

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, ESTUDOS DAS PROPRIEDADES  
E APLICAÇÃO DA  $\beta$ -GALACTOSIDASE DE *SCOPULARIOPSIS SP*

GLAUCIA MARIA PASTORE

ORIENTADOR:

DR. YONG KUN PARK

*Tese apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos e Agrícola,  
da Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciências de Alimentos.*

Campinas - SP

1981

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais e irmãos.

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela sua constante e valiosa orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Leme, diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

A Profa. Dra. Iracema de Moraes, coordenadora do Curso de Pós - Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Flávio Leite Aranha, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, pelo seu constante apoio e amizade.

A Srta. Maria Silvia Silveira de Santi e Maria Auxiliadora de Oliveira, pela inestimável colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEAA da Universidade Estadual de Campinas, pelo incentivo e colaboração prestados.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, pelo auxílio prestado.

Aos demais amigos e colegas, pelo estímulo e colaboração recebida para a realização deste trabalho.

## C\_O\_N\_T\_E\_Ú\_D\_O

	<u>Página</u>
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1 Seleção de microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase .....	23
3.1.1 Coleta de amostra do solo .....	23
3.1.2 Isolamento de microrganismo do solo .....	23
3.1.3 Seleção preliminar de microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase .....	24
3.1.4 Seleção de microrganismo melhor produtor de enzima .....	24
3.2 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .	25
3.2.1 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase com substrato D-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) .....	25

3.2.2	Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase - com substrato lactose .....	25
3.3	Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima .....	26
3.3.1	Preparação da suspensão de esporos para fermenta ção submersa e semi-sólida do <i>Saccharomyces sp</i> .....	26
3.3.2	Fermentação semi-sólida .....	26
3.3.3	Fermentação submersa .....	27
3.4	Efeito da adição de lactose no meio de cultura .	27
3.5	Produção de $\beta$ -galactosidase bruta, em pó ....	27
3.6	Purificação da $\beta$ -galactosidase .....	28
3.6.1	Fracionamento com sulfato de amônio .....	28
3.6.2	Cromatografia de $\beta$ -galactosidase em coluna de DEAE-celulose .....	29
3.6.3	Cromatografia em coluna de CM-celulose .....	30
3.7	Determinação da concentração de proteína .....	30
3.8	Caracterização da $\beta$ -galactosidase purificada .	30
3.8.1	Efeito do pH na atividade enzimática .....	31
3.8.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima .....	31
3.8.3	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	32

	<u>Página</u>	
3.8.4	Efeito da temperatura na atividade da enzima .	32
3.8.5	Efeito de sais minerais na atividade enzimática	33
3.8.6	Efeito de inibidores na atividade enzimática .	33
3.8.7	Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática .....	34
3.8.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	35
3.8.9	Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS (sódio dodecyl sulfato) gel de poliacrilamida .....	36
3.9	Estudo da ação de $\beta$ -galactosidase em soro de leite .....	37
3.9.1	Preparação do soro de leite .....	37
3.9.2	Determinação do teor de lactose presente no soro .....	37
3.9.3	Determinação da temperatura ótima para hidrólise da lactose em soro de leite pela $\beta$ -galactosidase .....	38
3.9.4	Efeito da concentração enzimática na hidrólise da lactose presente no soro .....	38
3.10	Cromatografia ascendente em papel dos produtos de hidrólise da lactose .....	38
4.	RESULTADOS .....	40
4.1	Seleção de microrganismos .....	40

4.1.1	Seleção preliminar de microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase .....	40
4.1.2	Seleção do microrganismo melhor produtor de $\beta$ -galactosidase .....	40
4.2	Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima .....	41
4.3	Efeito da adição da lactose no meio de cultura .	41
4.4	Purificação da $\beta$ -galactosidase .....	41
4.5	Caracterização da $\beta$ -galactosidase purificada .	42
4.5.1	Efeito do pH na atividade enzimática .....	42
4.5.2	Efeito do pH na estabilidade enzimática .....	42
4.5.3	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	43
4.5.4	Efeito da temperatura na atividade enzimática .	43
4.5.5	Efeito de sais minerais na atividade enzimática	43
4.5.6	Efeito de inibidores na atividade enzimática .	44
4.5.7	Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática .....	44
4.5.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	44
4.5.9	Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS (sódico dodecyl sulfato) gel de poliacrilamida .....	45

4.6	Estudo da ação de $\beta$ -galactosidase em soro de leite .....	45
4.6.1	Determinação da temperatura ótima para hidrólise lactose em soro de leite pela $\beta$ -galactosidase .....	45
4.6.2	Efeito da concentração da enzima na hidrólise da lactose em soro de leite .....	45
4.7	Cromatografia ascendente em papel dos produtos de hidrólise da lactose .....	46
5.	DISCUSSÃO .....	47
5.1	Seleção do microrganismo .....	47
5.2	Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima .....	47
5.3	Efeito da adição de lactose no meio de cultura .....	48
5.4	Purificação da $\beta$ -galactosidase .....	48
5.5	Caracterização da $\beta$ -galactosidase .....	49
5.5.1	Efeito do pH na atividade enzimática .....	49
5.5.2	Efeito do pH na estabilidade enzimática .....	50
5.5.3	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima .....	50
5.5.4	Efeito da temperatura na atividade enzimática .....	51



	<u>Página</u>
5.5.5	Efeito de sais minerais na atividade enzimática 51
5.5.6	Efeito de inibidores na atividade enzimática . 51
5.5.7	Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática ..... 52
5.5.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida ..... 53
5.5.9	Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS - gel de poliacrilamida ..... 53
5.6	Aplicação de $\beta$ -galactosidase ..... 53
6.	CONCLUSÕES ..... 54

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1 -	Linhagens de fungos selecionadas para produção de $\beta$ -galactosidase .	56
Tabela 2 -	Purificação da $\beta$ -galactosidase .	57
Tabela 3 -	Efeito de sais minerais na atividade enzimática ..... 58	
Tabela 4 -	Efeito de inibidores de enzimas na atividade da $\beta$ -galactosidase ... 59	

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 -	Microfotografia de <i>Scopulariopsis sp</i> ..... 60
------------	--

Figura 2 - Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima em fermentação submersa .....	61
Figura 3 - Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima em fermentação semi-sólida .....	62
Figura 4 - Fluxograma da produção e purificação de $\beta$ -galactosidase .....	63
Figura 5 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose de $\beta$ -galactosidase .....	64
Figura 6 - Cromatografia em coluna de CM-celulose de $\beta$ -galactosidase .....	65
Figura 7 - Efeito do pH na atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase .....	66
Figura 8 - Efeito do pH na estabilidade de $\beta$ -galactosidase .....	67
Figura 9 - Efeito da temperatura na estabilidade de $\beta$ -galactosidase .....	68
Figura 10 - Efeito da temperatura na atividade de $\beta$ -galactosidase .....	69
Figura 11 - Efeito da concentração do substrato ONPG na atividade de $\beta$ -galactosidase .....	70
Figura 12 - Efeito da concentração do substrato lactose na atividade enzimática .....	71

Figura 13 - Eletroforese da $\beta$ -galactosidase - purificada em gel de poliacrilemida	72
Figura 14 - Eletroforese da $\beta$ -galactosidase - purificada em gel de poliacrilamida	73
Figura 15 - Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS (sódio dodacyl sulfate) gel de poliacrilamida ..	74
Figura 16 - Efeito da temperatura na hidrólise da lactose em soro de leite .....	75
Figura 17 - Efeito da concentração enzimática da $\beta$ -galactosidase na hidrólise da lactose em soro de leite .....	76
Figura 18 - Cromatografia ascendente em papel , dos produtos de hidrólise da lacto- se .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## -: RESUMO :-

Um mil e sessenta e sete linhagens de fungos foram isoladas do solo e testadas quanto à capacidade de produzir  $\beta$ -galactosidase. Foi encontrada uma linhagem, classificada como *Scopulariopsis sp.*, que produz alta atividade de  $\beta$ -galactosidase.

Estudou-se a produção e a purificação de  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp.* e determinou-se as características da enzima purificada. A enzima foi produzida por fermentação semi-sólida, usando-se farelo de trigo para cultura do microorganismo. A enzima bruta suficientemente hidrolisa lactose em soro de leite. A enzima bruta foi purificada por fracionamento, com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose. A enzima purificada foi caracterizada verificando-se sua homogeneidade eletroforéticamente e seu peso molecular estimado ser 95 000, através do método de eletroforese em gel de SDS poliacrilamida. O pH ótimo para atividade enzimática foi entre 3,6 a 5,0, usando-se ONPG (Orto-Nitrofenil  $\beta$ -D-Galactopiranosídeo) como substrato e com lactose como substrato o pH ótimo foi 4,5. A temperatura ótima para atividade enzimática foi 65 °C para ONPG e 55 °C para lactose. A atividade enzimática não sofre efeito pela adição de íons metálicos como  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$  e outros reagentes como  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ , porém foi verificado que  $\text{AgNO}_3$  tem algum efeito inibitório sobre a atividade enzimática. Galactose inibe a ação da enzima, enquanto glicose não inibe. Dietilditiocarbamato de sódio (10mM), p-hidroximercuribenzoato (10 mM), mercaptoetanol (10 mM), não inibem a atividade enzimática. Por isto, grupos sulfidrila da molécula da enzima não estão envolvidos na atividade catalítica.

A  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp.* hidrolisou quase completamente (95 %) a lactose contida em soro ácido de leite (pH 4,5), após 50 horas de incubação a 55 °C, quando a atividade enzimática era 250 unidades por 100 ml de soro de leite.

## -: S U M M A R Y :-

One thousand and sixty seven strain of fungi were isolated from soil and examined for their capacity for production of  $\beta$ -galactosidase. It was found that one strain which is classified as *Scopulariopsis sp* has produced the highest activity of  $\beta$ -galactosidase.

Production and purification of  $\beta$ -galactosidase from *Scopulariopsis sp* were attempted and characterization of the purified enzyme was performed. The enzyme was produced by semisolid fermentation using wheat bran culture of the microorganism. The crude enzyme sufficiently hydrolyzed lactose in acid whey. The crude enzyme was purified by fractionation with ammonium sulfate, a DEAE-cellulose and CM-cellulose column chromatographies. The purified enzyme was characterized and found that was electrophoretically homogeneous and its molecular weight was estimated to be 95 000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH of the enzyme activity was between 3,6 and 5,0 when ONPG was used as substrate, and with lactose as substrate the optimum pH was 4,5. The optimum temperature was 65 °C to ONPG and 55 °C to lactose. The enzyme activity did not suffer any effect by the addition of metals ions as  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , KCl and others reagents such as  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ , but  $\text{AgNO}_3$  has some inhibitory effect on the enzyme activity. Galactose inhibits enzyme activity where as glucose did not. Sodium diethyldithio carbamate (10 mM), p-hydroxymercuribenzoate (10 mM), mercaptoethanol (10 mM) did not inhibit enzyme activity. Thus sulfhydryl groups of the molecule are not involved in the catalytic activity.

The  $\beta$ -galactosidase from *Scopulariopsis sp*, hydrolyzed quite completely (95 %) the lactose content present in acid whey (pH 4,5) after 50 hr of incubation at 55 °C, when the enzyme activity was 250 units per 100 ml of acid whey.

## 1. INTRODUÇÃO

A hidrólise da lactose em leite e derivados pode aumentar a digestibilidade e aumentar e melhorar as propriedades funcionais dos alimentos que contêm lactose.

O presente trabalho visa à seleção de microrganismos produtores de  $\beta$ -galactosidase, que hidrolisa a ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica da lactose, dando como produto de reação glicose e galactose.

O microrganismo de maior produção de  $\beta$ -galactosidase será submetido ao estudo de produção de enzima e estudos em diferentes meios de cultura, tempo de incubação, procurando-se desta forma a otimização na produção da enzima.

A preparação bruta de  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp* será submetida à purificação através do fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose, CM-celulose e também será estudada a caracterização da enzima.

Estudar-se-á a aplicação da enzima em soro de leite ácido (pH 4,5).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1924 Nauberg e Rosenthal (49) verificaram que a ação prolongada de  $\beta$ -galactosidade produzida por *Aspergillus oryzae* sobre lactose podia resultar em mudanças na rotação óptica da solução.

Mais tarde, em 1934, F.A. Cajori (5) observou que uma enzima que hidrolisa lactase era invariavelmente achada em extratos aquosos de mucosa de duodeno e jejuno de cachorros adultos, porém extrato aquoso de segmentos de cólon não contém a enzima. Esta lactase intestinal inibia atividade máxima em solução ácida entre pH 5,4 e 6,0. Sua atividade era inibida por glicose, mas não por galactose. A determinação da constante de Michaelis indicou 0,0056 mM, o que representa que a lactase intestinal tem alta afinidade por seu substrato, maior que a invertase intestinal. Uma lactase foi também achada em extratos aquosos de fígado de cão, porém a atividade enzimática de tais extratos era cerca de 1/5 do extrato da mucosa intestinal.

Em 1948, R. Caputto et al (16) estudaram a lactase na fermentação da lactose em *Saccharomyces fragilis*. Foi verificado que em preparações parcialmente purificadas de lactase deste microrganismo, as condições para atividade máxima foram a presença de íons magnésio, manganês ou potássio. A atividade por fosfato é atribuída à remoção de íons zinco inibidores. O mesmo efeito foi obtido com citrato, palmitato, oleato ou tartarato. O pH ótimo está entre 6,7 e 6,9, e a temperatura ótima de 30 °C.

Posteriormente, Joshua Lederberg, em 1950 (39), estudando a

$\beta$ -galactosidase obtida de *Escherichia coli* cepa K 12, verificou que a enzima produzida intracelularmente tem sua atividade profundamente afetada por íons de metais alcalinos. A extensão da ativação ou inibição depende da concentração do substrato, mas não pode ser formulada como competitiva. Acredita-se que a interação da enzima com um íon metálico particular influencia tanto a absorção do substrato para o sítio ativo, como a taxa de decomposição do complexo para formar enzima nativa e produto. Estes resultados podem ser esperados se íons metálicos reagem com grupos da enzima, adjacentes ou superpostos ao sítio de ligação com o substrato. O autor conclui que os íons potássio, lítio, amônio, césio são substancialmente inertes, porém rubídio é inibitório. A inibição por rubídio é revertida por sódio ou potássio, sugerindo que os vários íons competem entre si. Outros inibidores foram estudados verificando-se que íons cúpricos e íons mercúrios imediatamente inativam a enzima. O seu pH ótimo é 7,3 e a temperatura ótima de atividade é 37 °C.

Em 1951, Melvin Cohn e Jacques Monod (21) purificaram e estudaram as propriedades de  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* ML, sugerindo pelos resultados obtidos que a ativação que um íon exerce sobre a atividade enzimática é uma propriedade que depende não somente da enzima e do íon, mas também da estrutura química do substrato. Tal observação se deve ao fato de que em presença do substrato lactose e íon potássio é um ativador mais eficiente que o íon sódio e, quando o substrato é ONPG (Orto-nitrophenil  $\beta$  - D-galactopiranosídeo), o inverso ocorre.



Em 1951, N.S.Chr. Heilskov (32) estudou as lactases animais e sua distribuição em algumas glândulas do trato digestivo. O estudo foi realizado em vacas, coelhos e fetos humanos, sendo os órgãos pâncreas, intestino delgado e cólon examinados após morte. Dos animais estudados a lactase estava presente somente no intestino delgado sendo a quantidade de enzima diminuída na direção distal do intestino. Nos fetos humanos, há lactase na parede do intestino delgado a partir de 5 meses de vida intra-uterina. A atividade da enzima é aumentada com o prosseguimento da vida intra-uterina.

Em 1952, Aronson (6) estudou a transgalactosidação durante a hidrólise da lactose. Usando lactase produzida por *Saccharomyces fragilis*, verificou que ocorre transgalactosidação para glicose, galactose e lactose. Entretanto, hidrólise de lactose por lactase de *Escherichia coli* e com ácidos minerais também produzem oligossacarídeos. Estes resultados indicam que lactase funciona como transgalactosidase. Seguindo tal idéia, a enzima foi colocada para hidrolisar lactose na presença de alta concentração de glicose e galactose, formando-se diversos oligossacarídeos. O conhecido fato que galactose inibe a hidrólise da lactose foi confirmado novamente, enquanto que na presença de glicose não houve inibição.

Em 1954, Otto E. Landman (38) estudou a produção de  $\beta$ -galactosidase por *Neurospora crassa*. Observou que este microorganismo produz quantidades substanciais de  $\beta$ -galactosidase quando cresce em presença de galactose, lactose e em pentoses como L-arabinose e D-xilose, porém pequenas quantidades de enzima são obtidas quando cresce em outras numerosas fontes de carbono. A enzima "constitutiva" e "induzida" parece ser a mesma. Altas concentrações de

$\beta$ -galactosidase são formadas se micélio é incubado em soluções diluídas e tamponadas do indutor.

A.S.L. Hu et al, em 1954 (34) prepararam e purificaram a  $\beta$ -galactosidase produzida por *Escherichia coli* ML 308. O microrganismo foi inoculado no meio de succinato-peptona-sais e incubado a 30 °C por 18 horas. A massa celular foi centrifugada e as células bacterianas rompidas por trituração com alumina. O extrato feito com o material foi submetido à purificação. Constatou-se que esta enzima tem requerimento absoluto por íons magnésio.

Posteriormente, Julia M. Anderson e H.U. Rickenberg (1), em 1960, estudaram a  $\beta$ -galactosidase produzida por *Paracolobatrnum aerogenoides* e a compararam com a  $\beta$ -galactosidase produzida por *Escherichia coli*. Foi verificado que ambas têm pH ótimo de valor igual a 7,0. O íon sódio ativa a  $\beta$ -galactosidase de *Paracoliba-trum aerogenoides* mais efetivamente que potássio quando ONPG é usado como substrato. Com o estudo da estabilidade foi observado que esta enzima é muito mais lábil a uma variedade de condições e reagentes que a  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli*.

Em 1960, Kurt Wallenfels, J. Lehman, G.P. Malhotra (69) estudaram a  $\beta$ -galactosidase produzida por *Escherichia coli* ML 308. Verificaram a hidrólise pela enzima de diversos substratos, constatando que tiogalactosídeos possuem alta afinidade para a enzima, mas não são hidrolisados pela  $\beta$ -galactosidase. Observou-se também que a afinidade da enzima pelo substrato é sempre aumentada por NaCl.

H.V. Rickenberg, em 1960 (57) verificou a ocorrência de  $\beta$ -galactosidase no gênero *Shigella*. Observou que há parcial homologia genética entre este gênero e o gênero *Escherichia*. Uma das marcas genéticas empregadas nestes experimentos foi o caráter LAC. O gênero *Escherichia* é caracterizado pela habilidade de fermentar lactose, o que não ocorre no gênero *Shigella*, na maioria das espécies. O autor salienta que algumas cepas do gênero *Shigella*, incluindo *Shigella dysenteriae*, que tem sido usada em experimentos de transdução e recombinação, possuem atividade de  $\beta$ -galactosidase, entretanto são incapazes de fermentar lactose.

Mais tarde, em 1963, Carla R. Clausen e Mitsuru Nakamura (19), estudaram  $\beta$ -galactosidase produzida por *Shigella sonnei*, sendo o objetivo do trabalho o estudo das propriedades da lactase e dos fatores que afetam seu processo de indução. Foi observado que lactose é um fraco indutor de enzima, sendo o melhor indutor o tiometil galactosídeo (TMG). Foi constatado que  $\beta$ -galactosidase produzida por *Shigella sonnei* comporta-se diferentemente sobre vários aspectos, principalmente no que se refere a indutores de  $\beta$ -galactosidase em relação à enzima produzida por *Escherichia coli*.

Y. Pomeranz e B.S. Miller em 1963 (52), avaliaram as diversas preparações de lactase produzida por diversas fontes e observaram sua aplicabilidade na panificação. Foi verificado o efeito do pH, salientando-se que o pH ótimo determinado não é somente para ação da lactase, mas para todo o sistema, envolvendo a hidrólise da lactose pela lactase e a subsequente fermentação da glicose formada por uma levedura usada em panificação (*Saccharomyces cerevisiae*).

As preparações enzimáticas de várias fontes variavam largamente em sua atividade. Foi observado que lactases fúngicas permitem máxima evolução de dióxido de carbono a baixo pH, o que é mais compatível com o pH presente durante a fermentação do pão.

J.K. Mc Clathy e E.D. Rosenblum, em 1964 (44) estudaram a indução da utilização da lactose em *Staphylococcus aureus*, verificando que a  $\beta$ -galactosidase produzida é de alguma forma menos estável quando comparada à enzima produzida por *Escherichia coli*. A enzima não foi obtida com sucesso em preparações livres de células.

Em 1964, P.J. Anema (3) purificou e estudou as propriedades da  $\beta$ -galactosidase produzida por *Bacillus subtilis*. A enzima foi purificada utilizando-se precipitação de ácidos nucleicos, fracionamento com sulfato de amônio, precipitação com acetona. Foi relatado que os íons cálcio, lítio, férrico, manganês, magnésio, cloro, sulfato, carbonato e nitrato não influenciaram na atividade da enzima. A temperatura ótima foi de 50 °C e o pH ótimo de 6,5.

No mesmo ano, R. Davies (24) estudou a utilização da lactose por *Saccharomyces fragilis*, observando que a utilização da lactose por este microrganismo não tem sido extensivamente estudada, mas os dados obtidos nestes trabalhos apoiam a teoria de que os  $\beta$ -galactosídeos só são hidrolisados após o transporte para dentro da célula. Esta conclusão é baseada no fato de que a atividade da  $\beta$ -galactosidase é aumentada cerca de 10 a 20 vezes, quando as células de *Saccharomyces fragilis* sofrem rupturas de várias maneiras. O pH ótimo para hidrólise da lactose é 6,5 e para o substrato sintético ONPG é 7,0. Os cátions sódio e potássio ativam a enzima.

G. Szabo e R. Davies, em 1964 (65) realizaram estudos sobre a atividade de  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces fragilis*, verificando os fatores que afetam a atividade desta enzima. Os íons cúpricos, zinco e mercúrio, na concentração de 100 mM, inibiam a atividade da enzima enquanto outros íons como magnésio, cálcio, ferroso e férrico, na mesma concentração, não apresentam efeito sobre a atividade enzimática. P-cloromercúrio benzoato inibiu a atividade de  $\beta$ -galactosidase. O agente quelante EDTA inibe a atividade da enzima, porém tal inibição pode ser anulada por vários cátions metálicos.

Y. Pomeranz, em 1964 (53) verificou a ocorrência e propriedades das lactases estudando a possibilidade de utilização de lactose hidrolisada para aumentar as propriedades edulcorantes da lactose e impedir o efeito indesejável de sua cristalização em produtos laticíneos.

O mesmo autor, no mesmo ano, continuando as pesquisas num trabalho subsequente, relata os métodos analíticos para determinação da atividade enzimática e as implicações práticas do uso da lactase na indústria de alimentos. Cita como exemplo a utilização de lactose hidrolisada por lactase, na panificação, pois seria produzida glicose fermentável e galactose não fermentável, que contribuiria para a coloração da crosta do pão através da reação de Maillard. Ainda nesta aplicação industrial observa-se que a lactase de origem fúngica mais efetivamente supre glicose fermentável. Isto foi atribuído ao baixo pH ótimo da lactase fúngica, que em geral encontra-se na faixa de 4,5 a 5,5.

A  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus lactis* foi estudada por J.E. Citti et al em 1965 (18). A síntese de  $\beta$ -galactosidase deste microrganismo foi induzida por lactose. Para obtenção da enzima as células foram tratadas com tolueno. A enzima foi analisada à temperatura ótima de 37 °C, pH ótimo de 7,0. Verifica-se que há requerimento essencial para o íon sódio quando é utilizado o substrato sintético ONPG.

Gary R. Craven et al em 1965 (22) realizaram a purificação, composição e peso molecular da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* K 12. A precipitação da enzima foi feita com sulfato de amônio seguido de filtração em Sephadex G-200. A fração ativa foi aplicada a uma coluna de DEAE-Sephadex A-50 e eluída com gradiente de concentração de cloreto de sódio. A enzima purificada exibe as mesmas propriedades físicas da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli*, reportadas na literatura. Entretanto, a distribuição dos resíduos de cisteína entre as formas sulfidrila e dissulfídica parece ser marcadamente diferentes da  $\beta$ -galactosidase isolada de *Escherichia coli* cepa ML 30. O produto final das células de *Escherichia coli* K 12 tem peso molecular ao redor de 540 000 e a análise de aminoácido indica a presença de aproximadamente 1170 resíduos de aminoácidos por quarto de molécula. Aproximadamente metade dos grupos sulfidrila são reativos ao ácido iodoacético na molécula nativa sem perda da atividade enzimática.

S.H. Appell et al (5) em 1965 estudaram as formas múltiplas de  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli*. Neste trabalho, formas múltiplas das enzimas do operon LAC deste microrganismo como  $\beta$ -galactosidase e tiogalactosídeo-transacetilase têm sido demonstradas.

A estabilidade, reprodutibilidade sugerem que sua multiplicidade não é resultado de manipulação experimental, mas representa o estado intracelular da enzima. Os resultados indicam que em células bacterianas onde o operon LAC não é induzido a  $\beta$ -galactosidase migra numa única banda e rapidamente. Na indução, formas estáveis múltiplas da enzima aparecem. As diferentes formas da enzima podem ser parcialmente separadas por eletroforese de disco, eletroforese em gel de amido ou gradiente de centrifugação com sacarose. Entretanto, as formas da enzima diferem umas das outras por peso molecular e provavelmente não devido à carga ou outras diferenças. Salientam que o fato de perfis idênticos de atividade encontrados na ausência de indutor e em bactérias induzíveis, demonstram que a multiplicidade de formas não resulta do processo de indução em si mesmo. Sua presença pode ser relacionada à estabilização das moléculas enzimáticas "in vivo" ou para a facilitação do metabolismo da lactose. Entretanto, o significado destas formas é incerto e o entendimento do mecanismo de formação pode contribuir para elucidar o conjunto de estruturas macromoleculares.

A purificação, caracterização da  $\beta$ -galactosidase de *Aeromonas formicans* foi estudada por S.R. Rohlfsing e I.P. Crawford, em 1966 (58). Compararam com as propriedades da enzima com a  $\beta$ -galactosidase produzida e purificada de *Escherichia coli*. O coeficiente de sedimentação e a mobilidade eletroforética das duas enzimas não foram significativamente diferentes. A estabilidade das duas enzimas aos agentes desnaturantes produzem diferenças mensuráveis. A lactase de *Escherichia coli* é relativamente mais termoestável e mais resistente à ação da uréia. A composição

de aminoácidos das duas proteínas revelam significantes diferenças em diversos aminoácidos, particularmente, alanina, arginina, glicina e leucina. As comparações sugerem que as duas enzimas não são completamente não relacionadas, pois demonstram considerável similaridade estrutural.

Em 1966, S.R. Rohlffing e I.P. Crawford (59) estudaram a purificação parcial e as propriedades físicas da  $\beta$ -galactosidase produzida por *Bacillus megaterium*, sendo tais propriedades comparadas com as propriedades físicas de  $\beta$ -galactosidase produzida por *Aeromonas formicans*, observando-se estruturas similares. Porém certas características imunológicas e catalíticas diferem, indicando diferença sensível na estrutura primária de ambos.

G.A. Mcfeters et al, em 1967 (45) estudaram a  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus lactis* 7962 e fizeram a semipurificação da enzima. A enzima resultante quando resuspensa em tampão fosfato 0,1 M a 5 °C foi extremamente lábil. Entretanto, sulfato de amônio em altas concentrações (0,85 M) estabilizaram e estimularam a atividade de  $\beta$ -galactosidase. Filtração em Sephadex G-200 foi usada para posterior purificação e homogeneidade da enzima. Os resultados sugerem que a enzima nativa foi dissociada em subunidades ativas, as quais foram estabilizadas na presença de sulfato de amônio. A enzima demonstrou ser muito sensível aos processos de refrigeração, liofilização e diálise. Assim, também é a enzima sensível a vários íons inorgânicos e solventes orgânicos, o que torna a purificação difícil e o armazenamento e conservação um problema.



Em 1968, Ludwig Biermann e Morton D. Glantz (10) estudaram o isolamento e caracterização da  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces lactis*. A enzima foi purificada 78,6 vezes por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de Sephadex G-100 e DEAE-Sephadex A-50. A enzima purificada demonstrou pH ótimo de 7,2 e concentração ótima de íons magnésio igual a 2 mM por ml. A constante de Michaelis foi determinada ser 1,18 mM usando DNPG como substrato.

Norton S. Rosensweig, em 1968 (80) estudou a intolerância ao leite e deficiência de lactase em adultos, observando que as manifestações clínicas em indivíduos deficientes em lactase após a ingestão de um ou dois copos de leite são: inchaço abdominal, cólicas e frequentemente diarreia. Os sintomas podem ser insidiosos ou explosivos e geralmente ocorrem após 1/2 a 3 horas de ingestão. Observa-se que nos casos onde haja necessidade de grandes quantidades de leite a ser ingerido, pacientes com deficiências de lactase devem consumir produtos onde a lactose presente tenha sido fermentada para ácido lático ou ingerir leite previamente tratado com enzima lactase.

Em 1969, O.M.P. Bahl e K.M.L. Agrawal (7) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus niger*. O pH ótimo da enzima está entre 3,2 e 4,0; pH de estabilidade de 2,8 a 3,9. A constante de Michaelis é de valor  $20,0 \times 10^{-4}$  M, velocidade máxima de 55,5  $\mu$  moles ONP / minuto / miligrama.

Em 1970, Robert P. Erickson e Edward Steers (28) estudaram a  $\beta$ -galactosidase em extratos brutos de *Escherichia coli* 3.300, em

meio de selênio e enxofre, verificando a formação de isoenzima. As diferentes isoenzimas eram determinadas pelo gen estrutural da  $\beta$ -galactosidase e não pelo citoplasma dentro do qual a  $\beta$ -galactosidase era formada. Em adição,  $\beta$ -galactosidase de cepas que formam isoenzimas foram mais estáveis ao calor e tratamento com uréia do que a enzima formada por organismos que produzem quantidades reduzidas ou nenhuma de isoenzima.

Frank G. Lootiens et al, em 1970 (41) verificaram o efeito que reagentes sulfidrilas (O-mercurifenil- $\beta$ -D-galactosídeo cloreto) sobre a  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* K 12, para constatação de que cisteína participa no mecanismo catalítico da enzima. Foi verificado que O-mercurifenil- $\beta$ -D-galactosídeo cloreto não pode ser considerado como um reagente direto para o sítio ativo da enzima. O composto é enzimaticamente hidrolisado e seu produto de reação, que é o cloreto de O-mercurifenila, é mais efetivo inibidor que o galactosídeo. Entretanto, alguns grupos sulfidrilas parecem estar indiretamente envolvidos na função enzimática. É evidente que sua modificação resultando em inativação não reduz significativamente a ligação com substrato no tetrâmero e que nenhum grupo SH (sufidril) está envolvido no mecanismo catalítico próprio.

Em 1971, W.L. Wendorff e C.H. Amundson (72) fizeram a caracterização de  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces fragilis*, verificando que a enzima foi estável a pH 6,0 e 7,0. Quando refrigerada em solução tampão foi estável por mais de 3 meses, porém a 51 °C perde 96 % de sua atividade em 10 minutos. O pH ótimo para hidrólise de lactose a 37 °C foi 6,5. A enzima foi ativada por íons potássio, enquanto manganês serve como cofator para a enzima.

Manganês parece ser importante para manter a integridade da estrutura secundária e terciária da molécula enzimática. A  $\beta$ -galactosidase desta levedura parece ser uma enzima sulfidrílica porque metais pesados, p-cloro mercuribenzoato, iodoacetato inibem a enzima. Cisteína e galactose foram inibidores competitivos da enzima enquanto glicose e várias aminas foram inibidores não competitivos.

O comportamento cromatográfico de  $\beta$ -galactosidase de uma cepa constitutiva *Escherichia coli* K 12 foi estudado por E. Steers et al em 1971 (64), com derivados de agarose e poliacrilamida, o qual continha o inibidor análogo ao substrato, p-aminofenil- $\beta$ -D - tiogalactopiranosídeo covalentemente ligado de diversas maneiras. A atividade específica da enzima estava ao redor de 300.000 a 320.000 unidades por mg. A enzima permanece ativa enquanto ligada à coluna e pode ser reabsorvida e eluída sem aparente efeito deletério.

W.L. Wendorff, C. Amundson, N.F. Olson, J.C. Garver, em 1971 (73) relataram o uso de  $\beta$ -galactosidase de levedura em leite e derivados. Dos produtos testados, soro de leite foi o melhor substrato para a enzima de levedura. Manganês e potássio tinham que ser adicionados aos produtos para promover a máxima hidrólise e conferir um sistema enzimático estável. Resultados deste estudo indicam que porções de lactose em leite e soro podem ser hidrolisados promovendo o aumento da "doçura" e estabilidade. Com a adição destes produtos modificados menos açúcar poderá ser adicionado, fornecendo substancial economia de custos.

Posteriormente, Gerald B. Borglum e M. Sternberg, em 1972 (12), estudaram as propriedades de lactase fúngica. Salientam que a combinação de alta temperatura e baixo pH requeridos para ótima atividade da  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus foetidus* elimina ou minimiza a contaminação microbiana durante o processamento. Esta enzima não tem requerimento para íons metálicos no que se refere à atividade ou estabilidade. A enzima foi inibida por íons mercúrios sugerindo que grupos sulfidrila são necessários para atividade ou integridade enzimática. A enzima apresenta pH ótimo de 3,5 a 4,0 na temperatura de 60 °C, usando lactose como substrato. Na mesma temperatura com ONPG como substrato o pH ótimo foi de 3,5 a 4,5.

L.E. Wierzbicki e F.V. Kosikowski, em 1973 (74) verificaram o potencial de lactase de vários microrganismos que crescem em soro de leite. Observaram que fungos têm a mais baixa atividade, mas confere maior número de células. A atividade da enzima de levedura e bactérias aumentam cerca de 34 % com tratamento de congelamento e posterior ruptura celular.

Willian G. Engel, em 1973 (26) estudou o uso de lactase para adoçar iogurte sem aumentar calorias. A lactase utilizada é a produzida por *Saccharomyces lactis*. O objetivo foi verificar se há possibilidade de maior aceitação do iogurte se a "doçura" for aumentada. Para isto, submeteu-se a um grupo de provadores, iogurte onde a lactose tenha sido enzimaticamente hidrolisada para glicose e galactose em vários graus, para depois ser adicionada à cultura do iogurte. Os resultados indicam uma boa aceitação em iogurtes que possuem 50 % do seu teor de lactose hidrolisada.

Em 1973, A.G. Rand e P.M. Linklater (55) estudaram a utilização de  $\beta$ -galactosidase de várias fontes para redução do teor de lactose de leite e derivados, pois além da utilização destes produtos por pessoas deficientes na enzima  $\beta$ -galactosidase (lactase), seriam evitados os problemas de baixa solubilidade e falta de "doçura" da lactose numa variedade de produtos derivados do leite. Comparando as fontes enzimáticas, quando o substrato é lactose, verificou-se que as lactases de origem bacteriana têm maior atividade a 37 °C e pH 6,5. Em comparação, a lactase fúngica opera eficientemente a 63 °C, que é a temperatura de pasteurização do leite.

J.H. Woychik e M.V. Wondolowski em 1973 (75) utilizaram a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus niger* imobilizada em esferas porosas de vidro com glutaraldeído. Verificaram a aplicabilidade desta enzima para hidrolisar lactose em leite e derivados. Lactose em soro "doce" e leite integral foi hidrolisada a aproximadamente 1/3 da taxa de hidrólise em soro ácido. A enzima imobilizada tem a mesma propriedade funcional e estabilidade da enzima solúvel, retendo aproximadamente 75 % de sua atividade original. O pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 55 °C oferecem a vantagem de operações sem perigo de contaminação microbiana.

G.O. Hustad et al, em 1973 (35) estudaram as aplicações e propriedades da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* K 12 imobilizada com polisocianato. O Km para enzima solúvel é de 13,1 mM e 22,1 mM para enzima imobilizada a pH 6,5.

F. Morisi et al, em 1973 (47) fizeram estudo comparativo da lactase livre e imobilizada de *Escherichia coli* e levedura .

A  $\beta$ -galactosidase bacteriana tem pH ótimo de 6,6 a 7,5 e a levedura de 6,0 a 7,0. As propriedades da  $\beta$ -galactosidase imobilizada - indicam uma potencial aplicação em reduzir o teor de lactose no leite.

Mais tarde, em 1974, Steven G. Sorensen e Eli V. Crisan (63) estudaram a  $\beta$ -galactosidase do fungo termófilo *Mucor pusillus*. Esta enzima exibe termoestabilidade não usual, pois perde somente 27 % de sua atividade após 1 hora a 60 °C e retém mais de 60 % de sua atividade após 2 horas nesta temperatura. O baixo pH ótimo (4,0 - 4,5) torna esta enzima bastante utilizável para redução do teor de lactose em soro de leite.

L.C. Blankenship e P.A. Awells em 1974 (11) estudaram a aplicação de  $\beta$ -galactosidase microbiana de pH ótimo próximo à neutralidade. Foi verificado que geralmente, enzima de levedura é mais susceptível à inibição por galactose que enzimas bacterianas. Entretanto, galactosidases são geralmente de origem intra-celular. A maioria das enzimas estudadas foram essencialmente inativadas quando aquecidas por 10 minutos a 45 °C, ressaltando-se que a aplicação comercial da  $\beta$ -galactosidase para leite e derivados, de pH próximo à neutralidade, requer boa estabilidade térmica. O pH ótimo de todas as enzimas estudadas situa-se ao redor de 6,8.

F.A.M. Bouvy, em 1975 (13) relatou as aplicações para soro de leite tratado com lactase. Para relatar a importância industrial do uso de lactase, foram revistos os efeitos físicos e químicos da lactose hidrolisada. Assim, foi considerada de grande interesse industrial a hidrólise da lactose, pois permite aumento da solubi-

lidade, previne cristalização da lactose, aumento da pressão osmótica, baixa viscosidade, aumento da "doçura" e diminuição do peso molecular.

Mais tarde, em 1975, E.R. Goodenough e D.H. Kleyn (29) verificaram a influência da microflora do iogurte na digestão da lactose pelo rato. Os dados demonstram a importância do prolongado consumo de lactose e microflora do iogurte para aumentar a digestão da lactose. Apesar deste experimento ser restrito a ratos, parece ser razoável que similar aumento da digestão da lactose pode ser esperado em seres humanos. Foi observado também que a atividade da lactase intestinal dos animais alimentados com iogurte foi maior do que dos outros animais alimentados com outras dietas, inclusive iogurte pasteurizado.

Em 1975, Y. Tanaka et al. (65) purificaram  $\beta$ -galactosidase de uma cultura de *Aspergillus oryzae* por fracionamento com propanol e estudaram suas propriedades. O pH ótimo da enzima para ONPG como substrato é 4,5, para lactose como substrato é 4,8. O peso molecular foi calculado ser ao redor de 105 000 por filtração em gel Sephadex.

A. Kilara e K.M. Shahani, em 1975 (37) estandarizaram um método para determinar a atividade de lactase em produtos derivados do leite, fermentados e acidificados como soro de leite e iogurte. Foi verificado que a  $\beta$ -galactosidase no iogurte aumenta com o tempo de incubação durante seu preparo, alcançando um máximo de 8 unidades ( $\mu$  moles ONP / min / g de iogurte) em 4 horas de incubação. Assim, iogurte culturado poderia ser benéfico para indivíduos

que sofrem de intolerância à lactose, não somente por causa do teor reduzido de lactose mas também por causa da lactase presente.

Posteriormente, em 1976, Herbert L. Ennis e Katharine D. Kievitt fazendo estudos com  $\beta$ -galactosidase bacteriana (*E. coli* B 207), verificaram que a bactéria acumula RNA no curso de inibição da síntese protéica e que sua habilidade para sintetizar  $\beta$ -galactosidase durante subsequente liberação da síntese protéica é muitas vezes aumentada.

Mais tarde, em 1978, Takahiro Toba e Susumu Adachi (67) relataram a formação de oligossacarídeos na hidrólise de lactose por lactases microbianas. A transgalactosidação da lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces fragilis* e *Aspergillus niger* foi examinada. Verificaram que com a  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces fragilis* 12 oligossacarídeos foram detectados em cromatogramas de papel. Com a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus niger*, 10 oligossacarídeos formados foram explorados por cromatografia líquido-gasosa de seus derivados metilados.

Em 1978, J. Guy e E.W. Bingham (31) relataram as propriedades de  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces lactis* em leite e derivados como agente de conversão de lactose em monossacarídeos. Observaram que o pH ótimo para hidrólise é 6,5. Aquecendo-se lactase por 1 minuto a 60 °C resulta em 97 % de inativação, sendo esta completa a 70 °C. Foi verificado que os íons potássio, magnésio e manganês aceleram brandamente a atividade catalítica da enzima, enquanto que os íons sódio e cálcio inibem a reação significativamente.



Martin Okos et al. em 1978 (50) estudaram a hidrólise de lactose presente em soro ácido usando  $\beta$ -galactosidase adsorvida em resina fenólica. O processo foi realizado a 40 °C e a pH 4,0, obtendo-se que a adsorção tem pouco efeito na atividade enzimática, sendo portanto um método econômico para hidrolisar lactose no soro.

R.R. Mahoney e J.R. Wtaker, em 1978 (43) purificaram e estudaram a  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces fragilis*. A purificação da enzima foi feita a partir de extratos de precipitação por acetona, sendo realizado cromatografia em hidroxapatita e DEAE - Sephadex A-50. O peso molecular foi determinado ser 20 000. A composição de aminoácidos foi completamente diferente da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli*.

Posteriormente, em 1979, Y.K. Park, M.S.Santi e G.M. Pastore (51) produziram e caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, estabelecendo suas propriedades. Verificaram que a temperatura ótima da enzima purificada é 50 °C, e constante de Michaelis é 0,77 mM para ONPG e 50 mM para lactose. Foi observado que íons metálicos e reagentes sulfidrílicos não têm efeito na atividade enzimática. Foi constatado também que galactose inibia competitivamente a atividade enzimática enquanto glicose não inibia. O peso molecular foi estimado ser 90 000 por filtração em gel de Sephadex G-200.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase

Com o objetivo de selecionar microrganismos capazes de produzir  $\beta$ -galactosidase, foram isoladas do solo e testadas inúmeras culturas de microrganismos, conforme os itens a seguir.

##### 3.1.1 Coleta de amostra do solo

As amostras de terra de diferentes regiões do estado de São Paulo, Mato Grosso, Paraíba, Rio Grande do Sul, Pará foram coletadas próximas às margens dos rios ou do interior de matas cerradas, onde as condições ambientais são bastante favoráveis ao crescimento de microrganismos. Após remoção dos resíduos vegetais e animais, cerca de 100 g de terra foram coletadas de uma profundidade máxima de 5 cm e acondicionadas em sacos plásticos. Na coleta de várias amostras de uma mesma região foi guardada uma distância mínima de um quilômetro entre as coletas.

##### 3.1.2 Isolamento de microrganismos do solo

Cerca de 1 grama de terra foi adicionada a 100 ml de água deionizada esterilizada, agitada e deixada em repouso. O líquido sobrenadante foi inoculado em placas de Petri, contendo meio de cultura esterilizado de agar batata contendo extrato de 10 g de batata, 4 g de glicose e 5 g de agar em 100 ml de água deionizada. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 a 96 horas para o desenvolvimento de fungos. As colônias isoladas das placas foram repicadas em tubo de ensaio contendo agar batata esterilizados e

incubados a 30 °C até desenvolvimento satisfatório das culturas. Os microrganismos isolados foram testados preliminarmente quanto à produção de  $\beta$ -galactosidase através do teste descrito a seguir.

### 3.1.3 Seleção preliminar de microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase

Os fungos isolados de acordo com o item 3.1.2 foram inoculados em frascos erlenmeyer de 500 ml, contendo 20 g de meio de cultura semi-sólido, composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1, esterilizados. Os erlenmeyers foram incubados a 30 °C por 72 a 115 horas, até o desenvolvimento satisfatório dos fungos. Após a incubação, foram adicionados aos erlenmeyers 200 ml de água deionizada, feita a trituração com bastão de vidro e deixado em repouso por 1 hora, com a finalidade de se extrair a enzima possivelmente formada. Após a agitação, filtrou-se o conteúdo do erlenmeyer e a atividade de enzima foi determinada no filtrado, de acordo com o item 3.2.

### 3.1.4 Seleção de microrganismo melhor produtor de enzima

Para a seleção de linhagem de fungo melhor produtora de  $\beta$ -galactosidase, os fungos selecionados de acordo com o item anterior foram cultivados em meio semi-sólido, como descrito acima, e no filtrado determinou-se a atividade de  $\beta$ -galactosidase. Neste filtrado determinou-se também atividade proteolítica adicionando-se 1 ml do filtrado a 50 ml de caseína a 2 %. Verificou-se ainda no filtrado o tempo de coagulação da proteína do leite, utilizando-se 1 ml do filtrado e 5 ml de uma solução de leite desnatado em

pó a 10 % preparado com solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,01 %.

### 3.2 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase

A atividade de  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23  $\beta$ -D-galactosídeo galactohidrolase) foi medida usando-se substratos: O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) e lactose.

#### 3.2.1 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase com substrato O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG)

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida adicionando-se a 4 ml do substrato ONPG 0,25 % em tampão acetato de sódio 0,1 M de pH 5,1 ml de solução enzimática de concentração apropriada. A mistura foi incubada a 60 °C por 15 minutos. Após a incubação, 1 ml da mistura foi adicionada a 1 ml de solução 10 % de carbonato de sódio e diluída para 10 ml com água deionizada. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro Coleman 295 E, a 420 nm, contra branco de tempo zero de reação.

Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberará 1  $\mu$  mol de ortonitrofenol (ONP) por minuto, sob as condições descritas acima.

#### 3.2.2 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase com substrato lactose

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida adicionando-se a 4 ml de solução a 1 % de lactose em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5, pré-incubados a 55 °C, 1 ml de solução enzimática de concen

tração adequada. A mistura foi incubada a 55 °C por 15 minutos. Após a incubação, a quantidade de glicose liberada devido à hidrólise da lactose foi determinada pelo sistema enzimático glicose-oxidase-peroxidase e reativo cromogênico, como descrito por Dahlquist (23).

### 3.3 Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima

A fermentação do *Scopulariopsis sp* para produção de β-galactosidase foi realizada de acordo com dois tipos de fermentação : semi-sólida e submersa.

#### 3.3.1 Preparação da suspensão de esporos para fermentação submersa e semi-sólida do *Scopulariopsis sp*

A suspensão de esporos foi preparada incubando-se a linhagem selecionada por uma semana a 30 °C, em tubos inclinados de Sabouraud dextrose agar. Após a incubação, foram adicionados aos tubos de cultivo 10 ml de água deionizada esterilizada e a superfície do tubo inclinado foi gentilmente tocada com alça de níquel-cromo estéril.

#### 3.3.2 Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida foi realizada inoculando-se 1 ml da suspensão de esporos, preparada de acordo com o item 3.3.1, em frascos erlenmeyer de 500 ml, contendo 20 g de meio de cultura semi-sólida contendo partes iguais de farelo de trigo e água deionizada, previamente esterilizados. Os frascos erlenmeyer foram incubados a 30 °C. As amostras do meio de cultura foram reti-

radas em diferentes tempos de fermentação para a determinação dos parâmetros: alteração do pH do meio de cultura e determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, a qual foi realizada de acordo com o item 3.2.1.

### 3.3.3 Fermentação submersa

Para a fermentação submersa foi utilizado o meio de cultura líquido contendo 4 % de amido, 1,5 % de peptona, 1,0 % de levedura extrato, 1 % de fosfato diácido de sódio e 0,2 % de nitrato de sódio, pH 5,4. Em frascos erlenmeyer de 250 ml foram colocados 50 ml do meio de cultura acima descrita e esterilizados, sendo posteriormente inoculados com 1 ml da suspensão de esporos preparada de acordo com o item 3.3.1. Os frascos foram incubados a 30 °C com agitação constante de 250 rpm. As amostras do meio de cultura foram retiradas a diferentes tempos de incubação e determinadas alteração do pH do meio, e atividade de  $\beta$ -galactosidase. Para estas determinações filtrou-se a mistura contida nos frascos em papel Whatman nº 1, obtendo-se o filtrado.

### 3.4 Efeito da adição de lactose no meio de cultura

Para o estudo do efeito da adição de lactose no meio de cultura, foram preparados os meios de cultura semi-sólido e submerso como descritos nos itens 3.3.2 e 3.3.3, aos quais se adicionou 1 % de lactose.

### 3.5 Produção de $\beta$ -galactosidase bruta, em pó

Para a produção de  $\beta$ -galactosidase, o fungo isolado *Scopula* -

*riopsis sp* foi cultivado em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 20 g de meio de cultura semi-sólida (processo de Koji). Os frascos esterilizados foram inoculados em 1 ml da suspensão de esporos preparada de acordo com o item 3.3.1, e incubados por 115 horas a 30 °C. Após a incubação, foram adicionados aos frascos 200 ml de água deionizada e o conteúdo foi triturado com auxílio de um bastão de vidro, para liberação da enzima. A mistura foi filtrada em papel Whatman nº 1 para obtenção do filtrado. A enzima foi concentrada por precipitação com álcool etílico a 70 % (v/v), sendo a operação mantida à temperatura de 4 °C. A enzima precipitada foi seca e pulverizada, sendo denominada preparação bruta de  $\beta$ -galactosidase.

### 3.6 Purificação da $\beta$ -galactosidase

A  $\beta$ -galactosidase bruta que foi produzida de acordo com o item 3.5 foi purificada usando-se fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose.

#### 3.6.1 Fracionamento com sulfato de amônio

Para a purificação da enzima, 2 g de enzima bruta, contendo 0,32 g de proteína, foram suspensas em 300 ml de água deionizada e a mistura foi centrifugada a 20 000 x G por 10 minutos a 5 °C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi saturado a 80 % com sulfato de amônio. A mistura foi deixada em repouso por uma noite a 5 °C, sendo depois centrifugada a 20 000 x G por 10 minutos, reservando-se o precipitado. O precipitado obtido foi dissolvido em 20 ml de água deionizada, sendo posteriormente dialisado

contra água deionizada em membrana de colágeno por 48 horas a 5 °C. A amostra dialisada foi reservada para posterior aplicação em coluna de DEAE-celulose.

### 3.6.2 Cromatografia de $\beta$ -galactosidase em coluna de DEAE-celulose

Para realizar a cromatografia em coluna de DEAE-celulose, 40 g de DEAE-celulose (dietilaminoetil-celulose), foram misturados a 500 ml de NaOH 1 N sendo posteriormente filtrados em lã de vidro e lavados com água deionizada para remoção do NaOH. A seguir a resina foi tratada com 500 ml de HCl 1 N e lavada com água deionizada para retirada do HCl, sendo finalmente misturada a certa quantidade de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5, para equilíbrio da resina.

A enzima preparada de acordo com o item 3.6.1 foi aplicada em coluna de DEAE-celulose de 3 cm de diâmetro x 40 cm de comprimento e eluída através da coluna pela adição de solução de NaCl em gradiente de concentração, variando-se de 0,1 a 1 M, consecutivamente.

As frações de 5 ml foram coletadas a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman modelo 124 D. A atividade de  $\beta$ -galactosidase das frações foi determinada de acordo com o item 3.2.1. As frações que apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase foram reunidas e dialisadas contra tampão acetato de sódio de concentração 0,05 M, em membrana de colágeno por 24 horas. A concentração de proteínas das preparações enzimáticas foi determinada de acordo com o item 3.7.



### 3.6.3 Cromatografia em coluna de CM-celulose

Tratou-se previamente 10 g. de CM-celulose (carboximetil-celulose) com 500 ml de NaOH 0,5 N e lavou-se com água deionizada para remoção do NaOH. A seguir tratou-se com 500 ml de HCl 0,5 N , procedendo-se à lavagem com água deionizada para remoção do HCl e finalmente equilibrou-se com tampão acetato 0,4 M e pH 5. A solução enzimática obtida no item 3.6.3 foi aplicada em coluna de CM-celulose de 3,0 cm de diâmetro x 40 cm de comprimento e eluída da coluna por gradiente de concentração com solução de NaCl (0,1 M a 1 M). As frações de 5 ml foram recolhidas a cada 30 minutos, sendo o curso de eluição das proteínas da coluna seguido pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Coleman modelo 124 D. A atividade enzimática de  $\beta$ -Galactosidase foi determinada de acordo com o item 3.2.1 .

As frações que apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase foram reunidas e dialisadas contra água deionizada por 24 horas em membrana de celofane e liofilizada.

### 3.7 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína presente na enzima purificada foi determinada de acordo com o método de Lowry (42), sendo a albumina de soro bovina usada como padrão de proteína.

### 3.8 Caracterização da $\beta$ -galactosidase purificada

A  $\beta$ -galactosidase purificada de acordo com o procedimento descrito no item 3.6 foi utilizada para o estudo de caracterização da

$\beta$ -galactosidase.

### 3.8.1 Efeito do pH na atividade enzimática

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática, foram preparados tubos de ensaio contendo 4 ml de solução de ONPG 0,25 % dissolvidos em diversos tampões, aos quais foram adicionados 1 ml de solução enzimática contendo 0,5 unidade de atividade. Os tampões foram usados dentro do limite de sua capacidade tamponante, acetato de sódio pH 3,6 a 5,6, fosfato de sódio pH 6,0 a 8,0 e borato-borax pH 8,2 a 9, todos os sistemas tampão foram usados na concentração de 0,1 M.

As misturas de substrato ONPG e solução de enzima foram incubadas a 60 °C em banho-maria por 15 minutos. Após a incubação a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com o item descrito em 3.2.1, sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

Foi verificado também o efeito do pH na atividade enzimática utilizando-se como substrato solução a 1 % de lactose, dissolvida em diversos sistemas tampão descritos acima. Para este estudo misturou-se 4 ml da solução de lactose com 1 ml de solução enzimática contendo 0,5 unidade de atividade. A mistura foi incubada a 60 °C em banho-maria por 15 minutos. Após a incubação, a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada pela quantidade de glicose liberada segundo o item 3.2.2.

### 3.8.2 Efeito do pH na estabilidade da enzima

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade da enzima, foram

tomados 2 ml de solução enzimática contendo 4 unidades de atividade, aos quais foram misturados 2 ml de solução tampão na concentração de 0,1 M de diferentes valores de pH, assim permanecendo por 24 horas à temperatura ambiente. Foram utilizados os seguintes sistemas tampão: acetato de sódio de pH 3,6 a 5,6; fosfato de sódio pH 6,0 a 8,0, borato-bórax de pH 8,2 a 9,0. Após a incubação 1 ml desta mistura foi retirada e medida sua atividade segundo o método descrito em 3.2.1.

### 3.8.3 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da enzima, incubou-se 1 ml de solução de enzima contendo 0,25 unidade de atividade a 60, 65 e 70 °C por diversas horas. Ao final da incubação foi adicionado a cada tubo 4 ml de solução de ONPG a 0,25 % em tampão acetato de sódio 0,1 M de pH 5 e foi determinada a atividade residual de acordo com o item 3.2.1 .

### 3.8.4 Efeito da temperatura na atividade da enzima

Para verificação do efeito de temperatura na atividade enzimática o sistema de reação foi constituído de 4 ml de substrato ONPG 0,25 % em solução 0,1 M de tampão acetato de sódio pH 5, ao qual se adicionou 1 ml de solução de enzima contendo 0,5 unidade de atividade. A mistura foi incubada a diferentes temperaturas entre 35 a 85 °C, durante 15 minutos. A atividade de  $\beta$ -galactosidase - foi determinada segundo as condições descritas no item 3.2.1 .

Para verificação do efeito da temperatura na atividade enzimática utilizou-se também lactose como substrato. O sistema de reação

constituiu-se de 4 ml de solução de lactose a 1 % dissolvida em tampão acetato de sódio de concentração 0,1 M e pH 5. A mistura foi incubada a diferentes temperaturas entre 35 a 85 °C durante 15 minutos. A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada medindo-se a quantidade de glicose liberada pelo método descrito em 3.2.2 .

### 3.8.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado levando-se em consideração a concentração dos sais de tal forma a não ocorrer interferência com o método de determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, como descrito no item 3.2.1. O sistema de reação foi constituído de 2 ml do substrato ONPG de concentração 0,4 %, dissolvido em tampão acetato de sódio 0,1 M de pH 5, acrescentando-se 1 ml de solução enzimática contendo 0,25 unidade de atividade, 1 ml de solução dos seguintes sais :  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $NiSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $KCl$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $AgNO_3$  , nas concentrações de 0,01 M a 0,001 M, sendo esta faixa de concentração em relação ao volume final da mistura. Após 15 minutos de incubação a 60 °C a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com as condições descritas no item 3.2.1 .

### 3.8.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática

Para a determinação do efeito de inibidores na atividade enzimática, a mistura de reação foi formada por 2 ml do substrato ONPG a 0,4 % dissolvidos em tampão acetato de sódio a 0,2 M pH 5 , 1 ml de solução de enzima contendo 0,25 unidade de atividade ,

1 ml de solução de um dos seguintes reagentes nas respectivas concentrações: p-hidroximercuribenzoato de sódio, iodoacetato, bissulfito de sódio, cisteína, mercaptoetanol, dietilditiocarbamato de sódio, na concentração necessária para 10 mM em relação ao volume final da mistura de reação. Foram também utilizadas as glicose e galactose em concentração adequada para se verificar seu efeito inibitório. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.1.

### 3.8.7 Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática o sistema de reação foi constituído de 1 ml de solução enzimática contendo 37 ug de proteína e 0,19 unidade de atividade, 4 ml de substrato ONPG de concentração variável entre 0,06 mM a 10 mM, dissolvido em tampão acetato de sódio 0,1 M de pH. As misturas foram incubadas durante 15 minutos a 60 °C e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.1. A constante de Michaelis - Menten (Km) e a velocidade máxima (Vmáx.) foram determinadas segundo o método gráfico de Lineweaver-Burk (40).

O efeito da concentração do substrato foi também verificado para o substrato lactose. A mistura de reação foi constituída de 4 ml de solução de lactose dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5, em concentração variável entre 2 mM a 500 mM, aos quais foram adicionados 1 ml de solução enzimática contendo 74 ug de proteína e 0,38 unidades de atividade. As misturas foram incubadas por 15 minutos a 55 °C e a atividade enzimática determinada segundo o método descrito no item 3.2.2. A constante de Michaelis - Menten e a velocidade máxima foram determinadas segundo o método

de Lineweaver - Burk (40).

### 3.8.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A solução de  $\beta$ -galactosidase contendo 12,5  $\mu$ g de proteína por ml purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.6, foi utilizada para a eletroforese em gel de poliacrilamida.

A gel eletroforese foi desenvolvida modificando-se o método de Davis (25). O aparelho utilizado para a eletroforese consiste de uma fonte estabilizadora marca FANEM modelo 1050, tubos de vidro de 0,5 cm x 8 cm, suporte para cubas, duas cubas de acrílico de 14 x 14 cm de base por 7 cm de altura, cada qual com 1 eletrodo na posição central. A cuba superior apresenta 8 perfurações ao redor do eletrodo para o encaixe dos respectivos tubos.

O gel foi preparado pela mistura de 2,5 g de Cyanogum (95 % de poliacrilamida e 5 % de N, N, N' metilenebisacrilamida), 25 ml de tampão fosfato de sódio à concentração de 0,05 M pH 8,0, 25 mg de persulfato de amônio, 20  $\mu$ l de N, N, N' tetrametilediamina. Aplicou-se 10  $\mu$ l de azul de bromofenol a 0,1 % e 30  $\mu$ l de amostra no topo do gel e 40  $\mu$ l de sacarose a 40 %. A eletroforese foi desenvolvida pela aplicação de uma corrente de 6 mA por gel, à temperatura ambiente de 26 °C - 28 °C, por 3 horas. Após a corrida parte dos géis foi removida dos tubos de eletroforese, incubada em solução de ONPG dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 M de pH 0,5 por 10 minutos. Os géis foram retirados dos tubos de incubação e colocados em tubo de ensaio contendo 10 ml de solução de carbonato de sódio a 10 %.

A outra parte dos géis foi colocada em tubo de ensaio contendo ácido tricloroacético de concentração 50 %, permanecendo nesta solução por 24 horas. Após o tempo, os géis são colocados em corante azul de comassie dissolvido em ácido tricloroacético 20 % permanecendo nesta solução cerca de 2 horas.

Após a coloração os géis foram transferidos para placas de Petri que continham ácido acético a 7 % para descoloração.

### 3.8.9 Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS (sódio dodecyl sulfato) gel de poliacrilamida

Este procedimento foi desenvolvido modificando-se o método de Weber e Osborn (71). A 0,25 ml de solução da enzima purificada - contendo 2,0 mg de proteína foi adicionado 2,5 ml de solução de SDS contendo 1 % de mercaptoetanol. A mistura foi incubada a 37 °C por uma noite. Os géis foram preparados juntando-se 15 ml de tampão fosfato preparado com 7,8 g de fosfato diácido de sódio e 20,4 g de fosfato monoácido de sódio, 2 g de SDS dissolvidos em 1 litro de água deionizada. Adicionou-se 13,5 ml de solução de acrilamida composta de 11,1 g de acrilamida, 0,3 g de metilenobisacrilamida dissolvidos em 50 ml de água deionizada, adicionou-se ainda 1,5 ml de solução de persulfato de amônio contendo 300 mg de persulfato de amônio em 20 ml de água deionizada e finalmente juntou-se 10 µl de N, N, N', N' tetrametilenodiamina.

Após o endurecimento dos géis aplicou-se no topo 10 µl de azul de bromofenol a 0,1 %, 60 µl da solução da enzima e 40 µl de sacarose de concentração a 40 %. As cubas eletroforéticas foram preenchidas com tampão fosfato descrito acima, diluído a 50 % com

água deionizada. Foi aplicada uma corrente de 6 mA por gel à temperatura ambiente por 3 horas.

Após a eletroforese os géis foram removidos dos tubos, medindo - se o comprimento do gel e a distância percorrida pelo corante azul de bromofenol. Os géis permaneceram por 1 noite em solução de ácido tricloroacético a 50 %, submetendo-se à coloração e descoloração como descrito no item 2.7. Após a descoloração foram feitas as medidas de comprimento do gel e a distância de migração da proteína. Com estas medidas e com as medidas colhidas antes da coloração será calculada a mobilidade da proteína em questão.

### 3.9 Estudo da ação da $\beta$ -galactosidase em soro de leite

Para verificação da ação da enzima  $\beta$ -galactosidase em soro de leite, estudou-se o grau de hidrólise da lactose de acordo com os itens descritos a seguir.

#### 3.9.1 Preparação do soro de leite

Para utilização do soro de leite como substrato, precipitou - se leite fresco com HCl. A caseína coagulada a pH 4,5 foi removida por filtração.

#### 3.9.2 Determinação do teor de lactose presente no soro

A concentração de lactose presente no soro foi determinada pelo método descrito em AOAC, 1985 (4).



### 3.9.3 Determinação da temperatura ótima para hidrólise da lactose em soro de leite pela $\beta$ -galactosidase

Para verificação da melhor temperatura para ação da enzima em soro, uma mistura de 100 ml de soro (5,26 % de lactose) e 100 unidades de enzima bruta foi incubada a várias temperaturas. Periodicamente, amostras foram coletadas e as quantidades de glicose liberadas foram medidas de acordo com o item 3.2.2.

### 3.9.4 Efeito da concentração enzimática na hidrólise da lactose presente no soro

Para verificar o efeito da concentração enzimática na hidrólise da lactose presente no soro, colocou-se em incubação uma mistura de 100 ml de soro e várias quantidades da preparação enzimática com 90, 150, 200 e 250 unidades, respectivamente, a 55 °C por 50 horas; amostras foram coletadas e a quantidade de glicose liberada foi determinada de acordo com o item 3.2.2.

### 3.10 Cromatografia ascendente em papel dos produtos de hidrólise da lactose

Para detecção dos produtos formados na hidrólise da lactose presente no soro, pela  $\beta$ -galactosidase, utilizou-se papel Whatman nº 1 para cromatografia, de dimensões 18 cm de largura por 44 cm de comprimento. Neste papel foram aplicadas as misturas dos itens 3.9.3 e 3.9.4. O sistema de solventes utilizado para cromatografia foi n-butanol : piridina : água na proporção 6:4:3 (v/v, respectivamente). O tempo de desenvolvimento do cromatograma

tograma foi de 24 horas, à temperatura ambiente. Como açúcares padrões foram utilizados solução de 1 % de glicose e solução a 1 % de lactose. O cromatograma foi revelado pela aplicação de anilina-ftalato.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Seleção de microrganismos

#### 4.1.1 Seleção preliminar de microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase

Após o isolamento de 1 067 linhagens de microrganismos do solo, foram selecionados preliminarmente 5 fungos que apresentaram alta atividade de  $\beta$ -galactosidase, com relação ao teste descrito em 3.1.3. A Tabela 1 indica a atividade de  $\beta$ -galactosidase a pH 5 e pH 6,5, respectivamente. As linhagens selecionadas produzem  $\beta$ -galactosidase extra-celularmente.

#### 4.1.2 Seleção do microrganismo melhor produtor da $\beta$ -galactosidase

A linhagem de fungo de número 246 produz maior atividade de  $\beta$ -galactosidase tanto em pH 5 como em pH 6,5, como demonstrado na Tabela anterior. Foi verificado também que o filtrado obtido com esta linhagem não apresenta atividade proteolítica, cujo teste foi realizado de acordo com o item 3.1.4, sendo escolhida para produção de  $\beta$ -galactosidase através de fermentação semi-sólida e submersa. Esta linhagem de fungo que produz  $\beta$ -galactosidase foi identificada como *Scopulariopsis sp.* A Figura 1 mostra a microfotografia do microrganismo.

Este microrganismo foi solicitado por American Type Culture Collection (A.T.C.C.), para depósito em sua coleção. Foi registrado com o número A.T.C.C. 44 206.

#### 4.2 Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima

Para o estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima, foram utilizados dois tipos de fermentação: semi-sólida e submersa, como descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3. A atividade de  $\beta$ -galactosidase no filtrado foi verificada em diferentes tempos de crescimento, tendo sido observado que na fermentação submersa a produção de  $\beta$ -galactosidase é incipiente e que na fermentação semi-sólida a produção máxima da enzima ocorre após 115 horas de fermentação a 30 °C. As figuras 2 e 3 ilustram os resultados obtidos.

#### 4.3 Efeito da adição da lactose no meio de cultura

Este estudo foi realizado com as fermentações semi-sólida e submersa como descritas nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Como se pode observar nas figuras 2 e 3 a adição de lactose não tem influência na produção da  $\beta$ -galactosidase, tanto na fermentação semi-sólida como submersa.

#### 4.4 Purificação da $\beta$ -galactosidase

O fluxograma para purificação da  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp* está apresentado na Figura 4 e a purificação, tendo como base mg de proteína, está apresentada na Tabela 2. Após a purificação a preparação bruta da enzima foi purificada 33,7 vezes após o fracionamento com sulfato de amônio, seguido de diálise, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose.

A Figura 5 ilustra o fracionamento obtido após a eluição das proteínas adsorvidas em DEAE-celulose com soluções de NaCl em

gradiente de concentração. A Tabela 2 indica que foi obtida uma atividade enzimática de 14,6 unidades por mg de proteína.

A Figura 6 ilustra o fracionamento obtido após a eluição das proteínas adsorvidas em CM-celulose, com soluções de NaCl em gradiente de concentração. A Tabela 2 indica que foi obtida uma purificação de 33,7 vezes e uma atividade enzimática de 141,92 - unidades por mg de proteína.

#### 4.5 Caracterização da $\beta$ -galactosidase purificada

Para a caracterização da  $\beta$ -galactosidase foram determinadas as características bioquímicas da enzima como: pH ótimo de atividade, temperatura ótima, pH e temperatura de estabilidade da enzima, efeito de sais minerais e inibidores na atividade enzimática, efeito da concentração do substrato, sendo tais medidas descritas no item 3.8 .

##### 4.5.1 Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado de acordo com o item 3.8.1, e os resultados são mostrados na Figura 7 . Como demonstrado na Figura, ocorre maior atividade na faixa de pH entre 3,6 a 5 com ONPG como substrato. Com lactose como substrato, o pH de maior atividade é 4,5.

##### 4.5.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática

O estudo referente à influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 1.7.2. A Figura 8 ilustra a

estabilidade enzimática. A enzima em estudo foi estável na faixa de pH compreendida entre 3,8 a 8,5.

#### 4.5.3 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

O estudo referente à influência da temperatura na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 1.7.3. A Figura 9 ilustra o resultado. O aquecimento da enzima a 60, 65, 70 °C, por vários intervalos de tempo, demonstra a manutenção da atividade enzimática em 80 % após 35 horas de incubação a 60 °C e a rápida queda de atividade com inativação de 92 % com 1 hora de incubação a 65 °C. Com 1 hora de incubação a 70 °C ocorreu 97 % de inativação.

#### 4.5.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinado de acordo com o item 1.7.4. A Figura 10 apresenta os resultados mostrando que a enzima apresenta maior atividade a 65 °C quando ONPG é o substrato e 55 °C, usando-se lactose como substrato.

#### 4.5.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado de acordo com o item 1.7.5. A Tabela 3 apresenta os resultados. Observou-se que a presença de  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $NiSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $KCl$ ,  $CuSO_4$ , não influi na atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase, enquanto  $AgNO_3$ , na concentração de 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação, inibe 16 % da atividade enzimática.

#### 4.5.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi verificado de acordo com o item 3.8.6, sendo os resultados ilustrados na Tabela 4. A atividade enzimática não foi influenciada pela presença de dietilditiocarbamato de sódio, bissulfito de sódio, cisteína, p-hidroxi-mercuribenzoato, mercaptoetanol ou glicose. Porém a atividade enzimática foi inibida pela presença de galactose de concentração 10 mM.

#### 4.5.7 Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

O item 3.8.7 relata como foi determinado o efeito do substrato na atividade enzimática em relação a diferentes concentrações do substrato. As figuras 11 e 12 demonstram que para ONPG como substrato os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram 0,83 mM e 8,3  $\mu$ M de o-nitrofenol (ONP) / minuto / mg de proteína, respectivamente.

Com a utilização de lactose com substrato obteve-se  $K_m$  de 16,6mM de lactose e  $V_{máx}$  de 6,6  $\mu$ moles de glicose / minuto por mg de proteína. Para obtenção de tais valores utilizou-se o método gráfico de acordo com Lineweaver e Burk (40).

#### 4.5.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.8.9. A figura 13 apresenta a eletroforese desenvolvida em gel, o qual foi submerso em ONPG, observando-se o aparecimento de uma faixa amarela que indica a presença de atividade de  $\beta$ -galactosidase. A Figura 14 apresenta

a comparação entre a faixa (banda) amarela correspondente a  $\beta$ -galactosidase e o gel apenas corado com azul de Comassie, para demonstrar a localização da proteína.

#### 4.5.9 Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS (sódio dodecyl sulfato) gel de poliacrilamida

O peso molecular da  $\beta$ -galactosidase purificada foi determinada através da eletroforese em SDS gel de poliacrilamida, segundo o método descrito em 3.8.10. A Figura 15 ilustra o resultado do experimento. O peso molecular da  $\beta$ -galactosidase foi calculado como 95 000.

#### 4.6 Estudo da ação de $\beta$ -galactosidase em soro de leite

Os resultados da hidrólise da lactose presente no soro de leite pela  $\beta$ -galactosidase são demonstrados nos itens seguintes.

##### 4.6.1 Determinação da temperatura ótima para hidrólise lactose em soro de leite pela $\beta$ -galactosidase

A determinação da temperatura ótima de hidrólise da lactose presente no soro foi realizada de acordo com o item 3.9.3, e como demonstrado na Figura 16, 87 % do teor de lactose é hidrolisado a 55 °C após 50 horas de incubação.

##### 4.6.2 Efeito da concentração da enzima na hidrólise da lactose em soro de leite

Este estudo foi realizado segundo o item 3.9.4. Como demonstrado na Figura 17, após 50 horas de incubação aproximadamente, 95 %



da lactose foi hidrolisada quando se utilizou 250 unidades de enzima.

#### 4.7 Cromatografia ascendente em papel dos produtos de hidrólise da lactose

Esta cromatografia foi preparada de acordo com o item 3.10 e a Figura 18 demonstra que a enzima hidrolisou quase totalmente a lactose presente em soro de leite para glicose e galactose, quando se utilizaram 250 unidades da enzima e 50 horas de incubação a 55 °C.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de microrganismos

Dentre os vários microrganismos isolados pela produção de  $\beta$ -galactosidase, foi verificado que muitas linhagens de fungos produzem lactase extra-celularmente, quando o experimento foi realizado segundo o item 3.1 e, de acordo com a atividade da enzima produzida, foram selecionadas 5 linhagens de fungo de um grande grupo de linhagens estudadas, como indicado nos resultados apresentados no item 4.1 e demonstrados na Tabela 1.

Dos cinco microrganismos selecionados preliminarmente pela capacidade de produção de  $\beta$ -galactosidase, foi selecionado para desenvolvimento deste trabalho o fungo *Scopulariopsis sp* como melhor produtor da enzima, pois produz  $\beta$ -galactosidase extra-celularmente e com alta atividade. O microrganismo foi solicitado por American Type Culture Collection (A.T.C.C.), sendo registrado com o número 44 206.

### 5.2 Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima

A fermentação semi-sólida do *Scopulariopsis sp*, realizada de acordo com o item 3.3.2, cujos resultados são descritos no item 4.2, levam à conclusão de que a enzima é largamente produzida em 115 horas de incubação a 30 °C. Como demonstrado no item 4.3, a adição de lactose no meio de cultura não exerce efeito sobre a produção da enzima, sendo, portanto, produzida constitutivamente.

O estudo da produção de enzima em meio submerso foi realizado de acordo com o item 3.3.3, cujos resultados são apresentados no item 4.2, revelando que a produção neste meio é extremamente baixa, utilizando-se portanto para produção de  $\beta$ -galactosidase a fermentação semi-sólida.

Com relação ao tempo de incubação necessário para a produção de enzima em meio semi-sólido, observou-se que a atividade máxima da enzima é obtida com 113 - 115 horas de incubação a 30 °C . Como se pode observar na Figura 3, após a produção máxima da enzima, sua atividade manteve-se constante no período de 115 a 158 horas de fermentação, de acordo com as condições descritas - no item 3.3.2. Esta média de tempo de incubação necessária para produção da enzima de origem fúngica como relatado por Park et alii (51).

### 5.3 Efeito da adição de lactose no meio de cultura

O estudo do efeito da adição de lactose no meio de cultura , realizado de acordo com o item 3.4 mostra, pelos resultados descritos no item 4.3, ilustrados pelas Figuras 2 e 3, que a enzima é produzida constitutivamente, uma vez que a adição deste carboidrato não afetou a atividade enzimática. Entretanto, outras linhagens de microrganismos relatadas na literatura (38, 19, 5) necessitam de lactose como indutora da produção da enzima.

### 5.4 Purificação da $\beta$ -galactosidase

A purificação de  $\beta$ -galactosidase produzida por *Scopulariopsis sp*

foi realizada de acordo com o item 3.6 e como demonstram os resultados no item 4.4, ilustrados pela Tabela 2, com fracionamento - por sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose, principalmente componentes coloridos e outras proteínas foram removidas, sendo que a  $\beta$ -galactosidase não foi adsorvida pela resina, significando que a proteína de  $\beta$ -galactosidase apresenta carga positiva a pH 5.

A cromatografia em coluna de CM-celulose separou um único pico de proteína que hidrolisa ONPG e lactose, porém não hidrolisa p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo. Isto significa que a  $\beta$ -galactosidase foi adsorvida na resina CM-celulose devido a carga positiva que apresenta em pH 5.

$\beta$ -galactosidase é constituída de uma única identidade, o que foi verificado através da eletroforese em gel de poliacrilamida, como demonstrado na Figura 14.

## 5.5 Caracterização da $\beta$ -galactosidase

A função bioquímica da  $\beta$ -galactosidase descoberta em *Scopulariopsis sp* é semelhante à das  $\beta$ -galactosidasas fúngicas extracelulares relatadas na literatura (52, 53, 54), mas apresenta algumas diferenciações com relação às propriedades físico-químicas, tais como pH ótimo de atividade, temperatura ótima, estabilidade ao pH, influência de sais inibidores e poder catalítico.

### 5.5.1 Efeito do pH na atividade enzimática

O estudo do pH ótimo de atividade para a enzima foi realizado de

acordo com o item 3.8.1, tendo sido os resultados obtidos descritos no item 4.5.1 e ilustrados na Figura 7.  $\beta$ -galactosidase - apresentou pH ótimo de atividade sobre ONPG em 3,6 a 5,0 e sobre lactose 4,5, apresentando portanto melhor atividade do lado ácido da neutralidade assim como as  $\beta$ -galactosidases de *Aspergillus foetidus* e *Aspergillus oryzae* (12, 51, 66).

### 5.5.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática

O efeito do pH na estabilidade enzimática, realizado de acordo com o item 3.8.2, tem os resultados descritos em 4.5.2. O comportamento da lactase de *Scopulariopsis sp.*, frente a valores de pH na faixa ácida e alcalina de 3,6 a 8,0 respectivamente, é de estabilidade, como ocorre para as lactases fúngicas já estudadas.

### 5.5.3 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi realizado segundo o método descrito em 3.8.3 e os resultados obtidos são colocados no item 4.5.3 .

As  $\beta$ -galactosidases de origem fúngicas, extra-celulares são geralmente termo-resistentes, o que se aplica à  $\beta$ -galactosidase produzida por *Scopulariopsis sp.*, pois, quando o aquecimento da enzima é feito a 60 °C, esta começa a perder a atividade após 35 horas de incubação, enquanto a 65 °C, a atividade cai a 40 % após 1 hora de incubação. Esta elevada termo-estabilidade da  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp.* é maior dentre as  $\beta$ -galactosidases já relatadas na literatura, sejam de origem fúngica ou não.

#### 5.5.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática

A temperatura ótima para atividade de  $\beta$ -galactosidase do *Scopulariopsis sp.*, foi determinada de acordo com o item 3.8.4, os resultados são relatados no item 4.5.4, a Figura 10 ilustra os resultados.

A temperatura ótima de  $\beta$ -galactosidases de diferentes fontes varia de acordo com a fonte da enzima. Para hidrólise do substrato sintético ONPG, a temperatura ótima é de 80 °C e para lactose , 55 °C. Tais valores de temperatura ótima aliados ao fato da enzima ter atividade ótima em pH de faixa ácida, tornam-na de grande aplicabilidade industrial, pois a chance de contaminação microbiana é diminuída.

#### 5.5.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática

Este estudo, realizado de acordo com o item 3.8.5, demonstra , pelos resultados obtidos descritos no item 5.4.5, que a atividade enzimática não foi afetada pela presença de sais. Os íons metálicos parecem não ser necessários para atividade de  $\beta$  - galactosidase de *Scopulariopsis sp.*, da mesma forma que não são necessários para as  $\beta$ -galactosidases fúngicas revistas (12, 51). Porém, as lactases produzidas por leveduras como *Saccharomyces fragilis* (22) necessitam de íons magnésio, manganês ou potássio para atividade máxima da enzima.

#### 5.5.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática

O efeito de inibidores na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase -

de *Scopulariopsis sp* foi realizado de acordo com o item 3.8.6, sendo os resultados descritos em 4.5.6. A atividade da  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp* não foi inibida pela presença de dietilditiocarbamato de sódio, p-hidroxiomercuribenzoato, bissulfito de sódio, mercaptoetanol, iodoacetamida. Os grupos sulfídri<sub>l</sub>as não devem, portanto, estar envolvidos na atividade enzimática.

Verificou-se que a adição de galactose em baixa concentração (10 mM) demonstra inibir a atividade enzimática, porém glicose mesmo em alta concentração (400 mM) não exerce efeito sobre a atividade enzimática. Pode-se sugerir que a galactose compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, como foi constatado na  $\beta$ -galactosidase produzida por *Aspergillus oryzae* (51), num clássico exemplo de inibição competitiva.

#### 5.5.7 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

Para verificação do efeito da concentração do substrato na atividade da enzima utilizou-se o método descrito em 3.8.7, cujos resultados são apresentados no item 4.5.7 e ilustrados na Figura 11 e 12. Neste estudo foram utilizados os substratos ONPG e lactose. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para ONPG foram 0,83 mM de ONPG e 8,3  $\mu$ M de ONP / minuto / mg de proteína, respectivamente. Para lactose foram encontrados  $K_m$  de 16,6 mM de lactose e  $V_{m\acute{a}x}$  de 6,6  $\mu$ moles de glicose / minuto / mg de proteína. Tais valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , tanto para ONPG como lactose, indicam alta afinidade da enzima pelo substrato quando se compara com as demais lactases fúngicas relatadas na literatura (12, 51, 53).

### 5.5.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida realizada de acordo com o item 3.8.8 e do resultado obtido descrito em 4.5.8, pode-se verificar a presença de uma única banda que indica não se tratar de uma isoenzima.

### 5.5.9 Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS - gel de poliacrilamida

O peso molecular da enzima em estudo foi estimado ser em 95 000 através do processo descrito em 3.8.9, cujos resultados são apresentados no item 4.5.9. A  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp* apresentou peso molecular próximo aos valores de  $\beta$ -galactosidase fúngica de *Aspergillus oryzae* (51).

## 5.6 Aplicação da $\beta$ -galactosidase

$\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp*, devido às propriedades físico-químicas que apresenta, pode ser utilizada no processamento de produtos derivados do leite, sendo utilizada para hidrolisar a lactose presente em soro de leite. Esta utilização oferece uma solução potencial para a séria problemática dos resíduos da indústria queijeira que são jogados nas águas fluviais, sendo fator de poluição.

O grande poder catalítico da enzima foi verificado pela hidrólise de cerca de 95 % do teor de lactose presente no soro (pH 4,5) após 50 horas de incubação. Em comparação,  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* atinge hidrólise máxima de 83 % do teor de lactose presente no soro a 55 °C após 72 horas de incubação (51).



## 6. CONCLUSÕES

- 6.1 Das 1 067 linhagens de fungos isolados do solo, *Scopulariopsis sp* demonstrou ser melhor produtor de  $\beta$ -galactosidase, não sendo ainda relatado por outros pesquisadores.
- 6.2 *Scopulariopsis sp* produz  $\beta$ -galactosidase em fermentação semi-sólida, não produzindo a enzima em fermentação submersa de acordo com o experimento realizado neste trabalho.
- 6.3 *Scopulariopsis sp* produz  $\beta$ -galactosidase constitutivamente sem utilizar lactose como indutor.
- 6.4  $\beta$ -galactosidase produzida por *Scopulariopsis sp* possui carga positiva em solução tampão acetato 0,05 M a pH 5, visto que não foi adsorvida em DEAE-celulose mas em CM-celulose.
- 6.5 Caracterização da  $\beta$ -galactosidase
- 6.5.1 A enzima tem pH ótimo na faixa de 3,8 a 5 para ONPG e 4,5 para lactose.
- 6.5.2 A enzima é estável na faixa de pH compreendida entre 3,8 a 8,5.
- 6.5.3 A temperatura ótima de ação da  $\beta$ -galactosidase é 65 °C e 55 °C para ONPG e lactose, respectivamente.
- 6.5.4 A enzima apresenta alta estabilidade térmica, visto que mesmo às 35 horas de incubação a 60 °C mantém 80 % de atividade enzi-

mática.

- 6.5.5 Os sais minerais  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $NiSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $KCl$ ,  $CuSO_4$ , não exercem influência sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase.
- 6.5.6 A atividade da enzima não foi afetada pela adição dos seguintes agentes inibidores: dietilditiocarbamato de sódio, bissulfito de sódio, cisteína, p-hidroximercuribenzoato, mercaptoetanol.
- 6.5.7 A  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis sp* apresenta forma simples. A eletroforese em gel de poliacrilamida realizada a pH 8,0, revelou a presença de apenas uma banda que se desloca em direção ao catodo.
- 6.5.8 O peso molecular da  $\beta$ -galactosidase foi estimado ser de 95 000.
- 6.6 Pelas características da  $\beta$ -galactosidase produzida por *Scopulariopsis sp*, verifica-se que há grande aplicabilidade da enzima na hidrólise de lactose presente em soro, embora possa hidrolisar lactose presente em leite.

- TABELAS

TABELA 1Linhagens de fungo selecionadas para produção de  $\beta$ -galactosidase

Nº da linhagem	Unidades de $\beta$ -galactosidase $\mu$ moles DNP / min / ml	
	pH 5,0	pH 6,5
171	1,22	0,18
198	1,13	0,11
306	0,405	0,17
246	1,26	0,42
347	0,25	0,06

TABELA 2Purificação da  $\beta$ -galactosidase

Etapa da purificação	Atividade específica unidades de atividade por mg de proteína	Grau de purificação em relação à preparação bruta
Preparação bruta	4,21	1,0
Fracionamento com sulfato de amônio	4,95	1,2
Cromatografia em DEAE-celulose	14,6	3,5
Cromatografia em CM-celulose	141,92	33,7

TABELA 3

Efeito de Sais Minerais na atividade enzimática

SAL	CONC. mM	ATIVIDADE RELATIVA
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	100 %
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	100 %
NiSO <sub>4</sub>	1 mM	100 %
MnSO <sub>4</sub>	1 mM	100 %
KCl	1 mM	100 %
CuSO <sub>4</sub>	1 mM	100 %
AgNO <sub>3</sub>	1 mM	84 %

TABELA 4

Efeito de inibidores de enzimas na atividade da  $\beta$ -galactosidase

COMPOSTO	CONC. mM	ATIVIDADE RELATIVA
Dietilditiocarbamato de sódio	10 mM	100 %
Bissulfito de sódio	10 mM	100 %
Cisteína	10 mM	100 %
Iodoacetato	10 mM	100 %
Mercaptoetanol	10 mM	100 %
P-hidroxiomercuribenzoato	10 mM	100 %
Glicose	20-40 mM	100 %
Galactose	10 mM	90 %

- F I G U R A S -



FIGURA 1

Microfotografia de *Scopulariopsis* sp

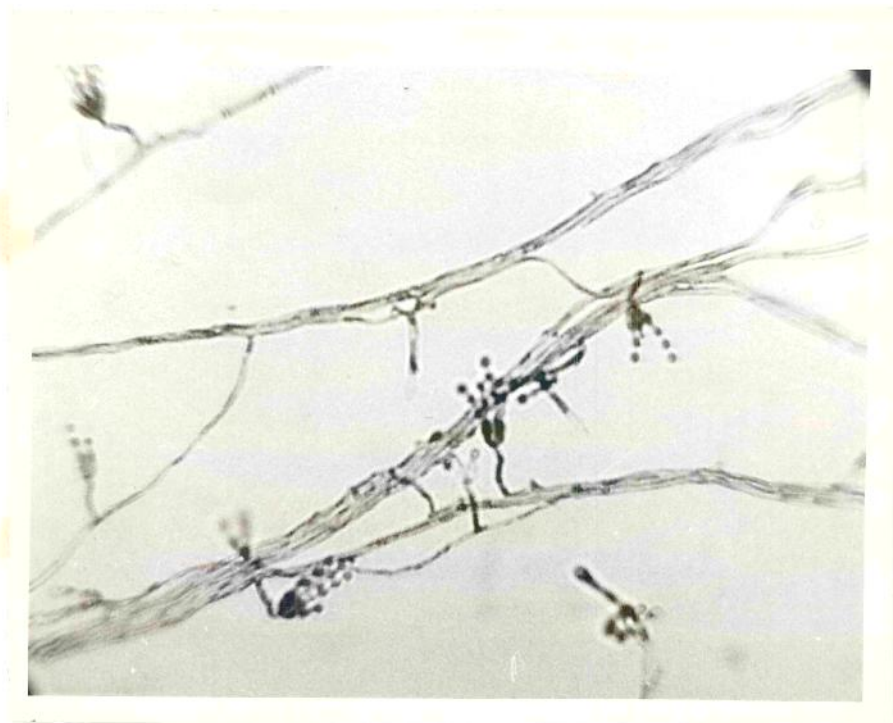


FIGURA 2

Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima em fermentação submersa

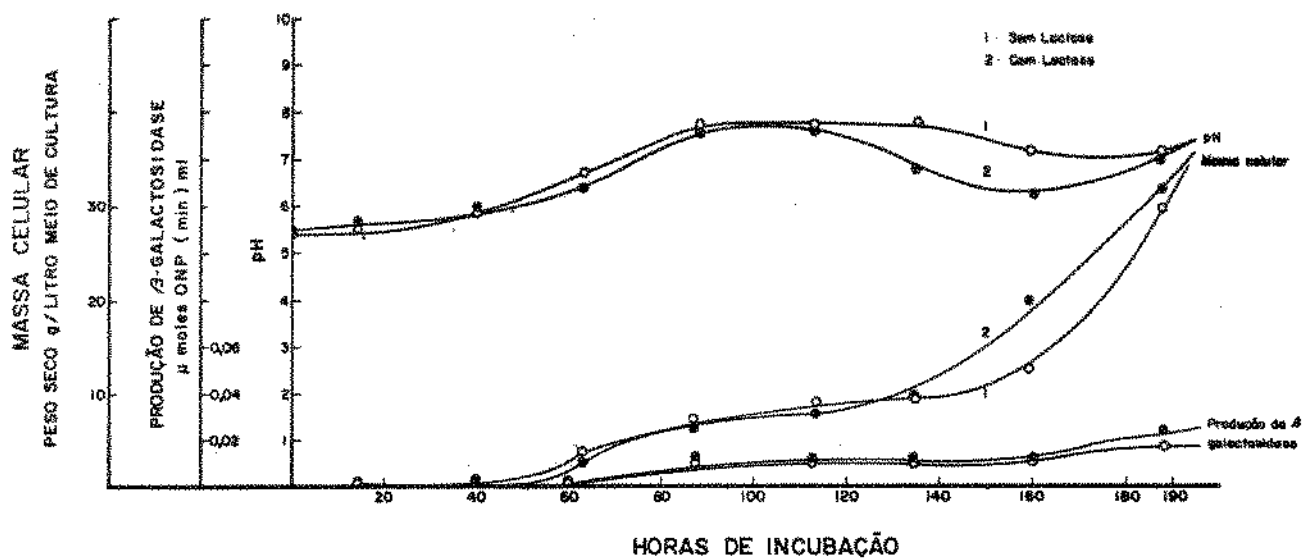


FIGURA 3

Estudo da relação entre tempo de incubação e produção da enzima em fermentação semi-sólida

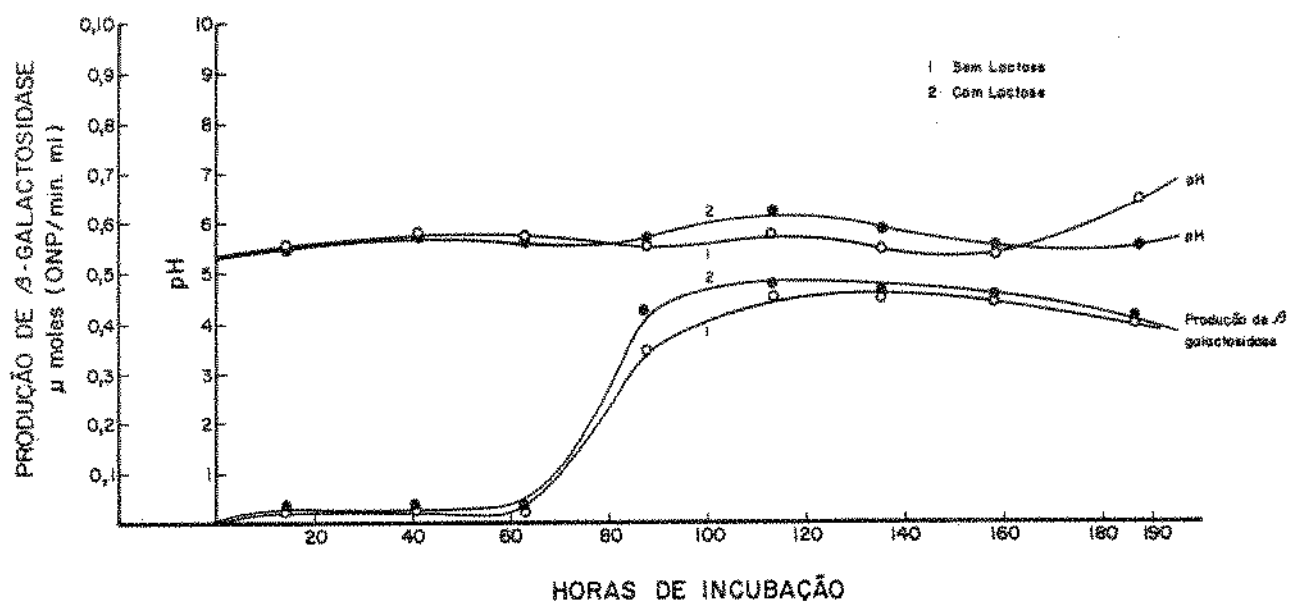


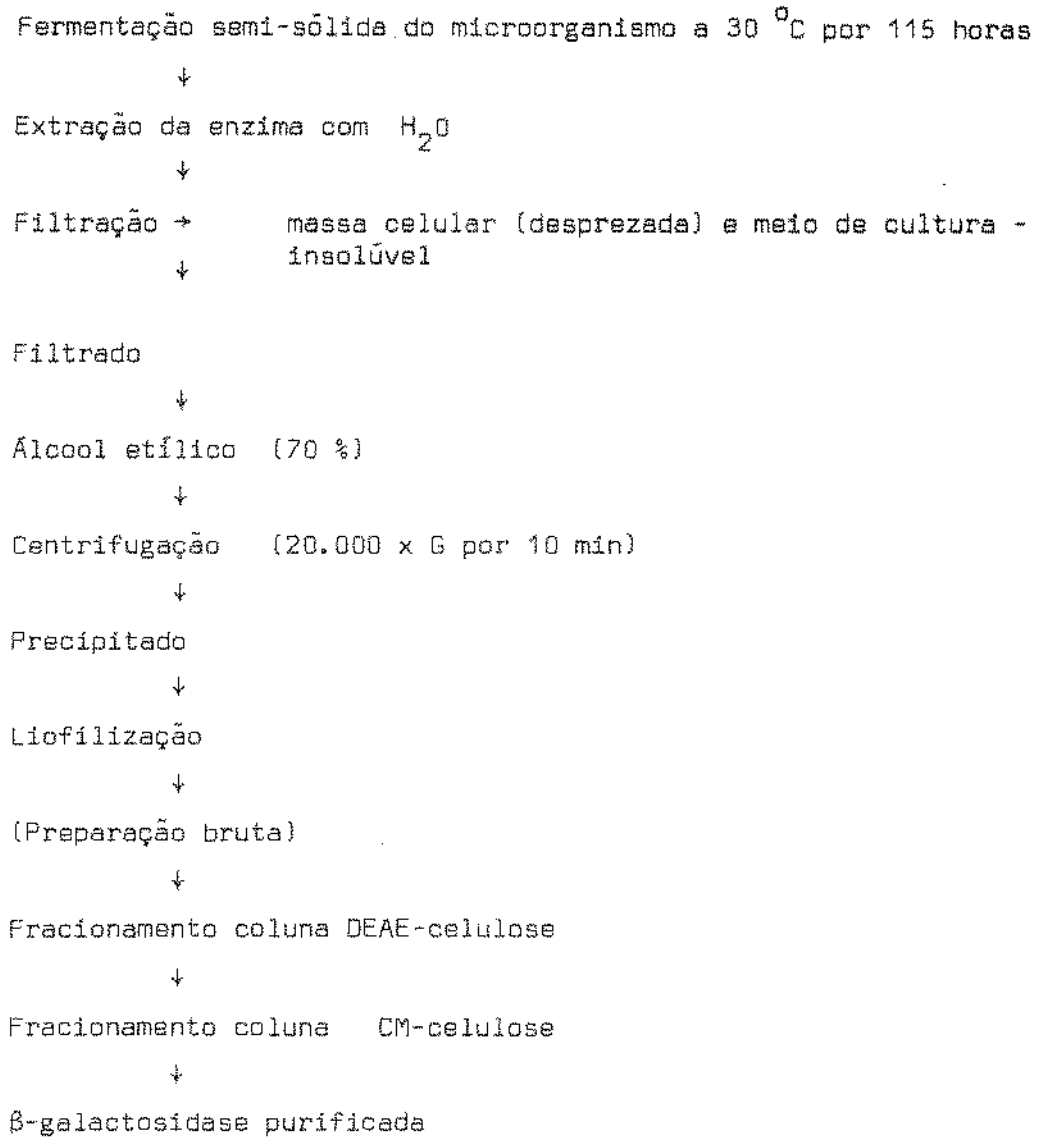
FIGURA 4Fluxograma da produção e purificação da  $\beta$ -galactosidade

FIGURA 5

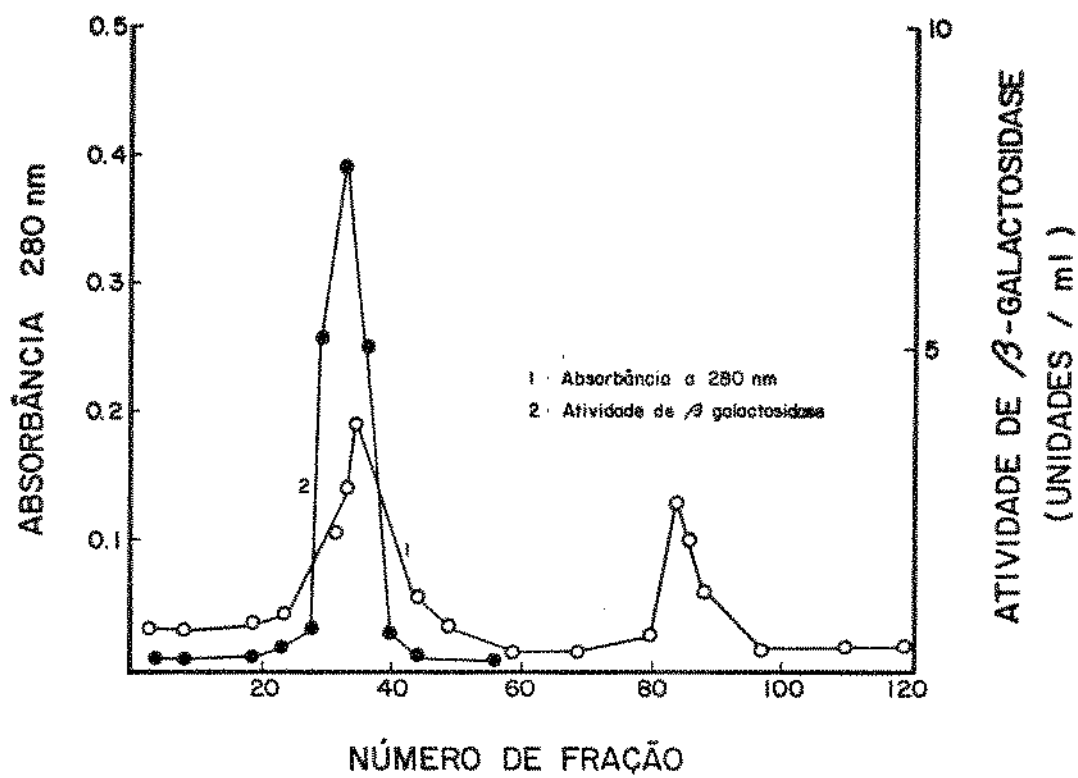
Cromatografia em coluna de DEAE-celulose da  $\beta$ -galactosidase

FIGURA 6

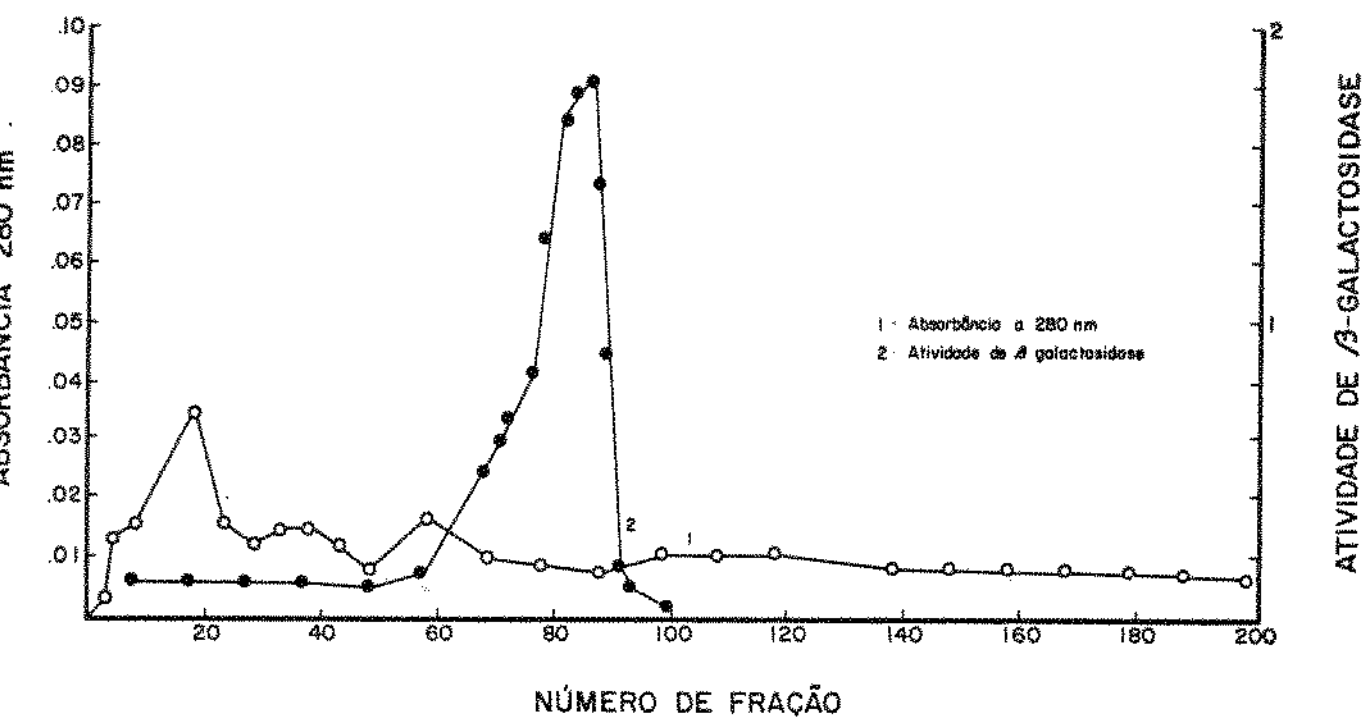
Cromatografia em coluna de CM-celulose da  $\beta$ -galactosidase

FIGURA 7

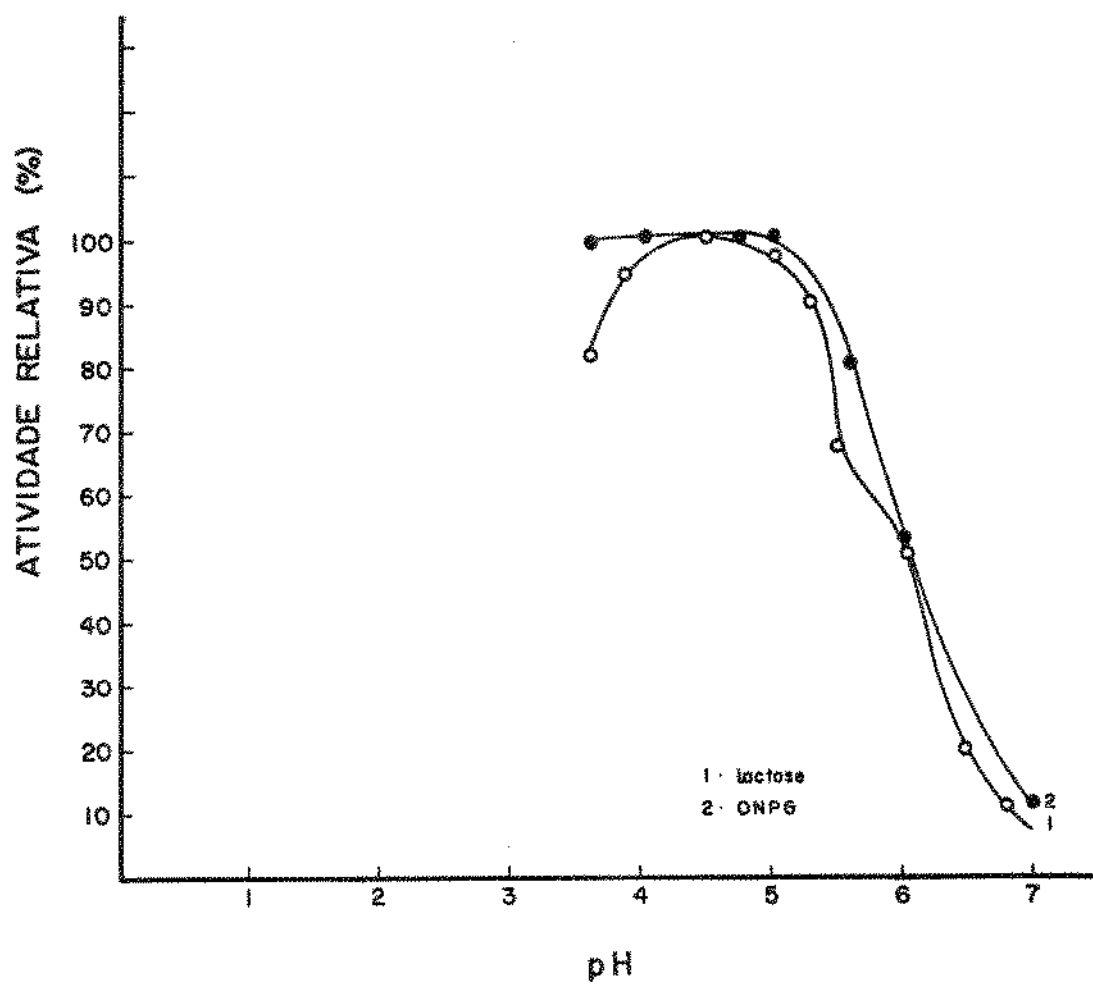
Efeito do pH na atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase

FIGURA 8

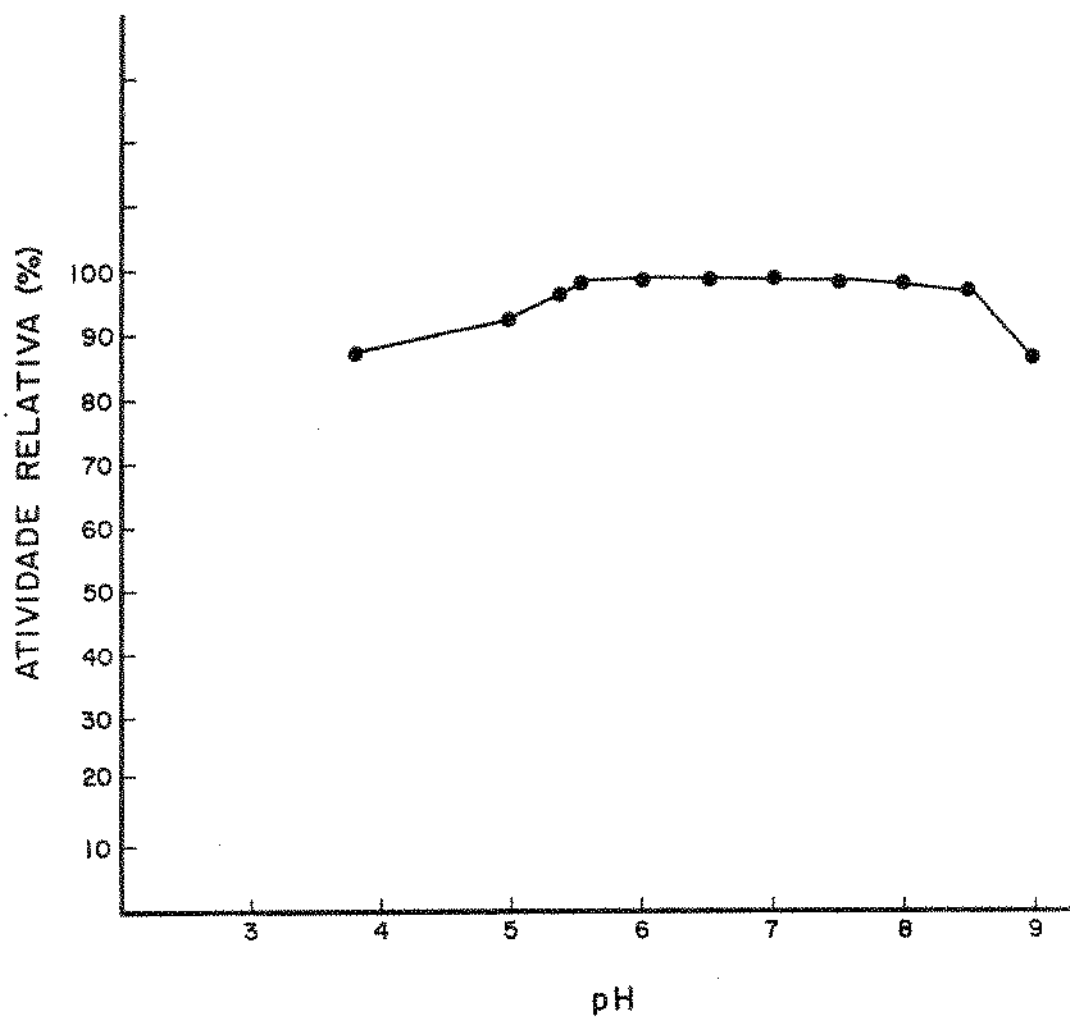
Efeito do pH na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase



FIGURA 9

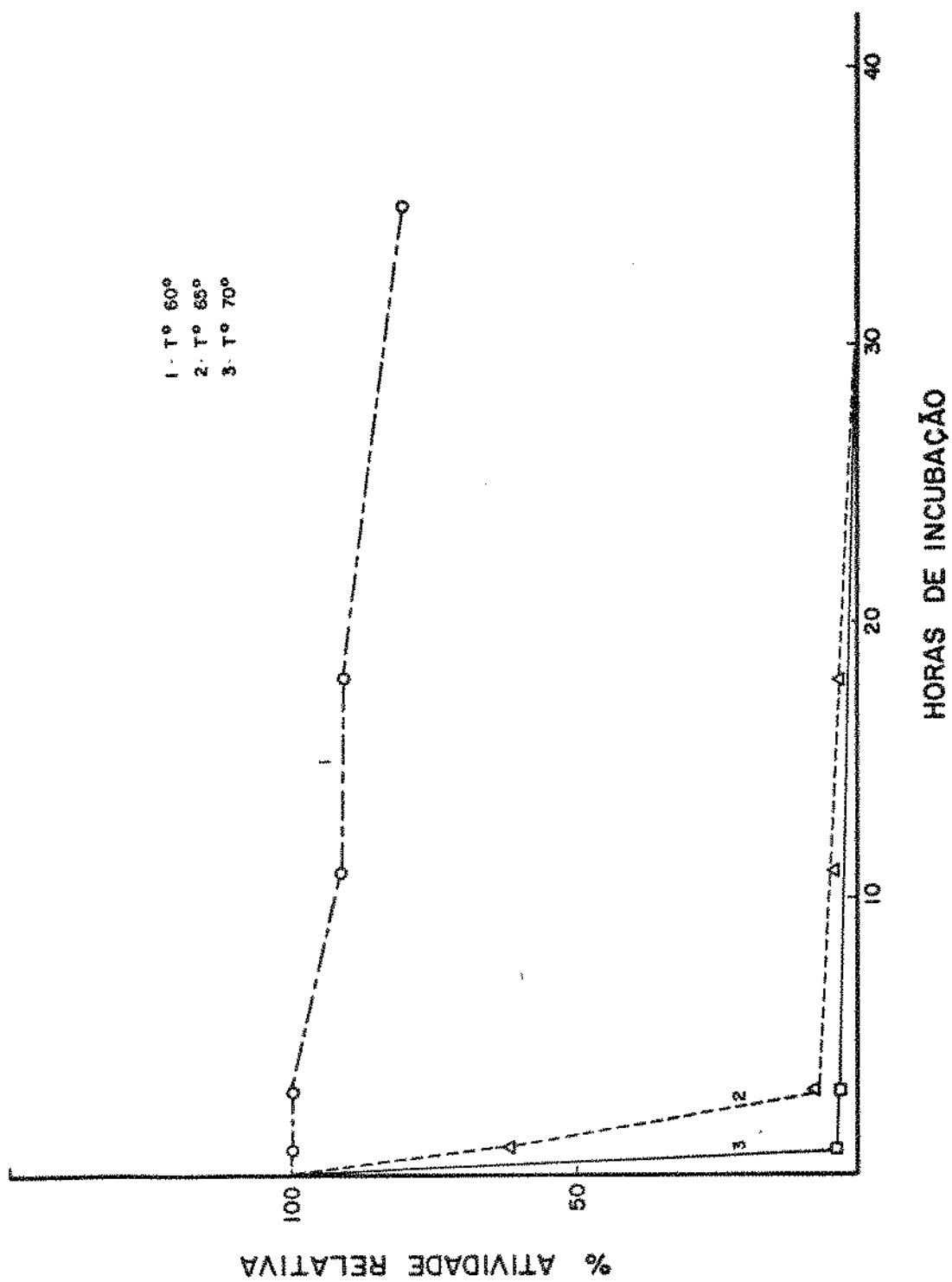
Efeito da temperatura na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase

FIGURA 10

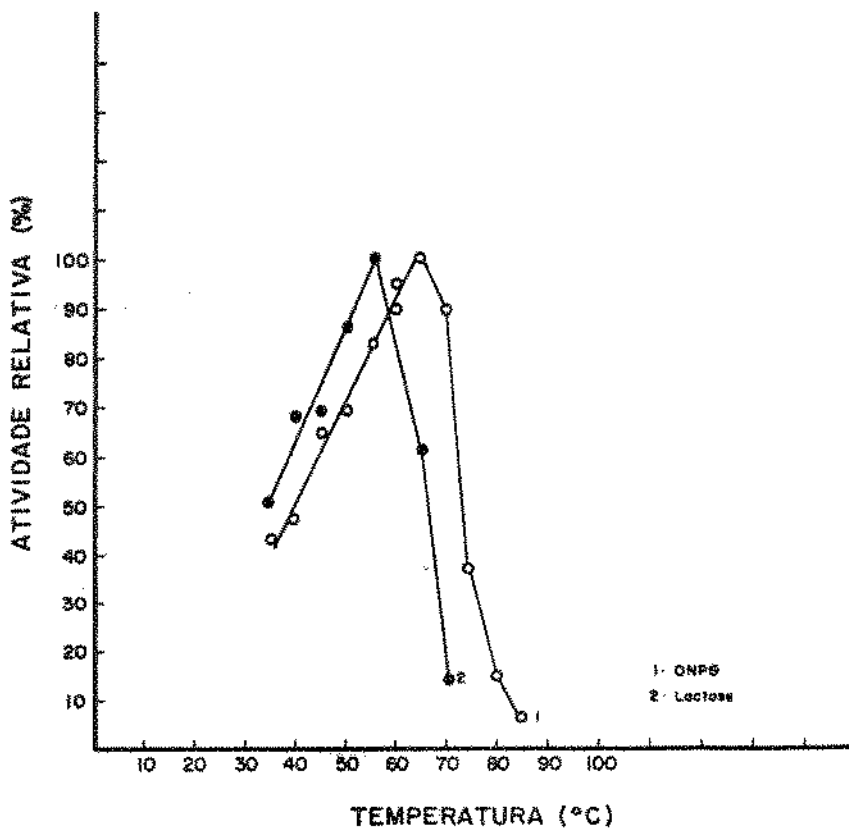
Efeito da temperatura na atividade da  $\beta$ -galactosidase

FIGURA 11

Efeito da concentração do substrato  
ONPG na atividade da  $\beta$ -galactosidase

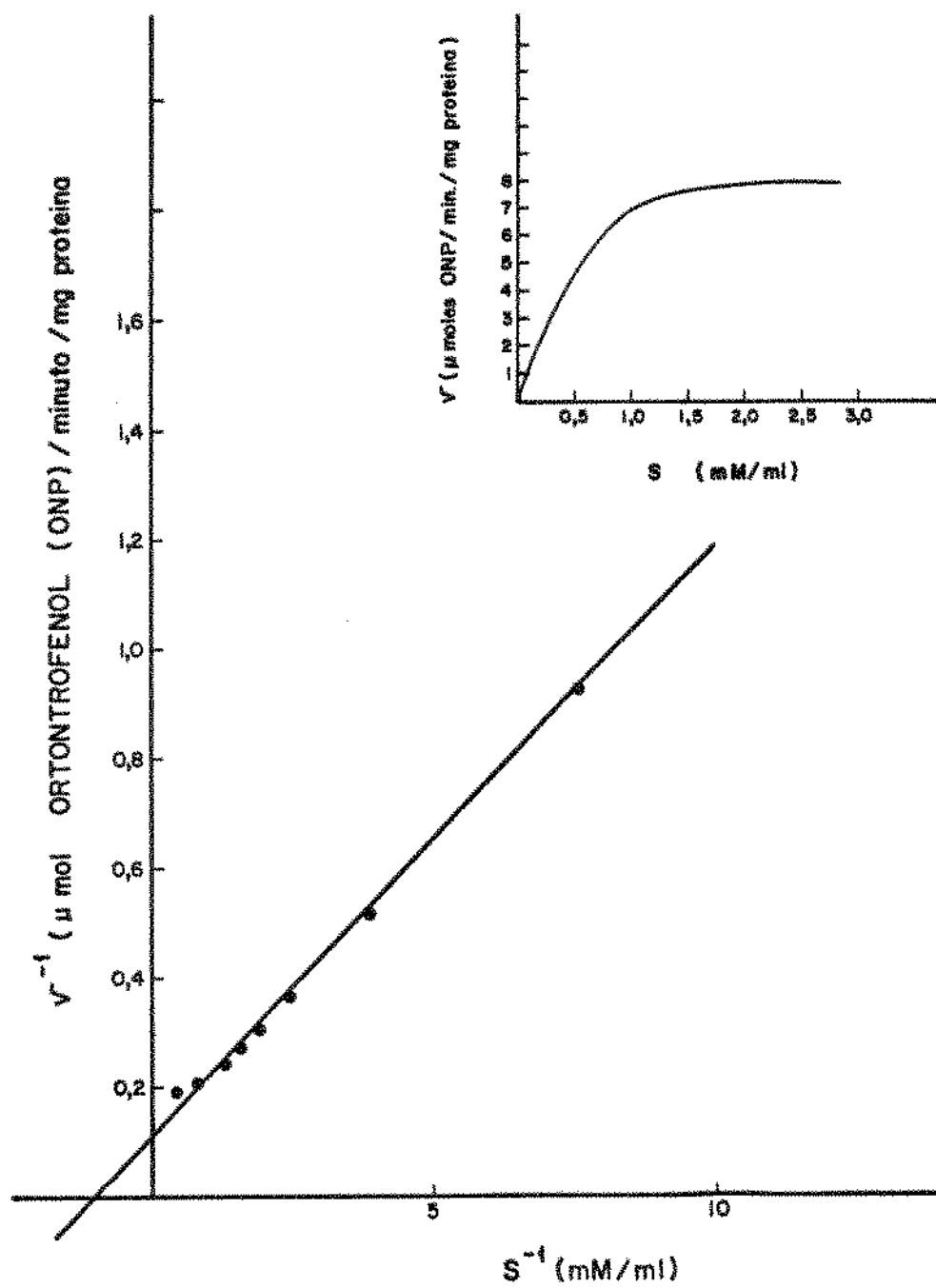


FIGURA 12

Efeito da concentração do substrato  
lactose na atividade enzimática

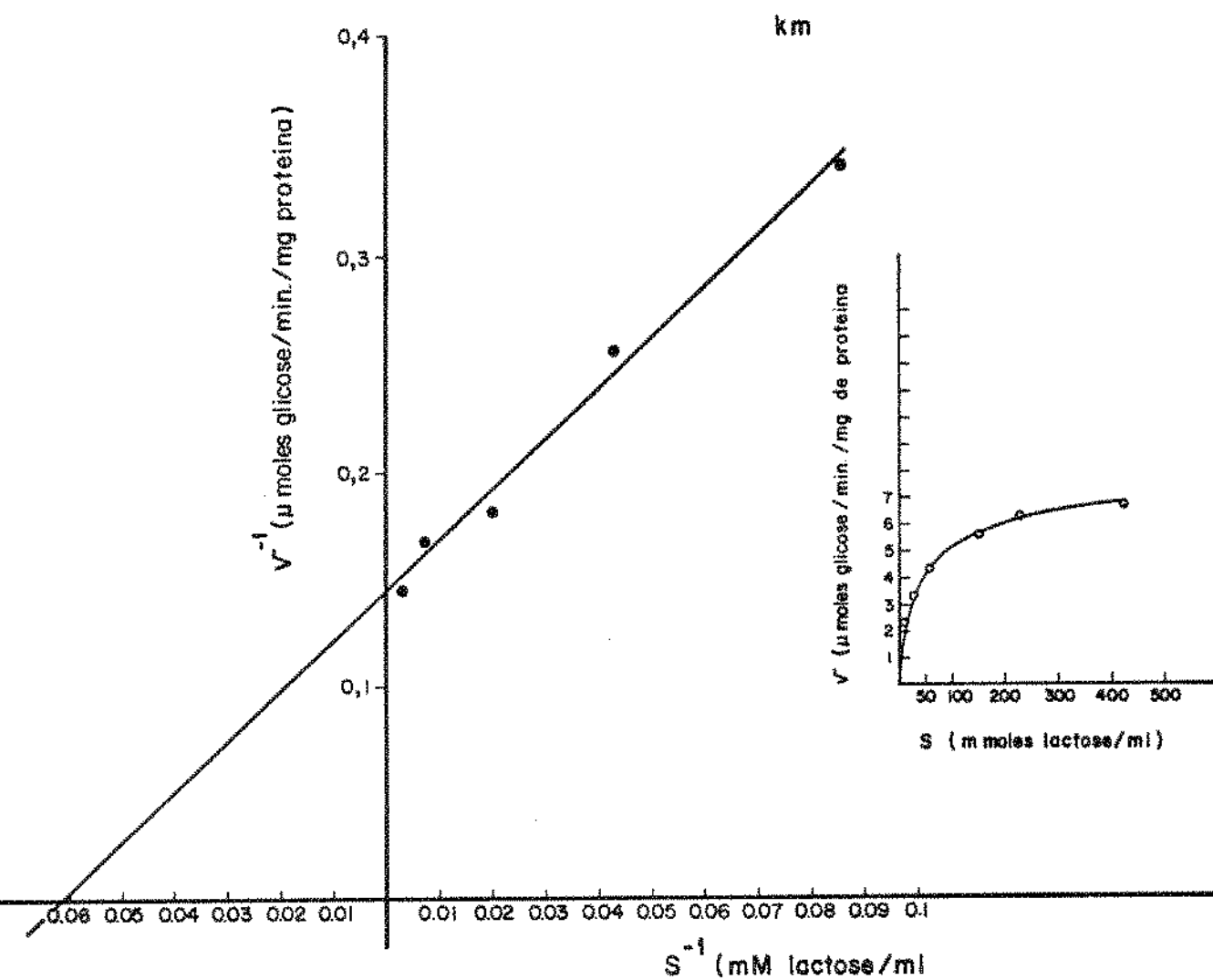


FIGURA 13

Eletroforese da  $\beta$ -galactosidase  
purificada em gel de poliacrilamida

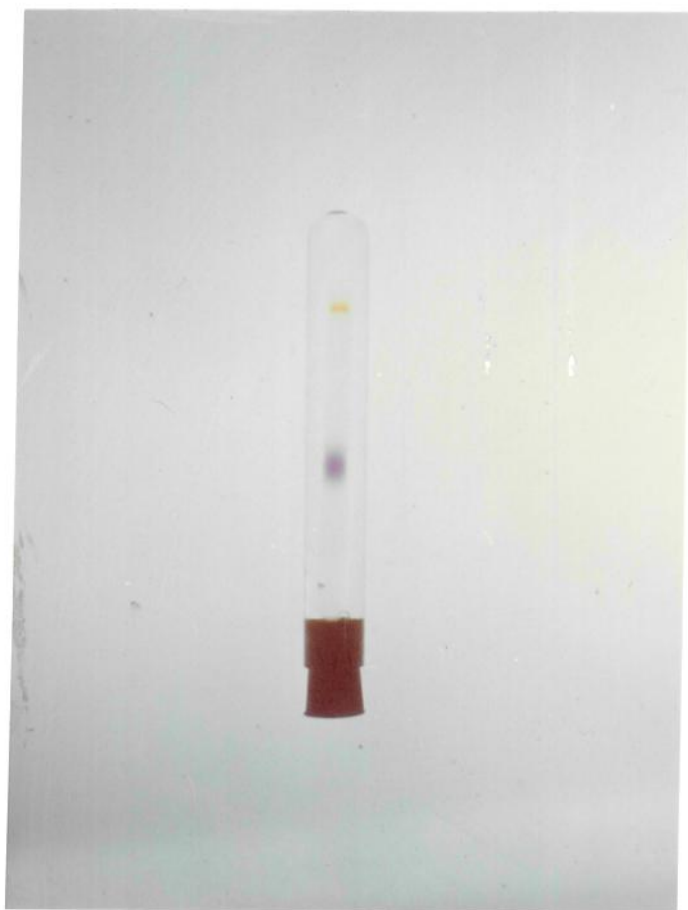


FIGURA 14

Eletroforese da  $\beta$ -galactosidase  
purificada em gel de poliacrilamida

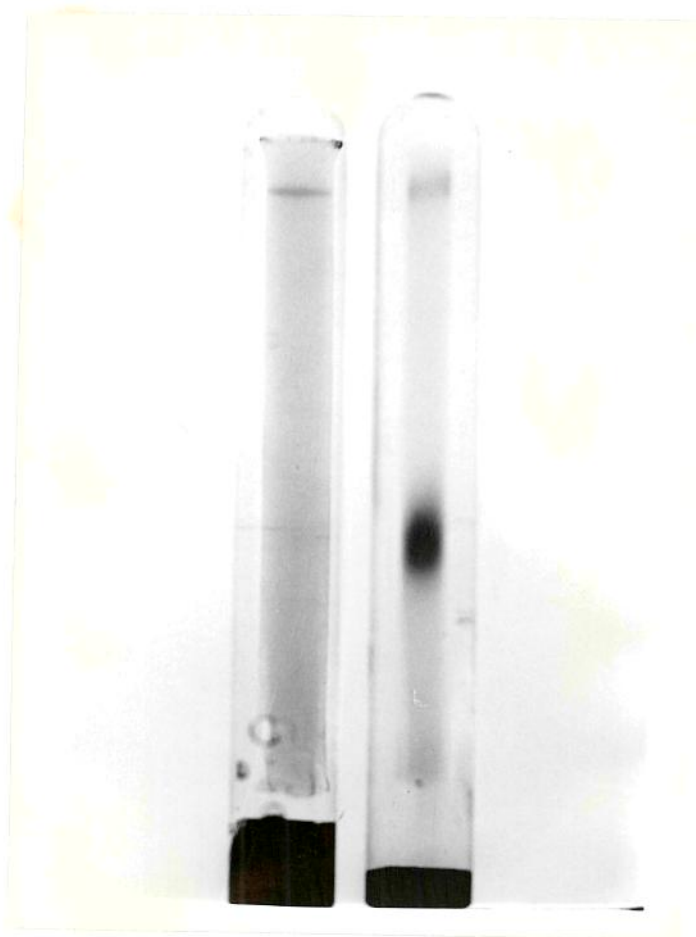


FIGURA 15

Determinação do peso molecular por eletroforese em SDS  
(sódio dodecyl sulfato) gel de poliacrilamida

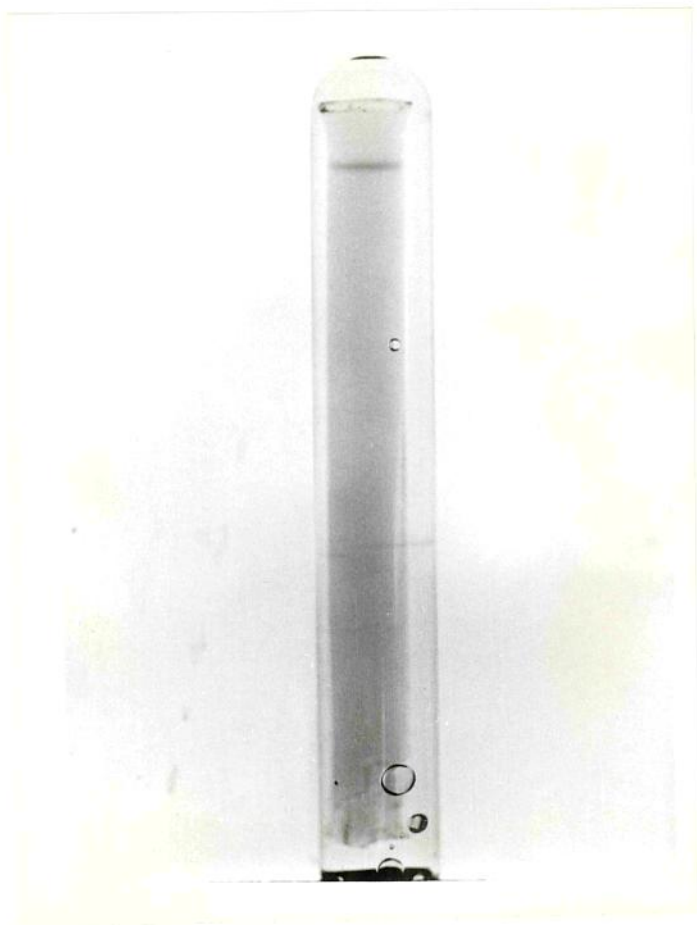


FIGURA 16

Efeito da temperatura na hidrólise da lactose em soro de leite

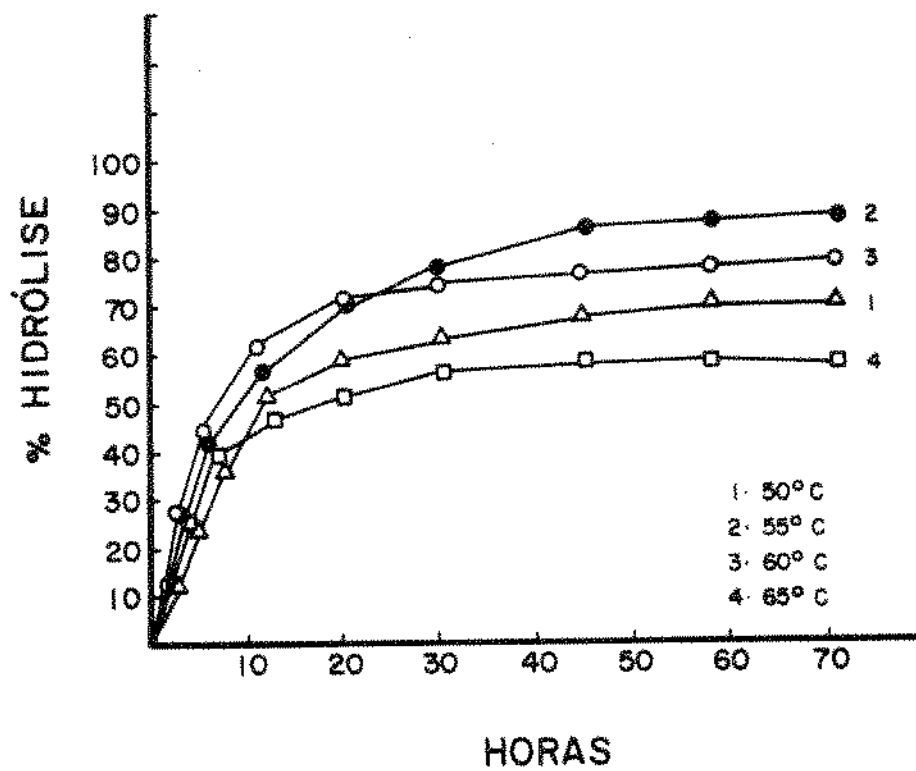




FIGURA 17

Efeito da concentração enzimática da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise da lactose em soro de leite

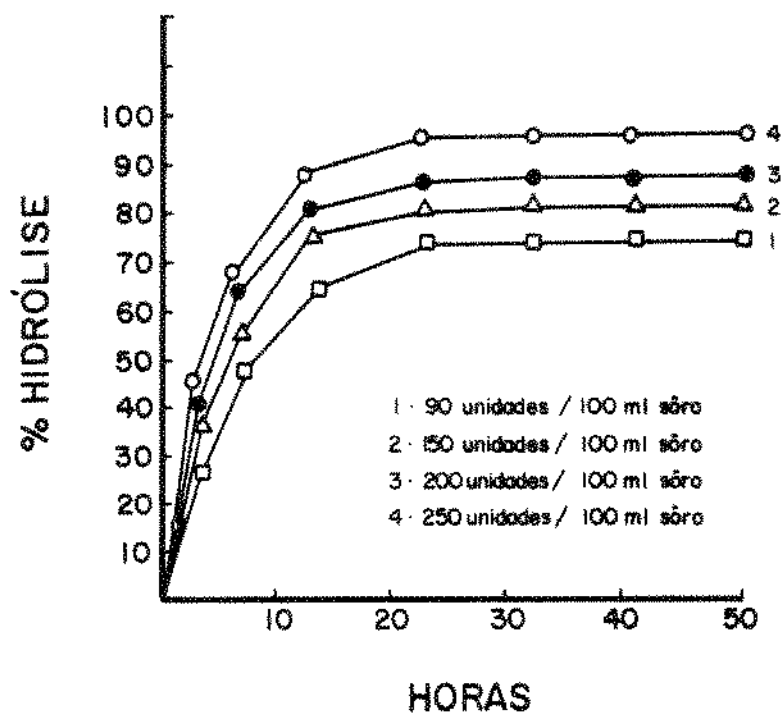


FIGURA 18

Cromatografia ascendente em papel, dos produtos de hidrólise da lactose



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson, J.M.; Rickenberg, H.V.  $\beta$ -galactosidase of *Paraclostridium aerogenoides*. J. Bacteriology 80, 297-304, 1960.
2. Andrews, P. Estimation of the Molecular Weight of Proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J. 91, 1964.
3. Anema, P.J. Purification and some properties of  $\beta$ -galactosidases of *Bacillus subtilis*. Biochimica et Biophysica Acta 89, 495-503, 1964.
4. A.O.A.C. Methods of analysis. 10<sup>th</sup> ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washington D.C., 1965.
5. Appel, S.H.; Alpers, D.H.; Tomkins, G.M. Multiple molecular forms of  $\beta$ -galactosidase. J. Mol. Biol. 11, 12-22, 1965.
6. Aronson, M. Transgalactosidation during lactose hydrolysis. Arch. Biochem. Biophysics 39, 370-379, 1952.
7. Bahl, O.P.; Agrawal, K.M.L. Glicosidases of *Aspergillus niger*. I - Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidases and  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase. The Journal of Biological Chemistry, 244 (11) 2970-2978, 1969.
8. Barton, R.R. A Specific method for quantitative determination of glucose. Analytical Biochemistry 14, 258-260, 1966.

9. Berg, A.P.; Fowler, A.V.; Zabin, I.  $\beta$ -galactosidase: Isolation of and antibodies to incomplete chains. *Journal of Bacteriology* 101 (2), 438-443, 1970.
10. Biermann, L.; Glantz, M.D. Isolation and characterization of  $\beta$  - galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 167, 373-377, 1968.
11. Blankenship, L.C.; Wells, P.A. Microbial beta-galactosidase: A survey for neutral pH optimum Enzymes. *J.Milk Food Technol.* 37 (4), 1974.
12. Borglum, G.B.; Sternberg, M.Z. Properties of a fungal lactase. *Journal of Food Science* 37, 619-623, 1972.
13. Bouvy, F.A.M. Applications for lactase-treated whey. *Food Products Development* 10-15, 1975.
14. Bowen, D.M.; Radin, N.S. Properties of cerebroside galactosidase. *Biochim. Biophysica Acta* 152, 599-610, 1968.
15. Cajori, F.A. Some characteristics of intestinal lactase. *The American Journal of the Medical Sciences* 187 (3), 295-296, 1934.
16. Caputto, R.; Leloir, L.F.; Trucco, R.E. Lactase and lactose fermentation in *Saccharomyces fragilis*. *Enzymology* 12, 350, 1948.

17. Chefurka, W.; Yapo, A.; Nisman, B. In vitro synthesis of  $\beta$ -galactosidase by membrane fractions of *Escherichia coli*. Canadian Journal of Biochemistry 48, 1970.
18. Citti, J.E.; Sandine, W.E.; Elliker, P.R.  $\beta$ -galactosidase of *Streptococcus lactis*. Journal of Bacteriology 89 (4), 937-942, 1965.
19. Clausen, C.R.; Nakamura, M. Beta-galactosidase of *Shigella sonnei*. Nature 197 (9), 1963.
20. Cohn, M.; Horibata, K. Analysis of the differentiation and of the heterogeneity within a population of *Escherichia coli* undergoing induced  $\beta$ -galactosidase synthesis. Journal of Bacteriology 78, 1959.
21. Cohn, M.; Monod, J. Purification et propriétés de la  $\beta$ -galactosidase (lactase) d'*Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta 7, 153-174, 1951.
22. Graven, G.R.; Steers, E.; Anfinsen, G.B. Purification, composition, molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli* K 12. The Journal of Biological Chemistry 240, 2468-2477, 1965.
23. Dahlqvist, A. Method for assay of intestinal Disaccharidases. Analytical Biochemistry 7, 18-25, 1964.
24. Davies, R. Lactose utilization and hydrolysis in *Saccharomyces fragilis*. J. Gen. Microbiol. 37, 81-98, 1964.

25. Davis, B.J. Disc electrophoresis: Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404, 1964.
26. Engel, W.G. The use of lactase to sweeten yogurt without increasing calories. *Cult. Dairy Prod. J.* 8 (3), 6-7, 1973.
27. Ennis, H.L.; Kievitt, K.D.  $\beta$ -galactosidase messenger RNA made during recovery from Inhibition of Protein Synthesis is not translated. *The Journal of Biological Chemistry* 251 (9), 2854-2860, 1976.
28. Erickson, R.P.; Steers, E. Comparative study of Isoenzyme formation of bacterial  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Bacteriology* 102 (1) , 79-84, 1970.
29. Goodenough, E.R.; Kleyn, D.H. Influence of viable yogurt microflora on digestion of lactose by the Rat. *J. of Dairy Science* 59 (4) , 601-605, 1975.
30. Guerra, M.J.; Park, Y.K. Extraction of Sesame seed protein and determination of its molecular weight by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of the American Oil Chemists Society* 52 (3), 73-75, 1975.
31. Guy, E.J.; Bingham, E.W. Properties of  $\beta$ -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. *J. Dairy Science* 61 (2), 147-151, 1978.
32. Heilskov, N.S. Chr. Studies on animal lactase. *Acta Physiol. Scand.* 24, 84-89, 1951.

33. Holsinger, V.H.; Roberts, N.E. New Products from lactose-hydrolyzed milk. Dairy & Ice cream Field 159 (3), 30-32, 1976.
34. Hu, A.S.L.; Wolfe, R.G., Reithel, F.J. The preparation and purification of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* ML 308. Archives of Biochemistry and Biophysics 81, 500-507, 1959.
35. Hustad, G.O.; Richardson, T.; Olson, N.F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on an insoluble carrier with a polyisocyanate polymer. II - Kinetics and Stability. Journal of Dairy Science 56 (9), 1119-1122, 1973.
36. Jaswicz, L.; Wasserman, A.E. Quantitative determination of lactase. Journal of Dairy Science 44 (3), 1961.
37. Kilara, A.; Shahani, K.M. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. Journal of Dairy Science 59 (12), 2031-2035, 1975.
38. Landman, O. Neurospora lactase. II - Enzyme formation in the Standart Strain. Arch. Bioch. Biophys. 52, 93-109, 1954.
39. Lederberg, J. The beta-D-galactosidase of *Scherichia coli* strain K 12. Journal of Bacteriology 60, 381-390, 1950.
40. Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. J.Am. Chem. 56, 658-666, 1934.

41. Loontjens, F.G.; Wallenfels, K.; Weil, R. Studies of the interaction of the inhibitor *o*-mercuriphenyl- $\beta$ -D-galactoside chloride with  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* K 12. Eur. J. Biochem. 14, 138-149, 1970.
42. Lowry, O.H.; Rosebrough, A.L.F.; Randall, R.F. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.
43. Mahoney, R.R.; Witaker, J.R. Purification and physicochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Food Science, 584-591, 1978.
44. McClatchy, J.K.; Rosenblum, E.D. Induction of lactose utilization in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriology 86, 1211-1215, 1963.
45. McFeters, G.A.; Sandine, W.E.; Elliker, P.R. Purification and properties of *Streptococcus lactis*  $\beta$ -galactosidase. Journal of Bacteriology 93 (3), 914-919, 1967.
46. Morgan, E.R. Lactase enzyme preparation. U.S. Pat. 2, 715, 801, 1955.
47. Morisi, F.; Pastore, M.; Vigilia, A. Reduction of lactose content of milk by Entrapped  $\beta$ -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. J. of Dairy Science 56 (9), 1123-1127, 1973.
48. Myers, R.P.; Stimson, E.G. Production of lactase. U.S. Pat. 2, 782, 749, 1956.



49. Neuberger G.; Rosenthal, D. Uber taka-lactase. Biochem. Z. 145, 186, 1924.
50. Okos, M.R.; Grulke, E.; Syversø, A. Hydrolysis of lactose in acid whey using  $\beta$ -galactosidase adsorbed to a phenol formaldehyde resin. J. of Food Science 43, 566-571, 1978.
51. Park, Y.K.; de Santi, M.S.S.; Pastore, G.M. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Food Science 44 (1), 100-103, 1979.
52. Pomeranz, Y.; Miller, B.S. Evaluation of lactase preparations for use in Breadmaking. Agricultural and Food Chemistry 11 (1), 19-21, 1963.
53. Pomeranz, Y. Lactase (Beta-galactosidase). I - Occurrence and properties. Food Technology 88-92, 1964.
54. Pomeranz, Y. Lactase (Beta-galactosidase). II - Possibilities in the Food Industries. Food Technology, 96-101, 1964.
55. Rand, A.G.; Linklater, P.M. The use of enzyme for the reduction of lactose levels in milk products. The Australian Journal of Dairy Technology, 63-67, 1973.
56. Reed, G. Lactases, in "Enzymes in Food Processing" 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press Inc. N.Y., 1975.

57. Rickenberg, H.V. Occurrence of  $\beta$ -galactosidase in the genus *Shigella*. J. Bacteriology 80, 421-423, 1960.
58. Rohlfing, S.R.; Crawford, I.P. Purification and characterization of the  $\beta$ -galactosidase of *Aeromonas formicans*. Journal of Bacteriology 93 (3), 1085-1087, 1966.
59. Rohlfing, S.R.; Crawford, I.P. Partial purification and physical properties of *Bacillus megaterium*  $\beta$ -galactosidase. Journal of Bacteriology 92 (4), 1258-1259, 1966.
60. Rosensweig, N.S. Adult human milk intolerance and intestinal lactase deficiency. A review. J. Dairy Science 52 (5), 585-587, 1968.
61. Shah, N.D.; Nickerson, T.A. Functional properties of hydrolyzed lactose. Relative sweetness. Journal of Food Science 43 (5), 1575-1576, 1978.
62. Somogyi, M. A new reagent for the Determination of sugars. J. Biol. Chem. 160, 61-73, 1945.
63. Sorensen, S.G.; Crisan, E.V. Thermostable lactase from thermophilic fungi. Journal of Food Science 39, 1184-1187, 1974.
64. Steers, E.; Cuatrecasas, P.; Pollard, H.B. The purification of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography. The Journal of Biological Chemistry 246 (1), 196-200, 1971.

65. Szabo, G.; Davies, R. Studies on the  $\beta$ -galactosidase activity of *Saccharomyces fragilis*. J. Gen. Microbiol., 99-112 37, 1964.
66. Tanaka, Y.; Kagamiishi, A.; Kiuchi, A.; Horiuchi, T. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Biochem. 77, 241-247, 1975.
67. Toba, T.; Adachi, S. Hydrolysis of lactose by microbial  $\beta$ -galactosidases. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-glucose. J. of Dairy Science 61 (1), 33-38, 1978.
68. Ullman, A.; Goldberg, M.E.; Perrin, D.; Monod, J. On the Determination of Molecular Weight of Proteins and Proteins Subunits in presence of 6 M guanidine hydrochloride. Biochemistry 7 (1), 261-265, 1968.
69. Wallenfels, K.; Lehmann, J.; Malhotra, O.P. Die Spezifität der  $\beta$ -galactosidase von *E. coli* ML 309. Biochem. Z. 333, 1960.
70. Wallenfels, K.; Malhotra, O.P. Galactosidases. In "Advances in Carbohydrates Chemistry" 16, 239-298, 1961.
71. Weber, K.; Osborn, M. The Reliability of Molecular Weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. The Journal of Biological chemistry 244 (16), 4406-4412, 1969.
72. Wendorff, W.L.; Amundson, C.H. Characterization of beta-galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. J.Milk Food Technol. 34 (6),

300-306, 1971.

73. Wendorff, W.L.; Amundson, C.H.; Olson, N.F.; Garver, J.C. Use of yeast Beta-galactosidase in milk products. *J. Milk Food Technol.* 34 (6), 284-299, 1971.
74. Wierzbiki, L.E.; Kosikowski, F.U. Lactase potential of various microorganisms grown in whey. *Journal of Dairy Science* 56 (1) , 26-32, 1973.
75. Woychik, J.H.; Wandolowski, M.V. Lactose hydrolysis in milk and milk products by bound fungal beta-galactosidase. *J. Milk Food Technol.* 36 (1), 31-33, 1973.
76. Zenin, C.T.; Park, T.K. Isoenzymes of Polyphenol oxidase from high L-Dopa containing velvet bean. *Journal of Food Science*, 43, 1978.