)	$88,4 \pm 6,1$
Butanol (1%)	$81,2 \pm 3,4$
EDTA (1mM)	$82,3 \pm 5,0$
Etanol (1%)	$94,1 \pm 2,4$
Isopropanol (1%)	$83,3 \pm 0,6$
Metanol (1%)	$94,6 \pm 2,1$
SDS (1mM)	$81,4 \pm 3,4$
Triton X-100 (0,01%)	$96,4 \pm 1,2$
Tween - 20 (0,01%)	$83,3 \pm 0,3$
Ureia (1mM)	$92,1 \pm 4,0$
β -mercaptoetanol (1mM)	$70,5 \pm 5,9$

Fonte: Autor.

4.10 Aplicação da β -galactosidase

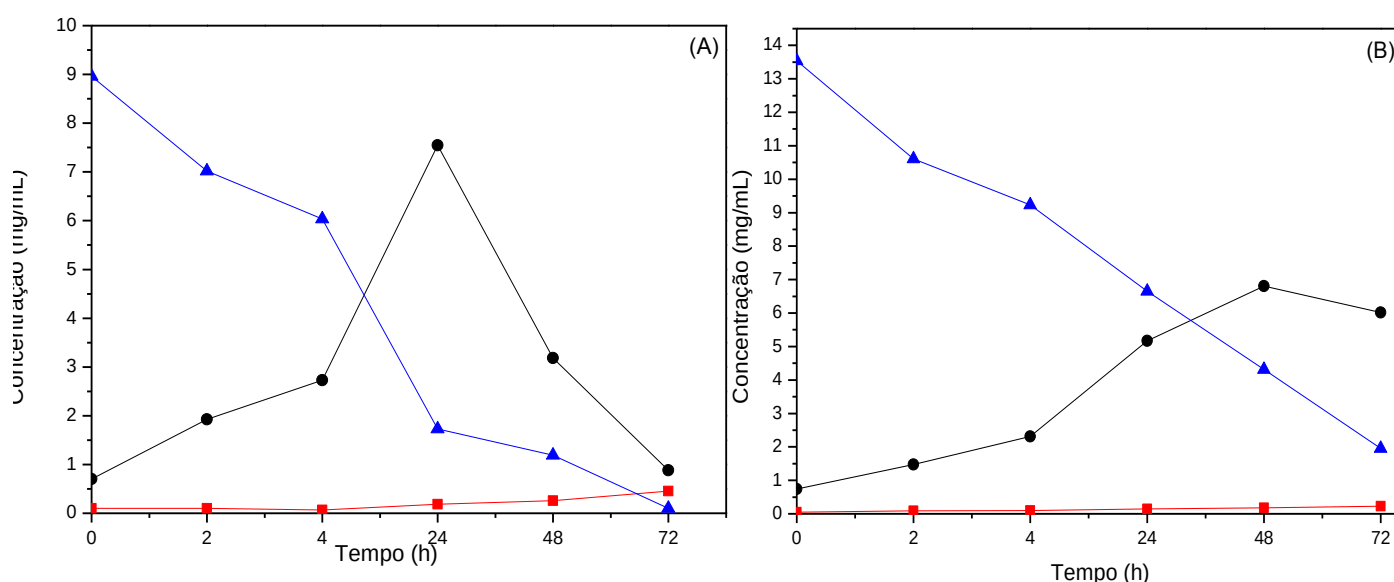
4.10.1 Hidrólise do efluente de indústria láctea

O potencial hidrolítico da β -galactosidase contida no extrato bruto produzido por *Trichoderma* sp. em FES, foi avaliado frente ao efluente da indústria láctea por um período de 72 horas de reação (Figura 25).

Na Figura 25A nota-se que a β -galactosidase foi capaz de hidrolisar a lactose presente no soro de queijo. Com 4 horas de tratamento, cerca de 32,6% da lactose foi convertida nos monossacarídeos glicose e galactose. Após 72 horas de tratamento, 99% da lactose foi reduzida, permanecendo cerca de 0,099 mg/mL do dissacarídeo. Contudo, observa-se também a

redução nas concentrações de galactose e glicose, produto de reação da hidrólise da lactose. Tal fato pode ser explicado, possivelmente, pela presença de outras enzimas, além da β -galactosidase, capazes de utilizar estes monossacarídeos como substratos das reações que catalizam. Diversos trabalhos descrevem a capacidade de hidrólise da enzima β -galactosidase de origem microbiana. Saad (2004) demonstrou que a β -galactosidase de *A. japonicus* converteu 55% da lactose de soro de queijo nos açúcares glicose e galactose. Nakkharat e Hsrich (2006) verificaram o potencial da β -galactosidase intracelular de *Talaromyces thermophilus* CBS236.58 em hidrolisar a lactose. Eles observaram que, após 4 horas de tratamento, 90% da lactose foi convertida em galactose e glicose. Song e colaboradores (2010) observaram uma redução de 43,5% na concentração da lactose após o tratamento de leite com a β -galactosidase de *Guehomyces pullulans* 17-1. Mais recentemente, Martarello e pesquisadores (2019) demonstraram a capacidade hidrolítica da β -galactosidase de *A. foetidus* utilizando leite como substrato, removendo cerca de 50% da lactose.

Figura 25 - Tratamento do soro de queijo usando extrato bruto contendo β -galactosidase de *Trichoderma* sp. nas proporções 1:1 (A) e 1:0,5 (B) durante 72 horas. Símbolos: lactose ($\blacktriangle$), glicose ($\blacksquare$) e galactose ($\bullet$).

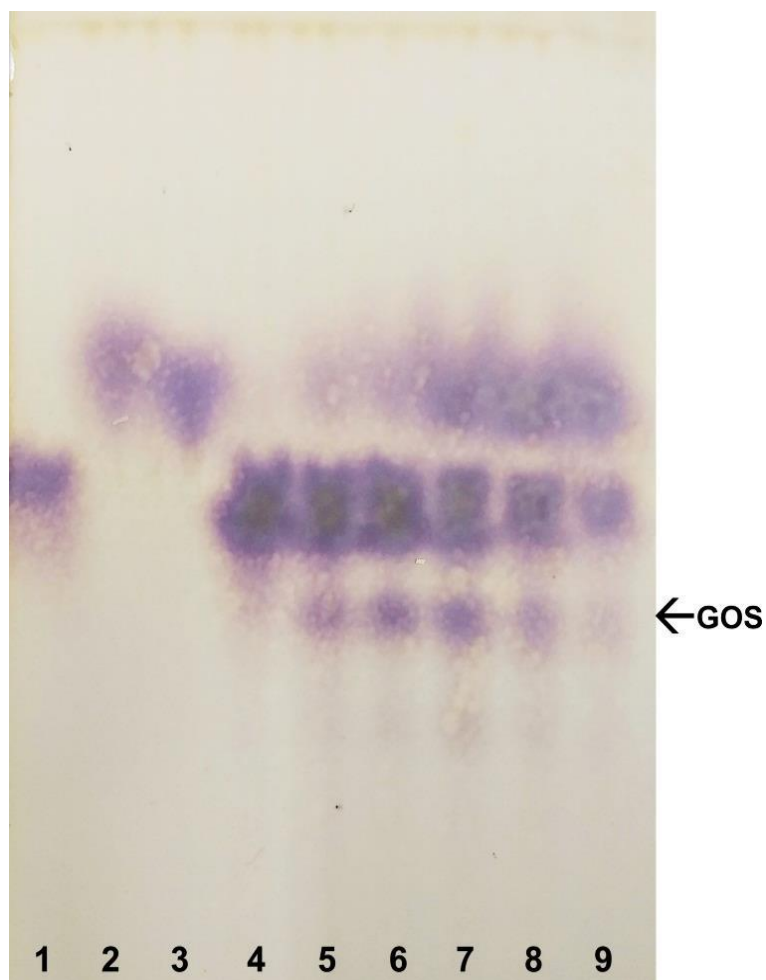


Fonte: Autor.

É possível observar na Figura 25B que o uso do filtrado bruto contendo β -galactosidase, quando aplicado no efluente na proporção 1:0,5

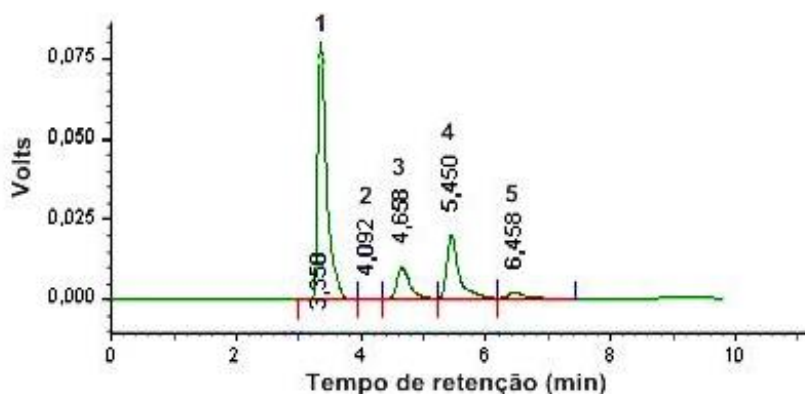
(efluente:enzima, v/v), possibilitou a redução da concentração de lactose contida no soro de queijo durante todo o tempo de tratamento reduzindo, ao final do tratamento, 85,6% da lactose. Além da atividade hidrolítica a enzima β -galactosidase também catalizou a reação de transgalactosilação, como mostrado na Figura 26, levando à formação de galactooligossacarídeos (GOS), principalmente em tempos menores de reação. Isto pode ser explicado pela alta concentração de lactose inicialmente no soro de queijo. Por outro lado, com acúmulo de GOS com passar do tempo, a enzima passa a hidrolisa-los e, desta maneira, observa-se um aumento na concentração de galactose e glicose. Considerando que a mancha mais intensa correspondendo aos GOS foi obtida em 24 horas, a análise dos produtos de reação neste período foi realizada em HPLC. O perfil cromatográfico obtido (Figura 27) confirma a presença de GOS (pico 5). Resultados similares foram descritos por Liu e pesquisadores (2017) ao estudar a atividade hidrolítica da β -galactosidase de *Paenibacillus barengoltzii* em leite e soro de leite.

Figura 26 - Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise do soro de queijo pela β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp., na proporção 1:0,5, em diferentes tempos de incubação, a 37 °C, sendo: (1) Lactose 1% (m/v); (2) Glicose 1% (m/v); (3) Galactose 1% (m/v); (4) 0; (5) 2; (6) 4; (7) 24; (8) 48; (9) 72 horas.



Fonte: Autor.

Figura 27 - Perfil cromatográfico em High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dos produtos de hidrólise do soro de queijo pela β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp., na proporção 1:0,5, após 24 horas de tratamento, sendo: (1) Água ultrapura; (2) Glicose; (3) Galactose; (4) Lactose; (5) GOS.

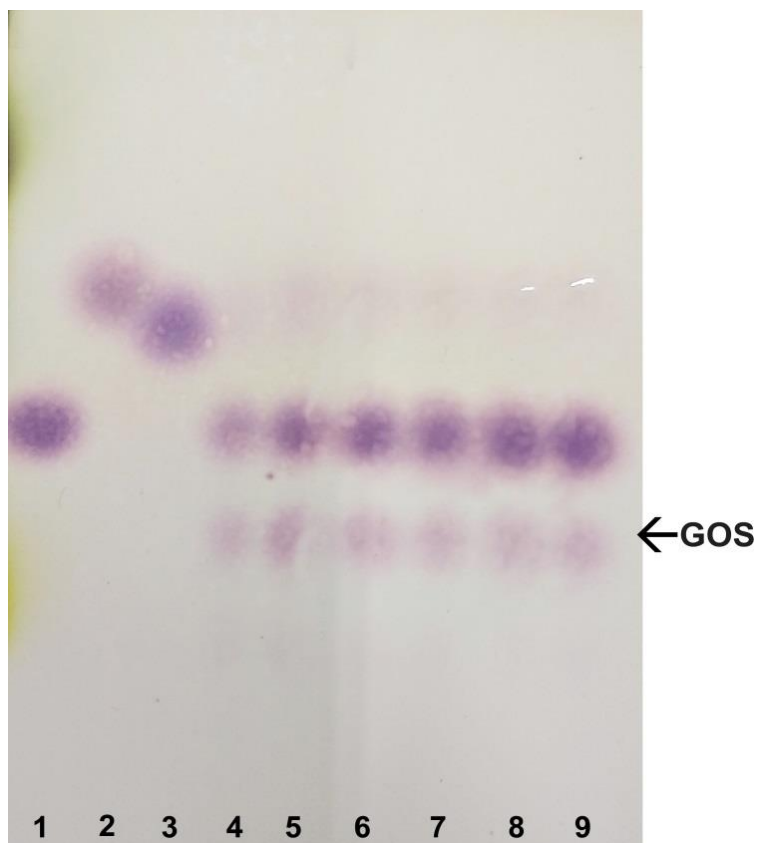


Fonte: Autor.

4.10.2 Produção de galactooligossacarídeo (GOS)

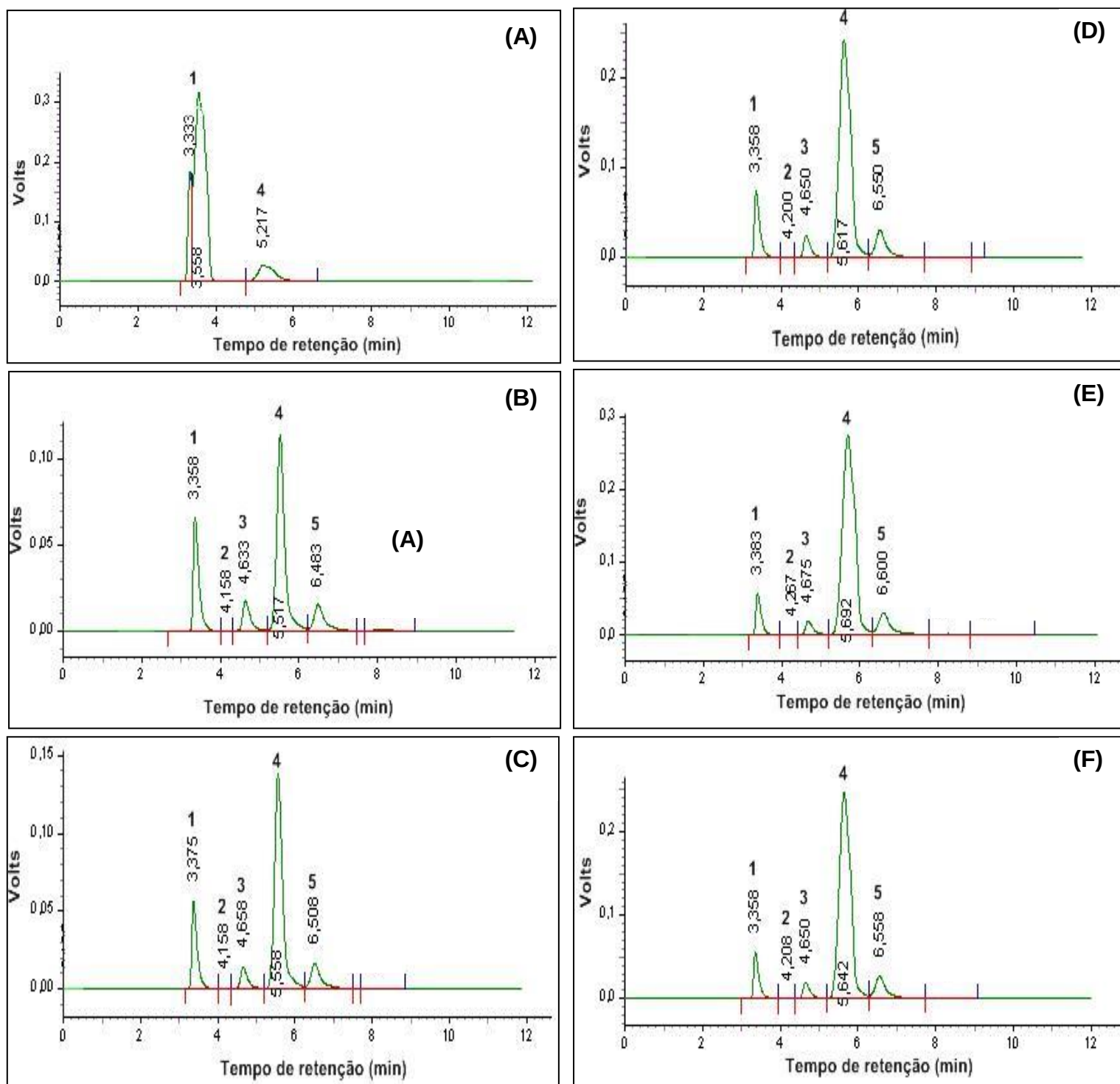
Uma vez evidenciada a capacidade da β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. realizar a reação de transgalactosilação, a produção de GOS utilizando diferentes concentrações de lactose foi avaliada. A Figura 28 apresenta o perfil cromatográfico em TLC. Nota-se que em todas as concentrações de lactose usadas há presença de manchas correspondentes aos GOS. Diversos autores utilizam a TLC como um método qualitativo para verificar a produção de GOS pela enzima β -galactosidase (SONG et al., 2010; PAWLAK-SZUKALSKA et al., 2014; CHIBA et al., 2015; YAMADA et al., 2016; LIU et al., 2017). Na Figura 29 são apresentados os perfis em HPLC para produção de GOS em diferentes concentrações de lactose. Nota-se que a partir da concentração de 20% de lactose (m/v) é possível observar um pico (pico 5) correspondente aos GOS (Figura 29B), confirmando o perfil obtido em TLC. Nas concentrações 30%, 40%, 50% e 70% de lactose (m/v) também foi verificada a presença do pico 5. Apesar de verificar a formação dos GOS, não foi possível quantificá-los devido a falta de padrão. Entretanto, alguns trabalhos encontraram perfis cromatográficos muito similares aos encontrados neste trabalho (NAKKHARAT e HALTRICH, 2006; SANTOS; SIMIQUELI; PASTORE, 2009; LIU et al., 2019).

Figura 28 - Perfil cromatográfico em camada delgada (TLC) dos produtos de transgalactosilação da lactose pela β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. em FES sob diferentes concentrações de lactose por um período de 24 horas a 37 °C, sendo: (1) Lactose 1% (m/v); (2) Glicose 1% (m/v); (3) Galactose 1% (m/v); (4) Lactose 10% (m/v); (5) Lactose 20% (m/v); (6) Lactose 30% (m/v); (7) Lactose 40% (m/v); (8) Lactose 50% (m/v); (9) Lactose 70% (m/v).



Fonte: Autor.

Figura 29 - Perfil cromatográfico em High Performace Liquid Chromatography (HPLC) da produção de GOS catalisada pela β -galactosidase extracelular de *Trichoderma* sp. cultivado em FES, sob diferentes concentrações (m/v) de lactose: (A) 10%; (B) 20%; (C) 30%; (D) 40%; (E) 50%; (F) 70%. (1) Água ultrapura; (2) Glicose; (3) Galactose; (4) Lactose; (5) GOS.



Fonte: Autor.

4.11 Comparação das β -galactosidases

As β -galactosidases produzidas nas diferentes fermentações mostraram evidências de se tratar de duas enzimas diferentes, os diferentes parâmetros encontrados estão listados na Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros gerais das β -galactosidases produzidas por *Trichoderma* sp. cultivado em FSbm e FES.

Parâmetros	Fermentação	
	Submersa	Sólida
Tempo de cultivo (horas)	312	187
Temperatura de reação (°C)	55	50-55
pH de reação	4,2	4,5
Termoestabilidade (°C)	35-45	35-45
Ativadores	Ag ⁺ ; Mn ²⁺	K ⁺ ; Na ⁺
Inibidores	Fe ³⁺ ; K ⁺ ; Mg ⁺ ; SDS; β -mercaptoetanol	Ag ⁺
Teor de lactose hidrolisada	50%	99%
Produção de GOS	Não	Sim

Fonte: Autor.

5. CONCLUSÕES

Entre diferentes linhagens de fungos filamentosos usadas, o fungo do gênero *Trichoderma* foi o melhor produtor de β -galactosidase. Sob as melhores condições de cultivo em Fermentação Submersa (FSbm) e em Estado Sólido (FES) o fungo *Trichoderma* sp. produziu β -galactosidases com características interessantes para aplicações industriais, como estabilidade a 40 °C e ao pH , e resistência a diversos compostos químicos. Além disto, a β -galactosidase produzida por *Trichoderma* sp. foi capaz de hidrolisar a lactose contida no soro de queijo. A β -galactosidase produzida em FES permitiu a redução no teor de lactose contida no soro de queijo, podendo ser potencialmente aplicada no tratamento de efluente de indústria láctea. Catalisou também reações de transgalactosilação levando a produção de GOS em diferentes concentrações de lactose.

Considerando os resultados obtidos, o fungo *Trichoderma* sp. pode ser considerado uma fonte potencial alternativa para a produção de β -galactosidases para diferentes finalidades, merecendo estudos aprofundados sob um olhar molecular. Por fim, aparentemente, tratam-se de duas isoformas de β -galactosidases, uma produzida em FSbm e outra em FES considerando algumas peculiaridades distintas entre elas, como o próprio potencial de síntese de GOS.

REFERÊNCIAS

- ADALBERTO, P. R. **Produção, Isolamento e Caracterização de β - galactosidases de *Trichoderma reesei*: Interação de Íons Metálicos na Atividade Enzimática.** 2005. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- ADALBERTO, P. R.; MASSABNI, A. C.; GOULART, A. J.; CONTIERO, J.; CARMONA, E. C.; CARDELLO, L.; MONTI, R. Production of β -galactosidase by *Trichoderma reesei* FTKO-39 in wheat bran: partial purification of two isozymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, n. 2, p. 163–170, 2006.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.
- ALVES, T. B. **Prospecção de proteínas bioativas secretadas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*.** 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.
- ANDRADES, D. De; ARFELLI, V. C.; ORIENTE, A.; HENN, C.; PEREIRA, V. A. A. da C.; KADOWAKI, M. K. Improved production of β -galactosidase and β -fructofuranosidase by fungi using alternative carbon sources. **Scientific Research and Essays**, v. 10, n. 6, p. 236–242, 2015.
- ANTONIETA, R. V.; FERMÍN, C. B.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Food Science Technology**, v. 28, p. 109-15, 2008.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 10, p. 1205-1215, 1974.

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, p. 248–54, 1976.

BRASIL. Intolerância à lactose. Brasília. Ministério da Saúde: Secretaria de saúde. 2017. Disponível em: portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/rotulagem-de-lactose-em-alimentos-tem-regra-publicada/219201 (Acessado 19 de Junho de 2019).

CALVALCANTI, R. M. F.; ORNELA, P. H. de O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Screening, selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from caatinga. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 001–009, 2017.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica. Porto Alegre**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 751p., 2000.

CAPPELLO, G.; MARZIO, L. Rifaximin in patients with lactose intolerance. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 5, p. 316–319, 2005.

CARDOSO, B. B.; SILVÉRIO, S. C.; ABRUNHOSA, L.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus* : A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67–74, 2017.

CAREVIĆ, M.; ČOROVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; MILISAVLJEVIĆ, A.; VELIČKOVIĆ, D.; BEZBRADICA, D. Galactooligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 50–57, 2016.

CARMINATTI C. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2001.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225–226, 1939.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; ATTRI, P.; DHANDA, S. Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. **Bioorganic Chemistry**, v. 77, p. 176–189, 2018.

CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K.; NEHRA, K.S. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264, 2010.

CHIBA, S.; YAMADA, M.; ISOBE, K. Novel acidophilic β -galactosidase with high activity at extremely acidic pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 3, p. 263–267, 2015.

CORGNEAU, M.; SCHER, J.; RITIE-PERTUSA, L.; LE, D. T. L.; PETIT, J.; NIKOLOVA, Y.; BANON, S.; GAIANI, C. Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3344–3356, 2017.

CORZO-MARTINEZ, M.; LUSCHER, A.; DE LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R.; MORENO, F. J. Valorization of cheese and tofu whey through enzymatic synthesis of lactosucrose. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p.139-135, 2015.

DAHLQVIST, A.; GAHRTON, G.; NORDÉN, Å. The content of total and acid-soluble glycogen in the white blood cells and its relation to the staining with the periodic acid-schiff reagents. **Acta Medica Scandinavica**, v. 172, n. 1, p. 31–40, 1962.

DINIZ, R. H. S.; SILVEIRA, W. B.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 541–50, 2012.

DONG, Y. N.; WANG, L.; GU, Q.; CHEN, H. Optimizing lactose hydrolysis by

computer-guided modification of the catalytic site of a wild-type enzyme. **Molecular Diversity**, v. 17, p. 371–382, 2013.

DRAGOSITS, M.; PFLÜGL, S.; KURZ, S.; RAZZAZI-FAZELI, E.; WILSON, I. B. H.; RENDIC, D. Recombinant *Aspergillus* β -galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3553–3567, 2014.

EL-BAKRY, M.; BENINATI, F.; DUGGAN, E.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Reducing salt in imitation cheese: Effects on manufacture and functional properties. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 589–596, 2011.

ELIZABETH, A. G.; BUKOLA, A.-T.; TOYIN, O. O. Screening and production of β -galactosidase by *Trichoderma* species. **Nature and Science**, v. 10, n. 12, p. 265–270, 2012.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. In: **Methods in Enzymology**. v. 182p. 285–300.

ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; ARST, H., N. J. ;PEÑALVA, M. A. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. **EMBO Journal**, v. 12, n. 10, p. 3947-3956, 1993.

FDA, 2015. Partial list of microorganisms and microbial-derived ingredients used in foods. Disponível em: fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default. (Acessado 20 de Junho de 2019).

FEKETE, E.; KARAFFA, L.; SÁNDOR, E.; SEIBOTH, B.; BIRÓ, S.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C. P. Regulation of formation of the intracellular beta-galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 1, p. 7–14, 2002.

FEKETE, E.; KARAFFA, L.; SEIBOTH, B.; FEKETE, É.; KUBICEK, C.; FLIPPHI, M. Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 6, p. 415–425, 2012.

FEKETE, E.; OROSZ, A.; KULCSÁR, L.; KAVALECZ, N.; FLIPPHI, M.; KARAFFA, L. Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**, v. 162, n. 5, p. 837–847, 2016.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

GALVAGNO, M. FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: Nutrição e metabolismo. In: **Fungos: Uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. p. 125–164.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685–694, 2008.

GAO, X.; WU, J.; WU, D. Rational design of the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production. **Food Chemistry**, v. 286, p. 362–367, 2019.

GEIGER, B.; NGUYEN, H.-M.; WENIG, S.; NGUYEN, H. A.; LORENZ, C.; KITTL, R.; MATHIESEN, G.; EIJSINK, V. G. H.; HALTRICH, D.; NGUYEN, T. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 45–53, 2016.

GLOSTER, T. M.; ROBERTS, S.; DUCROS, V. M.-A.; PERUGINO, G.; ROSSI, M.; HOOS, R.; MORACCI, M.; VASELLA, A.; DAVIES, G. J. Structural studies of the β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors. **Biochemistry**, v. 43, n. 20, p. 6101–9, 2004.

GOMES, T. A. **β -galactosidase de origem microbiana: Produção, otimização, escalonamento e caracterização**. 2018. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

GOMES, T. A.; SANTOS, L. B.; NOGUEIRA, A.; SPIER, M. R. Increase in an Intracellular β -Galactosidase biosynthesis using *L. reuteri* NRRL B-14171,

inducers and alternative low-cost nitrogen sources under submerged cultivation. **International Journal of Food Engineering**, v. 14, n. 3, p. 1–12, 2018.

GONZÁLEZ-DELGADO, I.; LÓPEZ-MUÑOZ, M.-J.; MORALES, G.; SEGURA, Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 211–219, 2016.

GUERRA, G.; CASADO, M. R. G.; ARGUELLES, J.; SÁNCHEZ, I. M. A.; MANZANO, A. M.; GUZMAN, T. Cellulase Production with sugarcane straw by *Trichoderma citrinoviride* on solid bed. **Sugar Technology**, v. 8, p. 30–35, 2006.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375–384, 2010.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23–6, 1997.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104–109, 2012.

HIDAKA, M.; FUSHINOBU, S.; OHTSU, N.; MOTOSHIMA, H.; MATSUZAWA, H.; SHOUN, H.; WAKAGI, T. Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 1, p. 79–91, 2002.

HILL, E.; BROADBENT, I. D.; CHOTHIA, C.; PETTITT, J. Cadherin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 5, p. 1011–24, 2001.

HUBER, R. E.; ROTH, N. J.; BAHL, H. Quaternary structure, Mg^{2+} interactions, and some kinetic properties of the β -galactosidase from

Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1. **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 621–9, 1996.

HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 41–62, 2010.

ISOBE, K.; TAKAHASHI, N.; CHIBA, S.; YAMASHITA, M.; KOYAMA, T. Acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1, produces multiple forms of intracellular β -galactosidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 171–174, 2013.

JUAJUN, O.; NGUYEN, T.; MAISCHBERGER, T.; IQBAL, S.; HALTRICH, D.; YAMABHAI, M. Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 645–654, 2011.

JUERS, D. H.; HEIGHTMAN, T. D.; VASELLA, A.; MCCARTER, J. D.; MACKENZIE, L.; WITHERS, S. G.; MATTHEWS, B. W. A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*) β -galactosidase. **Biochemistry**, v. 40, n. 49, p. 14781–14794, 2001.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. . A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300–309, 2002.

KAR, S.; SONA GAURI, S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 57–68, 2013.

KARAN, R.; CAPES, M. D.; DASSARMA, P.; DASSARMA, S. Cloning, overexpression, purification, and characterization of a polyextremophilic β -galactosidase from the Antarctic haloarchaeon *Halorubrum lacusprofundi*. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 1-3, 2013.

KAMRAN, A.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of β -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 99–103, 2016.

KAMRAN, A.; BIBI, Z.; AMAN, A.; UL QADER, S. A. Purification and catalytic behavior optimization of lactose degrading β -galactosidase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 167–176, 2019.

KAUR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S. Utilization of whey for the production of β -galactosidase using yeast and fungal culture. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 9, n. 7, p. 739–743, 2015.

KAUR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S. Utilization of agro-industrial residues for the production of β -galactosidase using fungal isolate under solid state fermentation conditions. **Acta Alimentaria**, v. 47, n. 2, p. 162–170, 2018.

KAZEMI, S.; KHAYATI, G.; FAEZI-GHASEMI, M. β -galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: Optimization by orthogonal arrays design. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 5, p. 287–294, 2016.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242–243, 1995.

KHAYATI, G.; ANVARI, M.; KAZEMI, S. Peanut pod-an inexpensive substrate for β -galactosidase production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation: process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. **Minerva Biotec**, v. 26, n. 4, p. 301–307, 2014.

KISKA, J.; SWITKA, J.; KRUK, A.; SURAZYNSKI, A. Utilizacion de la β -D-galactosidase en la elaboration de la lecha condensada azucarada. **Le Lait**, v. 527, p. 10–15, 1973.

KLEIN, M. P.; FALLAVENA, L. P.; SCHÖFFER, J. da N.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. High stability of immobilized

β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 465–470, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LIMA, M. A. **Recuperação e purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* utilizando cromatografia de modo misto**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

LIMA, M. A.; FREITAS, M. F. M.; GONÇALVES, L. R. B.; SILVA JUNIOR, I. J. Recovery and purification of a *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase by mixed mode chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1015–1016, p. 181–191, 2016.

LIU, P.; WANG, W.; ZHAO, J.; WEI, D. Screening novel β -galactosidases from a sequence-based metagenome and characterization of an alkaline β galactosidase for the enzymatic synthesis of galactooligosaccharides. **Protein Expression and Purification**, V. 155, P. 104-111, 2019.

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 490–495, 2014.

MAKSIMAINEN, M.; HAKULINEN, N.; KALLIO, J. M.; TIMOHARJU, T.; TURUNEN, O.; ROUVINEN, J. Crystal structures of *Trichoderma reesei* β -galactosidase reveal conformational changes in the active site. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 1, p. 156–163, 2011.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 4, n.1, p. 1 – 25, 2017.

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

MARTARELLO, R. D. **Purificação de uma β -galactosidase produzida por *Aspergillus foetidus* através de técnicas cromatográficas.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MARTARELLO, R. D.; CUNHA, L.; CARDOSO, S. L.; FREITAS, M. M.; SILVEIRA, D.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; HOMEM-DE-MELLO, M.; FILHO, E. X. F.; MAGALHÃES, P. O. Optimization and partial purification of β -galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. **AMB Express**, v. 9, n. 81, p. 1-13, 2019.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. de C.; CARRILHO, F. J. Lactose intolerance : diagnosis, genetic, and clinical factors. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 5, p. 113–121, 2012.

MATTHEWS, B. W. The structure of *E. coli* β -galactosidase. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, n. 6, p. 549–556, 2005.

MCILVAINE, T. C. A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183-186, 1921.

MORTOZA, A. R. **Produção e purificação de β -galactosidase expressa por fungo isolado do bioma cerrado brasileiro visando à aplicação como suplemento digestivo.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

NAGY, Z.; KERESZTESSY, Z.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 351–362, 2001(a).

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 2001(b).

NAKAO, M.; HARADA, M.; KODAMA, Y.; NAKAYAMA, T.; SHIBANO, Y.; AMACHI, T. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 5, p. 657–663, 1994.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 3, p. 304–313, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6º Ed. Artmed, 2014.

NICKERSON, T. A. Fundamentals of Dairy Chemistry. In: AVI PUBLISHING CO. (Ed.). **Lactose**. 2nd ed., p. 224–324.

NIE, C.; LIU, B.; ZHANG, Y.; ZHAO, G.; FAN, X.; NING, X.; ZHANG, W. Production and secretion of *Lactobacillus crispatus* β -galactosidase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, n. 1, p. 88–93, 2013.

NIVETHA, A.; MOHANASRINIVASAN, V. Mini review on role of β -galactosidase in lactose intolerance. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 263, p. 022046, 2017.

NIU, D. D.; TIAN, X. J.; MCHUNU, N. P.; JIA, C.; SINGH, S.; LIU, X. G.; PRIOR B. A.; LU, F. P. Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. **Electron Journal Biotechnology**. v. 27, p. 37–43, 2017.

NIZAMUDDIN, S.; SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid - state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1096–1100, 2008.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 600–609, 2011.

PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SINGH, R. S. Isolation and screening of fungal strains for β -galactosidase production. **International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 10, n. 7, p. 400–404, 2016.

PAWLAK-SZUKALSKA, A.; WANARSKA, M.; POPINIGIS, A. T.; KUR, J. A novel cold-active β -D-galactosidase with transglycosylation activity from the

Antarctic *Arthrobacter* sp. 32cB—gene cloning, purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2122–2133, 2014.

PINTO, F. A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

PRENOSIL, J. E.; STUKER, E.; BOURNE, J. R. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 9, p. 1019–1025, 1987.

PRÉVOT, V.; LOPEZ, M.; COPINET, E.; DUCHIRON, F. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690–693, 2013.

RAOL, G. G.; RAOL, B. V.; PRAJAPATI, V. S.; PATEL, K. C. Kinetic and thermodynamic characterization of a halotolerant β -galactosidase produced by halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 879–889, 2015(a).

RAOL, G. G.; RAOL, B. V.; PRAJAPATI, V. S.; BHAVSAR, N. H. Utilization of agro-industrial waste for β -galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 411–421, 2015(b).

RHIMI, M.; BOISSON, A.; DEJOB, M.; BOUDEBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: Immobilization and biochemical characterization of a β -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 515–525, 2010.

RIZZATTI, A. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G.; POLIZELI, M. L. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156–60, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2009.

ROJAS, A. L.; NAGEM, R. A. P.; NEUSTROEV, K. N.; ARAND, M.; ADAMSKA, M.; ENEYSKAYA, E. V.; KULMINSKAYA, A. A.; GARRATT, R. C.; GOLUBEV, A. M.; POLIKARPOV, I. Crystal structures of β -galactosidase from *Penicillium* sp. and its complex with galactose. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, n. 5, p. 1281–92, 2004.

SAAD, R. R. Purification and some properties of β -galactosidase from *Aspergillus japonicus*. **Annals of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 299–306, 2004.

SEIBOTH, B.; PAKDAMAN, B. S.; HARTL, L.; KUBICEK, C. P. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 42–48, 2007.

SEN, S.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p. 1938–1953, 2012.

SHARMA, S.; SINGH, P. Isolation and characterization of β -galactosidase enzyme producing microbe and optimization of its enzyme activity under different culture condition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 148–155, 2014.

SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 131–139, 2018.

SONG, C.; LIU, G.-L.; XU, J.-L.; CHI, Z.-M. Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 954–960, 2010.

SUN, H.; LI, J.; ZHAO, P.; PENG, M. Banana peel: a novel substrate for cellulose production under solid-state fermentation. **African Journal Biotechnology**, v. 10, p. 17887–17890, 2011.

TOMAR, B. S. Lactose intolerance and other disaccharidase deficiency. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 9, p. 876–880, 2014.

TONELOTTO, M.; PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. D. S.; BARROS, G. D. O. F.; GOLUBEV, A. M.; POLIKARPOV, I.; FARINAS, C. S. Isolation and characterization of a β -galactosidase from a new Amazon forest strain of *Aspergillus niger* as a potential accessory enzyme for biomass conversion. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 13–22, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VAN CASTEREN, W. H. .; EIMERMANN, M.; VAN DEN BROEK, L. A. .; VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. **Carbohydrate Research**, v. 329, n. 1, p. 75–85, 2000.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ILLANES, A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 6, p. 745–752, 2011.

VIANA, C. S. **Produção de β -galactosidase por *Aspergillus oryzae* cultivado em soro de queijo**. 2017. Mestrado (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Leite e derivados) – Universidade do Oeste do Paraná, Londrina, 2017.

VIDYA, B.; PALANISWAMY, M.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Screening and optimization of β -galactosidase from fungal strains by using agro residues. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 2014, 2014.

VOGEL, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi: Evolutionary implications. **The American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 435–446, 1964.

XAVIER, J. R.; RAMANA, K. V.; SHARMA, R. K. β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. e12564, 2018.

XIA, Y.; HE, L.; MAO, J.; FANG, P.; MA, X.; WANG, Z. Purification, characterization, and gene cloning of a new cold-adapted β -galactosidase from *Erwinia* sp. E602 isolated in northeast China. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6946–6954, 2018.

YAMADA, M.; CHIBA, S.; ENDO, Y.; ISOBE, K. New alkalophilic β -galactosidase with high activity in alkaline pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 15–19, 2017.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 1 – 28, 2017.

YIN, H.; BULTEMA, J. B.; DIJKHUIZEN, L.; VAN LEEUWEN, S. S. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 225, p. 230–238, 2017.

ANEXO - Composição dos meios de cultivo

Meio Czapeck Dox modificado (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997)

- KH_2PO_4 0,152 g
- KCl 0,052 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,052 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g
- Fonte de carbono.....1,0 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Meio Khanna modificado (KHANNA et al., 1995)

- Solução de sais Khanna [20x].....5,0 mL
- Fonte de carbono.....1,0 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução de sais Khanna [20x]

- NH_4NO_3 2,0 g
- KH_2PO_4 1,3 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,362 g
- KCl 0,098 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,007 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0138 g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0066 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0062 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Meio Mínimo (HILL et al., 2001)

- Mix de sais [20x].....5,0 mL
- Solução de MgSO_4 [200x].....0,5 mL
- Solução estoque de elementos traços.....0,1 mL
- Fonte de carbono.....1,0 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução de mix sais [20x]

- NaNO_3 120,0 g
- KCl 10,4 g
- KH_2PO_4 16,3 g
- K_2HPO_4 20,9 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução de MgSO_4 [200x]

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10,4 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução estoque de elementos traços

Combine a solução A e B, ajustar o pH para 6,5 com pellets de KOH. Completar o volume para 200mL. Armazenar a 4°C.

Solução A: Para o preparo desta solução é necessário primeiro dissolver o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em água, adiciona-se o EDTA. O pH deve ser ajustado para cerca de 5,5, gerando uma solução amarelo dourado.

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g
- EDTA.....10,0 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução B: Para o preparo desta solução os reagentes devem ser dissolvidos na água na seguinte ordem:

- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,4 g
- H_3BO_3 2,2 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,32 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,32 g
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g
- Água destilada.....q.s.p. 80 mL

Meio SR modificado (RIZZATI et al., 2001)

- Solução de sais SR [20x].....5,0 mL
- Peptona.....0,02 g
- Fonte de carbono.....1,0 g

- Água destilada.....q.s.p. 100 mL
- Solução de sais SR [20x]*
- KH_2PO_4 0,3 g
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g
 - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,0 g
 - Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Meio Vogel (VOGEL, 1964)

- Solução de sais de Vogel [50x].....2,0 mL
- Solução de elementos traços.....0,5 mL
- Solução de Biotina.....20,0 μL
- Fonte de carbono.....1,0 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução de sais de Vogel [50x]

- $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 1,5 g
- KH_2PO_4 2,5 g
- NH_4NO_3 1,0 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Solução de elementos traços

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 g
- $\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- H_3BO_3 0,05 g
- $\text{Na}_2\text{Mo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- Clorofórmio.....1,0 mL

Solução de Biotina

- Biotina.....0,05 g
- Etanol 50%.....100 mL