



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium* utilizando líquido metabólico de microalgas em meio de cultura comercial**

*Elaine Cristina da Silva*

**RECIFE**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium* utilizando líquido metabólico de microalgas em meio de cultura comercial**

**ELAINE CRISTINA DA SILVA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

**Orientadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

**Co-orientadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Raquel Pedrosa Bezerra  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

**RECIFE, 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586p Silva, Elaine Cristina da  
Produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium* utilizando líquido metabólico de microalgas em meio de cultura comercial / Elaine Cristina da Silva. – 2018.  
59 f. : il.

Orientadora: Maria Taciana Vieira Soares.  
Coorientadora: Raquel Pedrosa Bezerra.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2018.  
Inclui referências e apêndice(s).

1. Lactose 2. Resíduos agroindustriais 3. Bactérias ácido lácticas  
I. Soares, Maria Taciana Vieira, orient. II. Bezerra, Raquel Pedrosa, coorient. III. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium* utilizando liquido metabólico de microalgas em meio de cultura comercial.

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Elaine Cristina da Silva

Aprovada em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

Banca examinadora

---

(Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

(1º Examinador)

Prof<sup>o</sup> Dr. Emanuel Viana Pontual

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

(2º Examinador)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia de Oliveira Nascimento

Faculdade São Miguel

## *Dedico*

*A minha querida mãe, aos envolvidos no projeto e aqueles que me apoiaram ao longo desses dois anos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu sou eternamente grata ao meu namorado Cristiano e minha sogra D. Maria de Fátima (Sogrinha), que me deram um enorme apoio durante todo esse período de mestrado. Quando precisei, eles estavam lá.

Aos professores e colaboradores do laboratório em geral, especialmente a Profa. Dra. Maria Taciana, minha eterna e admirável orientadora, que nunca desistiu de mim e até hoje mantem as portas abertas para me ter como sua aluna.

Também sou enormemente grata a Profa. Dra. Raquel Pedrosa, que sempre se dispôs a me orientar quando tive algumas dificuldades e hoje eu somei conhecimentos graças a ela.

Ao professor Dr. Romero que é uma pessoa admirável pela simplicidade, inteligência e generosidade.

Aos colegas de trabalho do grupo Ana Porto em geral, pois juntos formamos um grupo lindo, cheio de sonhos e objetivos.

Aos amigos queridos mais próximos, vou dedicar separadamente, começando pela Dona Priscila Santos, afinal entramos nessa fria juntas e se Deus quiser sairemos também juntas e felizes. Menina risonha que sempre chegou para animar meus dias, me apoiar e me “aperriar” também. Ketyline Lira (minha aproveitadora) outra tampinha que amo tanto, que me entende, me conhece bem e está sempre lá pra carregar os tijolos comigo, sou grata e feliz em ter vocês como amigas. Ao querido José Noé, que admiro pela honestidade, generosidade e companheirismo.

Dedico a Karol Caitano, uma pessoa linda e especial que admiro muito. A Priscila Galáxia, que conheço a anos luz, mora no coração e não paga aluguel, sempre estarei a dispor. A Júlia, menina dedicada e de uma postura admirável.

Aos demais amigos do grupo que tenho um carinho especial, Sabrina, Karoline, Iris, Aníbia, Ari, Ieda, Viviane e aqueles que já saíram...

A toda equipe do Cenapesq, que estão sempre de prontidão para nos dá suporte em prol dos nossos experimentos. Aos funcionários do programa de pós da biociência, pela atenção.

A UFRPE, universidade que está comigo durante todos esses anos, instituição que me sinto bem vinda, bem cuidada. Minha Rural linda!

Muito obrigada!

“A solidariedade é o sentimento que melhor expressa o respeito pela dignidade humana”.

**Franz Kafka**

## RESUMO

A  $\beta$ -galactosidase comumente conhecida como lactase, se destaca como uma das enzimas mais importantes utilizadas no processamento de alimentos. Convencionalmente, sua principal aplicação tem sido a hidrólise de lactose em produtos lácteos. Uma de suas principais fontes são bactérias ácido lácticas, tais como *Enterococcus faecium*, conhecida pela capacidade de crescer em diferentes tipos de meios de cultura. No entanto, a produção em larga escala desse produto gera altos custos de meio de cultivo, levando a busca de alternativas para a substituição total ou parcial dele. O sobrenadante de microrganismos fotossintetizantes pode ser uma opção devido a quantidade de vitaminas, açúcares e proteínas presentes no meio que podem ser reaproveitados para o crescimento do microrganismo e produção de bioativos. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção, purificação e caracterização da  $\beta$ -galactosidase a partir de *E. faecium* usando sobrenadante de cultivo de microalgas em meio de cultura comercial. Inicialmente, foi realizado uma seleção do melhor meio alternativo utilizando sobrenadante de três microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* e *Scenedesmus sp*) em diferentes concentrações combinado ao meio comercial, em seguida o melhor meio foi submetido ao planejamento experimental com análise de superfície de resposta com o intuito de otimizar as condições da produção da enzima, através das seguintes variáveis: pH, temperatura, tempo de cultivo e concentração de lactose. Os resultados mostraram que o meio contendo sobrenadante de *C.vulgaris* foi o melhor na produção da enzima e as variáveis pH, temperatura e concentração de lactose influenciaram significativamente na produção de  $\beta$ -galactosidade. Sendo a maior atividade encontrada 30,83 U/ml pelas variáveis: pH 8, 5% de lactose e temperatura de 31°C. A  $\beta$ -galactosidase foi purificada utilizando cromatografia de troca iônica e sua massa molecular foi determinada por eletroforese SDS-PAGE. O fator de purificação da enzima encontrado foi de 3,05 com rendimento de 7,02%. A enzima purificada foi então, caracterizada visando sua aplicação industrial sendo sua atividade máxima a 40°C e pH 7,0. Quando testada em estabilidade, a enzima manteve-se estável por 45 min a 30°C em pH ótimo. Estes resultados apontam que a  $\beta$ -galactosidade de *E. faecium* mostrou potencial aplicação industrial a partir da produção por resíduo de baixo custo.

**Palavras-chave:** Lactose; resíduos agroindustriais; bactérias ácido lácticas.

## ABSTRACT

$\beta$ -galactosidase commonly known as lactase, stands out as one of the most important enzymes used in food processing. Conventionally, its main application has been the hydrolysis of lactose in dairy products. One of its main sources are lactic acid bacteria, such as *Enterococcus faecium*, known for its ability to grow in different types of culture media. However, a large-scale production of these product generates high culture medium costs, leading to the search for alternatives for a total or partial replacement of that. The metabolic liquid of photosynthetic microorganisms can be an option due to the amount of vitamins, sugars and proteins present in the medium, which can be reused for the microorganism growth and bioactive production. The aim of this work was evaluate the production, purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *E.faecium* using culture supernatant of the microalgae in commercial culture medium. Initially, a selection of the best alternative medium was performed using three microalgae supernatant (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* and *Scenedesmus* sp) with different concentrations in commercial medium, then the best medium was submitted to the experimental design with response surface analysis aiming of optimizing the production conditions of the enzyme, through the following variables: pH, temperature, culture time and lactose concentration. The results showed that the medium containing *C.vulgaris* supernatant was the best in the production of the enzyme. The higher  $\beta$ -galactosidase activity was 30.83 U/ml with variables pH 8, 5% lactose concentration and temperature of 31°C.  $\beta$ -galactosidase was purified using ion exchange chromatography and molecular weight was determined by SDS- PAGE electrophoresis. The purified fold was 3,05 with 7,02% of yield. The purified enzyme was then characterized aiming its industrial uses with maximal activity at 40°C and pH 7.0. When tested for stability, the enzyme keeping active for 45 min at 30 °C and optimum pH. These results indicate that  $\beta$ -galactosidase of *E.faecium* showed potential industrial application from low cost residue.

**Keywords:** Lactose; agroindustrial waste; lactic acid bacteria.

## Sumário

Capítulo I .....	10
Introdução .....	10
Revisão de literatura .....	12
Bactérias ácido lácticas .....	12
Enterococcus .....	13
$\beta$ -galactosidase .....	14
Purificação da $\beta$ -galactosidase .....	16
Reciclagem do sobrenadante de microrganismos fotossintetizantes .....	17
Objetivos .....	20
Objetivo geral .....	20
Objetivos específicos .....	20
Referências bibliográficas .....	21
Capítulo II .....	25
Introdução .....	28
Materiais e métodos .....	29
Microrganismo: .....	29
Produção do meio alternativo .....	30
Extração da enzima: .....	30
Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase: .....	31
Planejamento experimental .....	31
Resultados e discussão .....	32
Seleção do meio alternativo para produção de $\beta$ -Galactosidase: .....	33
Planejamento fatorial completo: .....	35
Conclusão .....	42
Referências .....	42
Capítulo II .....	45
Introdução .....	48
Materiais e métodos .....	49
Microrganismo: .....	49
Produção de $\beta$ -galactosidase: .....	49
Extração da enzima: .....	50
Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase: .....	50
Purificação da $\beta$ -galactosidase: .....	50
Determinação do peso molecular: .....	51

Caracterização bioquímica parcial da $\beta$ -galactosidase.....	51
Resultados e discussão .....	52
Purificação parcial da $\beta$ -galactosidase:.....	52
Caracterização parcial da $\beta$ -galactosidase.....	54
Conclusão .....	56
Referências.....	56

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

**Fig. 1.** Atividade de  $\beta$ -galactosidase produzida em diferentes meios contendo sobrenadante de microalgas.

**Fig. 2.** Gráfico de Pareto com o efeito da interação das variáveis na produção de  $\beta$ -galactosidase.

**Fig. 3.** Superfície de resposta da atividade da  $\beta$ -galactosidase em função das variáveis codificadas. Y atividade da  $\beta$ -galactosidase. (a) efeito da interação entre o pH (X3) e a temperatura (X1). (b) interação entre a lactose (X2) e a temperatura (X1) e (c) interação entre o pH (X3) e a concentração de lactose (X2).

### Capítulo III

**Fig. 1.** Perfil eletroforético das amostras. (M) Marcador molecular; (1) extrato bruto (2) extrato dialisado, (3) amostra pós cromatografia e (4) amostra pós cromatografia concentrada.

**Fig 2.** Efeito do pH na atividade enzimática (A) e estabilidade (B) de  $\beta$ -galactosidase purificada. Simbolos em (B)  $\diamond$ , pH3  $\blacksquare$ , pH 7; and  $\blacktriangle$ , pH 10;

**Fig 3.** Effects of temperature on the activity (A) and stability (B) of the purified  $\beta$ -galactosidase. Symbols in (B)  $\blacksquare$ , 30°C;  $\diamond$ , 40°C. and  $\blacktriangle$ , 60°C;

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1.** Propriedades da  $\beta$ -galactosidase sintetizada por diferentes fontes microbianas.

**Tabela 2.** Etapas utilizadas no processo de purificação de  $\beta$ -galactosidase.

### Capítulo II

**Tabela 1.** Meio alternativo contendo sobrenadante de microalgas em diferentes concentrações para produção de  $\beta$ -Galactosidase por *E.faecium*.

**Tabela 2.** Níveis e variáveis utilizados no planejamento fatorial  $2^4$  pra produção da  $\beta$ -galactosidase.

**Tabela 3.** Matriz contendo as condições experimentais e valores de atividade da  $\beta$ -galactosidase obtidos para *Enterococcus faecium*.

**Table 4.** Condições experimentais e valores de atividade da  $\beta$ -galactosidase obtidos para *Enterococcus faecium* usando um planejamento fatorial completo de  $2^3$ .

**Tabela 5.** Análise de variância para a produção de  $\beta$ -galactosidase

### Capítulo III

**Tabela 1.** Sumário com as etapas de purificação da  $\beta$ -galactosidase de *E. faecium*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- GOS** - Galactooligossacarídeos
- Kg** - Quilograma
- BAL** - Bactérias Ácido Láticas
- pH** - Potencial Hidrogeniônico
- °C** - Grau Celsius
- NaCl** - Cloreto de Sódio
- L** - Litros
- RSM** - Response Surface Methodology
- w/v** - Weight Volume
- TSB**- Tryptone Soy Broth
- U/ml** – Unidade por miligrama
- Y<sub>i</sub>** - Predicted response
- X<sub>ij</sub>** - Input variables
- Y**- Response variable
- $\beta_i$**  - Linear coefficient
- $\beta_{ii}$**  - Quadratic coefficient
- k** - Number of factors
- X<sub>i</sub>** - Independent variable codified
- x<sub>i</sub>** - Independent variable actual
- X<sub>0</sub>** - Independent variable actual value in the central point
- $\Delta X_i$**  - Step change value
- RPM** – Rotação por minuto
- ONPG** - O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
- ONP** - Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside
- MRS** - de Man Rogosa and Sharpe
- M** – Molar
- mM** – Milimol
- ASF** - Ammonium Sulfate Fractionate
- DEAE**- Dietilaminoetil celulose
- SDS-PAGE** - Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
- LDR** – Leite Desnatado reconstituído.

**GRAS** - Generally Recognized As Safe

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

Enzimas são polímeros biológicos, catalisadores de reações químicas altamente específicas, permitindo a condução e controle dos processos químicos a partir das células vivas (HARVEY, 2012). Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, muito superior ao dos catalisadores químicos (LEHNINGER, 2008).

A  $\beta$ -galactosidase, enzima utilizada em escala industrial, principalmente na indústria de alimentos, onde é conhecida por realizar dois importantes processos metabólicos: a hidrólise da lactose que surge como um dos processos biotecnológicos mais importantes nessa atividade industrial, pelo efeito benéfico na assimilação da lactose, bem como uma possível vantagem tecnológica e ambiental de grande aplicação na indústria (GÜRDAS *et al.*, 2012) e as reações de transgalactosilação que foram exploradas na síntese de prebióticos à base de lactose, como galactooligossacarídeos (GOS), lactulose e lactosacarose (SILVÉRIO *et al.*, 2015; 2016; TORRES *et al.*, 2010).

A produção de enzimas tem várias origens: as encontradas em tecido animal e vegetal, podendo ser extraídas e cultivadas *in natura*, respectivamente; e as provenientes do cultivo microbiológico, desenvolvidas por técnicas fermentativas (REGULY, 2000). As fontes microbianas são preferidas, devido a fácil manipulação e rendimento. Apesar disso, o aumento nos custos de produção industrial pode ser um obstáculo, já que esses organismos são geralmente fastidiosos e exigentes quanto a disponibilidade de nutrientes no meio.

A ampliação da utilização industrial da  $\beta$ -galactosidase, tem levado a busca por alternativas que minimizem as despesas, como os subprodutos de baixo valor, que possibilitem a substituição de componentes de custo elevado do meio fermentativo. Aproximadamente 30-40% dos custos envolvidos na produção de enzimas é devido ao meio de cultura utilizado para a fermentação do microrganismo da qual ela é

proveniente, sendo assim a otimização das condições de cultivo é uma estratégia importante para reduzir os custos (JOO; CHANG, 2005).

Existem diversos subprodutos utilizados como fontes alternativas para a produção de  $\beta$ -galactosidase por bactérias, entre eles temos o soro de queijo, que é um dos principais resíduos agroindustriais empregados servindo como fonte de carbono (SANTIAGO *et al.*, 2004; PANESAR, 2008; OBEROI *et al.*, 2008), e a água proveniente da maceração do milho que em substituição do extrato de levedura, serve como fonte de nitrogênio. Porém, segundo Vasiljevic e Jelen (2001), é importante a suplementação com sais minerais e vitaminas, além da necessidade de adicionar fonte de carbono ou de nitrogênio, a depender do resíduo principal no meio de cultivo. Tais resíduos agroindustriais são geralmente lançados na natureza, causando sérios riscos de contaminação ao meio ambiente. O mesmo ocorre com o sobrenadante da produção de microrganismos fotossintetizantes e microalgas.

Nos últimos anos, as microalgas têm despertado bastante interesse como fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis e outros produtos (RITTMANN *et al.*, 2008). Isso porque além de serem facilmente cultivadas, as microalgas contêm em sua biomassa uma grande variedade de compostos bioativos com alto valor industrial em cosméticos, alimentos e nutrição. Porém, a separação dessa biomassa do meio de cultivo gera uma grande quantidade de resíduo líquido sem o destino adequado, sendo o equivalente a 2000L de água para 1kg da biomassa (DEPRAETERE *et al.*, 2015). De acordo com Hadj-Romdhane (2013) esse líquido proveniente do cultivo das microalgas contém metabolitos como lipídios, carboidratos, proteínas e substâncias nitrogenadas que são expelidos durante o crescimento. Sendo assim, a utilização do sobrenadante de microalgas como meio de cultura se torna um via facilitadora do ponto de vista econômico, além de surgir como um novo produto de aplicação biotecnológica.

Sendo assim, o objetivo geral desse trabalho foi produzir, purificar e caracterizar a  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium* utilizando líquido metabólico de microalgas em meio de cultura comercial.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) são bactérias Gram-positivas não-esporulantes encontradas normalmente em produtos lácteos, bebidas, carnes, legumes e na microbiota natural dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais. Elas compreendem a classe mais representativa de organismos probióticos e desempenham papel importante durante o processo de elaboração dos produtos fermentados, tais como: produção de ácido láctico, redução do teor de lactose, melhorias nas características tecnológicas (sensorial, física e química) e melhoria na segurança alimentar (JERONYMO-CENEVIVA *et al.*, 2014).

As BAL constituem um grupo heterogêneo devido aos traços morfológicos, uma vez que podem aparecer na forma de bastonetes ou cocos, como células isoladas ou em pares, podendo formar uma cadeia curta ou longa (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010) dentre os principais gêneros do grupo das BAL estão: *Alkalibacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* (SALMINEN *et al.*, 2004; AXELSSON *et al.*, 2012; HOLZAPFEL AND WOOD, 2014).

A classificação das BAL vai de acordo com o produto final, sendo homofermentativas por produzirem ácido láctico como principal produto ou heterofermentativas pela formação de bioprodutos além do ácido láctico, como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011; CARR *et al.*, 2002). Por isso, a aplicação industrial mais proeminente de BAL é como culturas iniciadoras na produção de alimentos fermentados, especialmente os produtos lácteos (GASPAR *et al.*, 2013).

Devido às suas propriedades metabólicas, as BAL apresentam significativo efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias. Esta atividade antagônica pode ser devido à competição por nutrientes, diminuição do potencial redutor, redução do pH, devido à produção de ácido láctico, produção de compostos inibidores, como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e diacetil (POPPI *et al.*, 2008). Entre as bactérias ácido lácticas, o gênero

*Enterococcus* tem atraído a atenção dos pesquisadores por apresentar uma longa história de uso seguro no processamento de alimentos, devido a produção de bacteriocinas, além das características probióticas (REDONDO *et al.*, 2008)

## 2.2 *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* são bactérias ácido láticas em forma de cocos que podem ser encontradas de forma isolada, pares ou em cadeias curtas, são anaeróbias facultativas, crescem bem em ampla faixa de temperatura (10°C a 45°C), na presença de 6,5% de cloreto de sódio, podem sobreviver em temperaturas de 60°C, bem como suportar ampla variação de pH (CORRÊA *et al.*, 2005).

Anteriormente essas bactérias eram caracterizadas como *Streptococcus* de classe D, mas devido as diferenças genéticas e a sua capacidade de crescer em condições difíceis, a classe D foi removida do gênero *Streptococcus* e agora pertence a um único gênero denominado *Enterococcus* que compreende 54 espécies (EUZÉBY *et al.*, 2015), sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as mais conhecidas.

Estas bactérias são naturalmente encontradas nos tratos gastrointestinal, geniturinário e cavidade oral de humanos e animais, fazem parte da microbiota de diversos alimentos, principalmente produtos lácteos, são também encontrados no solo, na água, em vegetais e em ambientes contaminados (REDONDO *et al.*, 2008).

*Enterococcus* apresentam destaque na indústria alimentícia, devido a habilidade dessas bactérias em acelerar a maturação de queijos, melhorar os atributos tecnológicos em produtos lácteos, além de ajudar na conservação, evitando o crescimento de patógenos (GIRAFFA, 2003). As cepas originais encontradas nesses produtos lácteos fermentados são recomendadas como probióticos benéficos (CALAÇA *et al.*, 2017). Havendo também uma importância clínica, já que esses microrganismos também atuam na melhoria do equilíbrio microbiano intestinal, no tratamento de gastroenterites em humanos e animais e câncer colorretal (DESROUILLÈRES *et al.*, 2015; BAMWO *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm mostrado um papel importante no desempenho de *Enterococcus* na produção de enzimas tais como ciclo maltodextrinase (UNBAN *et al.*, 2018) e b-galactosidase (BADARINATH *et al.*, 2011).

### 2.3 $\beta$ -galactosidase

A hidrólise enzimática é um importante processo biotecnológico na indústria de alimentos, principalmente lácteos. A  $\beta$ -galactosidase é usada para produzir produtos livres de lactose, que é uma abordagem adequada para superar o problema da intolerância que afeta humanos em todo o mundo (HARJU *et al.*, 2012). A intolerância a lactose é um problema relativamente comum. De fato, estima-se que  $\frac{3}{4}$  da população mundial possui intolerância (SAVAIANO, 2017).

A lactose é um dissacarídeo (glicose e galactose) encontrado em alimentos lácteos. Sua absorção depende do funcionamento da enzima  $\beta$ -galactosidase, encontrada na mucosa (microvilos) do intestino delgado (DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2017). Assim, a má digestão da lactose é decorrente da insuficiência ou não persistência da  $\beta$ -galactosidase no organismo (JUAJUN *et al.*, 2011). Esta enzima catalisa o processo hidrolítico das ligações  $\beta$ -1,4-D-galactosídica encontradas na lactose ( $\beta$ -D-galactopiranosil- (1-4) -D-glucopiranosose) e libera D-glucose e D-galactose como produto final (HAIDER E HUSAIN, 2009).

Os produtos da hidrólise da lactose, isto é, glicose e galactose, são mais doces e também mais solúveis que a própria lactose (GANZLE & HAASE, 2008). Sendo assim, a enzima  $\beta$ -galactosidase produzida por microrganismos de grau alimentar podem ser utilizadas na indústria de alimentos e nutricional (JUAJUN, 2011).

Assim, existe um vasto mercado de leite e produtos lácteos sem lactose ou com baixo teor desse dissacarídeo, que pode ser obtido por hidrólise enzimática utilizando  $\beta$ -galactosidase (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além da má digestão da lactose, a cristalização desse dissacarídeo se torna um problema durante a fabricação de produtos lácteos, como o sorvete por exemplo.

Além da hidrólise da lactose, a capacidade da  $\beta$ -galactosidase de formar prebióticos é altamente atraente para a produção de derivados de lactose de valor agregado, como os galacto-oligossacarídeos (GOS), prebióticos que podem estimular o crescimento de bactérias benéficas tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, estão cada vez mais presentes em alimentos funcionais, como por exemplo, em edulcorantes de baixa caloria, produtos lácteos fermentados, doces, pães e bebidas (GANZLE E HAASE., 2008; GOSLING 2010; PARK E OH, 2010).

A  $\beta$ -galactosidase pode originar-se de diferentes fontes, incluindo animais, plantas e microrganismos. Os microrganismos têm favorecido o estabelecimento como principal fonte para produção industrial da enzima, devido a fácil manipulação e o rendimento (HUSAIN *et al.*, 2010; PEREIRA-RODRIGUEZ, 2012). No entanto, apenas algumas fontes microbianas de  $\beta$ -galactosidase são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e elegíveis para uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia (CARDOSO *et al.*, 2017).

Assim os principais microrganismos utilizados na produção comercial de  $\beta$ -galactosidase são as leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, as bactérias *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus sp* e *Streptococcus lactis*. (RUBIO-TEIXEIRA 2006; MONTAÑÉS 2009; LONGO 2008; CARDELLE-COBAS 2008).

A variedade de fontes microbianas determina diferentes características para enzima sintetizada, tais como peso molecular, comprimento da cadeia de aminoácidos, posição do sitio ativo, pH e temperatura ótimos, entre outros. A tabela 1 indica as principais fontes e características da  $\beta$ -galactosidase produzidas por microrganismos onde a temperatura e o pH são variáveis entre diferentes fontes microbianas.

**Tabela 1.** Propriedades da  $\beta$ -galactosidase sintetizada por diferentes fontes microbianas

<b>Microrganismo</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Temperatura ótima (°C)</b>	<b>Referências</b>
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,5	30	Laedro (2002)
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,8	30	Todorova (2006)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	8 - 7,5	60-65	Maischeberger (2010)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	6	50	Chanalia (2018)
<i>Bifidobacterium longum</i>	7	50-55	Saishin (2010)
<i>Enterococcus faecium</i>	8	40	Badarinath & Prakash (2011)

## 2.4 Purificação da $\beta$ -galactosidase

O isolamento e separação de biomoléculas refletem algumas das principais demandas industriais no ramo biotecnológico. A busca por produtos com elevado grau de pureza tem levado ao desenvolvimento de novas estratégias para o seu avanço e produção, visando uma futura aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (CHAVEZ-SANTOSCOY, 2010).

A purificação de proteínas varia desde uma simples etapa de precipitação até processos de produção em larga escala. Na maioria dos casos, é necessário mais de uma etapa para atingir a pureza desejada. A chave para uma purificação eficiente é selecionar as técnicas mais adequadas, otimizando o desempenho para que se atenda as necessidades e combinando tudo de forma a maximizar o rendimento e minimizar o número de passos (AMERSHAM, 2001).

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por microrganismos constitui uma etapa complexa do processo, dadas à diversidade dos meios de cultivo e as variadas características das biomoléculas de interesse. Entre as características dos meios, pode-se citar a elevada proporção de água, a presença de moléculas orgânicas e inorgânicas e os metabólitos distintos da molécula que será purificada (PESSOA, et al 2005).

Diferentes técnicas de separação já foram descritas, porém o mais comum é a cromatografia de troca iônica, sendo usada em 67% dos procedimentos de purificação. Esta técnica consiste na adsorção reversível de moléculas carregadas com grupos iônicos imobilizados numa matriz de carga oposta, onde a afinidade da proteína com a coluna é conseguida por intermédio de ligações iônicas. Os trocadores de íons mais aplicados são o dietilaminoetilo (DEAE), responsável pela troca aniônica (58%), e o carboximetilo (CM), para troca catiônica (20%) (VENKATANAGARAJU *et al.*, 2014; MOHAMMED, 2017; COSKUN, 2016).

Segundo estudos de purificação de  $\beta$ -galactosidasas diversas técnicas são usadas, sendo a maioria de alta resolução utilizando combinações de cromatografias de afinidade e troca iônica. Alguns exemplos podem ser vistos na tabela 2.

**Tabela 2.** Etapas utilizadas no processo de purificação de  $\beta$ -galactosidase.

Fontes	Etapas de Purificação	Fator de purificação	Referências
<i>Bacillus megaterium</i>	Precipitação em sulfato de amônio, diálise, cromatografia em coluna de fluxo rápido DEAE- sepharose e de afinidade.	*INF	Li et al (2009)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cromatografia de permuta iônica em Ni Sepharose e ultrafiltração	5,3	Juajun et al (2011)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Precipitação em sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex.	66	Nagy et al (2001)
<i>Enterococcus faecium</i>	Precipitação em sulfato de amônio, DEAE celulose e Sephadex G-150	5,23	Badarinath et al (2011)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Precipitação em sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel e de permuta iônica.	3,06	Chanalia (2018)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Cromatografia de filtração em gel, troca iônica e de afinidade	5,4	Mazi (2016)

\*INF= Informação não fornecida

## 2.5 Reciclagem do sobrenadante de microrganismos fotossintetizantes

O resíduo industrial é um dos maiores responsáveis pelas agressões ao meio ambiente. Principalmente com a crescente industrialização em regiões ainda em desenvolvimento, onde nem sempre há o preparo para o tratamento ou pelo menos o armazenamento adequado desses efluentes. O despejo de efluentes industriais sem o tratamento devido pode resultar em graves problemas ambientais, dentre eles, a deterioração dos ambientes naturais levando a morte da fauna, rios e lagos (KUMMER *et al.*, 2011). Assim, a melhor forma para minimizar esse impacto ambiental é reduzir a geração dos resíduos através do controle de processos e buscar alternativas de reciclagem e reutilização desses produtos gerados.

Nos últimos anos, as microalgas ou microrganismos fotossintetizantes têm sido foco de muitos estudos. Esses microrganismos autotróficos são cultivados para produzir numerosos produtos de alto valor, como vitaminas, pigmentos, proteínas, ácidos graxos, polissacarídeos, etc. As microalgas representam uma enorme biodiversidade a partir da qual cerca de 40.000 já foram descritas ou analisadas (HU *et al.*, 2008). Dentre os microrganismos fotossintetizantes podemos citar os gêneros *Arthrospira* (*Spirulina*), *Dunaliella* e *Chlorella*.

Muitos estudos têm relatado que há uma tendência do mercado das microalgas com compostos de alto valor se expandir significativamente (RICHMOND, 2004; BOROWITZKA, 2013; SPOLAORE *et al.*, 2006) tendo em vista sua ampla aplicabilidade, tais como: alimento para animais; para fins cosméticos; na indústria farmacêutica; como suplemento nutricional para o consumo humano, bem como para o controle de peso, por possuir altos índices de vitaminas, polissacarídeos e proteínas e como fertilizantes ou mesmo pigmentos. O potencial das microalgas está se expandindo principalmente na indústria de combustíveis (AZEREDO, 2012). Só em 2011, foi estimado um aumento de aproximadamente 10.000 toneladas de biomassa por ano (JENCK *et al.*, 2011).

A obtenção da biomassa é preocupante, pois uma grande quantidade de resíduo líquido é gerado. Segundo Depraetere (2015) para obtenção de 1kg de massa seca, as microalgas requerem 2000L de água para permanecerem em suspensão durante o cultivo.

A viabilidade da reutilização de sobrenadante de microalgas como meio de cultura ainda é pouco explorado. Alguns estudos mostraram que a reciclagem do meio de cultura para o crescimento de microalgas pode apresentar efeitos negativos devido ao acúmulo de metabólitos orgânicos que são naturalmente excretados durante o crescimento ou que são repentinamente liberados quando a lise celular ocorre, tais como substâncias derivadas por oxidação (WU *et al.*, 2006; BOSMA *et al.*, 2008). Poucos efeitos no crescimento de *Scenedesmus* foram observados por Kim *et al* (2015), já no trabalho de Rodolfi *et al* (2003) foi constatado que a *Nannochloropsis sp* sofreu inibição do crescimento em cultivo reutilizado.

Por outro lado, a aplicabilidade do sobrenadante para o crescimento de outros tipos de microrganismos como o executado por Parada *et al* (1998) que observaram

a presença de exopolissacarídeos e outros componentes no sobrenadante de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) que favoreceram no crescimento de bactérias ácido lácticas. Diante disso, a reciclagem do sobrenadante proveniente do crescimento de microrganismos fotossintetizantes pode ser uma fonte interessante para o cultivo de microrganismos como as bactérias.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium* utilizando líquido metabólico de *microalgas* em meio de cultura comercial.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Seleção do meio para produção de  $\beta$ -galactosidase de *E.faecium* contendo diferentes concentrações do sobrenadante das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* e *Scenedesmus* sp. em meio comercial.
- Produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase a partir de *Enterococcus faecium*, utilizando planejamentos experimentais para a obtenção das melhores condições de produção utilizando o meio selecionado.
- Purificação da enzima  $\beta$ -galactosidase através da precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica.
- Avaliar o grau de pureza da  $\beta$ -galactosidase através de eletroforese SDS-PAGE monodimensional.
- Caracterizar a enzima purificada quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade a variação de pH e temperatura.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; ZENDO, TAKESHI, Z.; HANADA, K.; SHIBATA, K.; SONOMOTO, K. Efficient homofermentative L-(=+)- Lactic acid production from xilose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.77, p. 1892-1895, 2011.

AMERSHAM BIOSCIENCES AB. Protein Purification Handbook. 98p.Uppsala, Sweden, 2001.

AXELSSON, L.; RUD, I.; NATERSTAD, K.; BLOM, H.; RENCKENS, B.; BOEKHORST, J.; et al.. Genome sequence of the naturally plasmid-free *Lactobacillus plantarum* strain NC8 (CCUG 61730). *J. Bacteriol.*, v. 194, p. 2391-2392, 2012.

AZEREDO, V.B.S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BADARINATH, V.; PRAKASH, M.H. Purification of new  $\beta$ -galactosidase from *Enterococcus faecium* MTCC 5153 with transgalactosylation activity. *Food, Biotechnol.*, v. 25, p. 225-239, 2011.

BAMWO, K.; SANNI, A.; TAN, H. Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 144, p. 229-241, 2012.

BOROWITZKA, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. *Micro-algal biotechnol.* Cambridge University press, Cambridge., p. 153-196, 1988.

BOSMA, R., MIAZEK, K., WILLEMSSEN, S.M., VERMUE, M.H., WIJFFELS, R.H. Growth inhibition of *Monodus subterraneus* by free fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 101, p. 1108–1114, 2008.

CALAÇA, P.R.A.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.F.L.; CAVALCANTI, M.T.H. Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 37, p 587-592, 2017.

CARDOSO, B. B.; SILVÉRIO, S.C.; ABRUNHOSA, L.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L. R.  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 28, p.281-370, 2002.

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; ATTRI, P.; DHANDA, S. Purification and Characterization of  $\beta$ -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioor. Chem.*, v. 77, p. 176-189, 2018.

CHAVEZ-SANTOSCOY, A., BENAVIDES, J., VERMAAS,W., & RITO-PALOMARES, M. Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive

fermentation of cyanobacterial products. *Chemical Engineering and Technology*, v. 33, n. 1, p. 177-182, 2010.

CORRÊA, A. A.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistência a antimicrobianos em *Enterococos* isolados de amostras de fezes de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 155-159, 2005.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

DEPRAETERE, O.; PIERRE, G.; NOPPE, W.; et al. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*, v. 10, p. 48–54, 2015.

DESROUILLÈRES K., MILLETTE M., VU K.D., TOUJA R. & LACROIX M. Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *J. Funct. Foods.*, v. 17, p.816-827, 2015.

ELZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acesso em 12.nov.2015.

GASPAR ,P.; CARVALHO, A.L.; VINGA, S. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv.*, v. 31, p.764–88, 2013.

GIRAFFA, G.; LAZZI, C.; GATTI, M.; ROSETTI, L.; MORA, D.; NEVIANI, E. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein coding genes. *Inter. J. Food Microbiol.*, v. 82, p.163-172, 2003.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B.J.B. *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. New York, NY, 2014.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant. J.*, v. 54, p. 621-39, 2008.

HUSAIN, Q.  $\beta$ -galactosidases and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 30, p. 41–62, 2010.

JENCK, J.; LÉPINE, O.; LEGRAND, J.; DRENO, P.; GRIZEAU, D.; DUPRÉ, C. Valorisation industrielle des microalgues photosynthétiques. *Techniq. l'INGÉN IN201.*, 2011.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; PAULA, A. T. , SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.v.6, p. 141–156, 2014.

JUAJUN O., NGUYEN T.-H., MAISCHBERGER T., IQBAL S., HALTRICH D., YAMABHAI M. Cloning, purification, and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, p. 645–654, 2011.

- KIM, Y. S., PARK, C. S., & OH, D. K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enz. Microbial Technol.*, v.39, 903–908, 2006.
- KUMMER, A.C.B.; ANDRADE, L.; GOMES, S.D.; FAZOLO, A.; HASAN, S.D.M.; MACHADO, F. Tratamento de efluente de abatedouro de tilápia com adição de manipueira na fase anóxica. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v.31, n.1, p.150-157, 2011.
- MAZI, B. G.; HALUK, H.; DAVID, M.O.; DUNGAN, S. R. Single-step partial purification of intracellular  $\beta$ -galactosidases from *Kluyveromyces lactis* using microemulsion droplets., v. 180, p. 1000-1015, 2016.
- MOHAMMED, J. S. A brief review on Ion Exchange Chromatography. *PharmaTutor*, v. 5, n. 2, p. 30-38, 2017.
- NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S.  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification and characterization of the enzyme., v. 21, p. 24-29, 2001.
- PARADA, J.; CAIRE, G.Z.; MULE, Z.; CANO, M.M.S. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *Inter. J.Food, Microbiol.*, v. 45, p. 225-228, 1998.
- PESSOA A, KILIKIAN B. Purificação de produtos biotecnológicos. 1ed. Barueri-SP: Manolle; 2005.
- POPPI, L. B.; MANCILHA, I. M.; FERREIRA, A. J. P.; LEAL, D. D. M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n.2, p.113-119, 2008.
- REDONDO, N. C. Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416. 93f. Dissertação. (Mestrado em Alimentos e Nutrição, Área Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Science Ltd, Oxford, 2004.
- RODOLFI, L., ZITTELLI, G.C., BARSANTI, L., ROSATI, G., TREDICI, M.R., Growth médium recycling in *Nannochloropsis sp.* mass cultivation. *Biomol. Engin.*, v. 20, p.243–248, 2003.
- SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.*, v. 27, p. 691-697, 2010.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects. 3rd Edn., New York, NY: Marcel Dekker 2004.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 101, p. 87-96, 2006.
- UNBAN, K.; KANPIENGJAI, A.; LUMYONG, S.; NGUYEN, T.; HALTRICH, D.; KHANONGNUNCH, C. Molecular structure of cyclomaltodextrinase derived from amylolytic lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* K-1 and properties of recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli* and *Lactococcus plantarium*. *Inter. J.Biol.Macromol.*, 107, 898-905, 2018.

VENKATANAGARAJU, E.; DIVAKAR, G.; SWETHA, C. Overview on fibrinolytic proteases purification strategies. *International Journal of Pharmacy Research & Science*, v. 2, n. 3, p. 232-246, 2014.

WU, J.T., CHIANG, Y.R., HUANG, W.Y., JANE, W.N. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology*, v. 80, p. 338–345, 2006.

## CAPÍTULO II

Otimização da produção de  $\beta$ -galactosidase por *Enterococcus faecium* utilizando sobrenadante de microalgas em meio de cultura comercial.

Elaine Cristina da Silva<sup>1</sup>; Raquel Pedrosa Bezerra<sup>1</sup>; Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1</sup>;  
Maria Taciana Holanda Cavalcanti<sup>1</sup>

1.Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil.

**Resumo:** Bactérias ácido lácticas tais como *Enterococcus faecium* possuem grande potencial de mercado devido aos seus efeitos probióticos e na conservação de alimentos. Essas bactérias também sintetizam proteínas enzimáticas de interesse industrial, como a  $\beta$ -galactosidase (lactase). No entanto, a produção em larga escala desse produto gera altos custos de meio de cultivo, levando a busca de alternativas para a substituição total ou parcial dele. O sobrenadante proveniente do cultivo de microalgas possui substâncias bioativas que podem inibir ou promover o crescimento microbiano assim como seus bioprodutos. O objetivo deste trabalho foi investigar a otimização das condições de produção da  $\beta$ -galactosidase por *E. faecium* em meio contendo sobrenadante de microalgas utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR). Inicialmente a produção da enzima foi testada utilizando concentrações de 25-100% do sobrenadante de três microalgas diferentes (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* e *Scenedesmus* sp) adicionado em meio comercial TSB (Tryptone Soy Broth). Os resultados mostraram que o sobrenadante de *C. vulgaris* em meio comercial foi o melhor produtor da enzima atingindo atividade de 22,68 U/ml. Visando aprimorar a produção de  $\beta$ -galactosidase foi realizado um planejamento experimental 2<sup>4</sup> e 2<sup>3</sup>, utilizando como parâmetros a temperatura, concentração de lactose, pH e tempo de fermentação. As variáveis pH, temperatura e concentração de lactose influenciaram significativamente na produção de  $\beta$ -galactosidase e o tempo de fermentação foi fixado em 12h uma vez que demonstrou pouco efeito significativo de acordo com os resultados do primeiro planejamento. Os níveis das variáveis encontradas foram 31°C, pH 8 e 5% de lactose. Nessas condições obtivemos produção máxima de  $\beta$ -galactosidase de 29,76 U/ml. Os resultados obtidos neste relatório mostraram que a substituição parcial do meio de cultura comercial utilizando sobrenadante de *Chlorella vulgaris* foi efetivo na síntese de  $\beta$ -galactosidase e com o modelo estatístico utilizado foi possível maximizar a síntese da enzima em meio de baixo custo.

**Palavras-chave:** Lactose; resíduo agroindustrial; bactérias ácido lácticas.

**Abstract:** Lactic acid bacteria such as *Enterococcus faecium* have great market potential due to its probiotic effects and in food preservation. These bacteria also synthesize enzymatic proteins of industrial interest, such as a  $\beta$ -galactosidase (lactase). However, large-scale production of the product generates high costs, leading to the search for alternatives for a total or partial replacement of the product. The supernatant from the microalgae culture has bioactive substances that can inhibit or promote microbial growth as well as its bioproducts. The aim of this work was to investigate the optimization of  $\beta$ -galactosidase production conditions by *E. faecium* in medium containing supernatant of microalgae using Response Surface Methodology (RSM). Initially, enzyme production was tested using concentrations of 25-100% of residue from the culture of three different microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* and *Scenedesmus sp*) added in commercial TSB (Tryptone Soy Broth) medium. The results showed that the concentration of 50% of *C. vulgaris* supernatant in commercial medium was the best producer of the enzyme with activity of 21.78 U/ ml. Aiming to improve the production of  $\beta$ -galactosidase for the experimental design  $2^4$  and  $2^3$ , using as a parameter the temperature, lactose concentration, pH and fermentation time. The variables pH, temperature and lactose concentration were significantly related to the production of  $\beta$ -galactosidase and the fermentation time was fixed at 12h since it showed little significant effect according to the results of the first model. The levels of the variables found were 31 °C, pH 8 and 5% lactose. Under these conditions the model predicted a maximum  $\beta$ -galactosidase production of 29.76 U/ ml. The results obtained in this report showed that the partial substitution of the commercial culture medium using *Chlorella vulgaris* supernatant was effective in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase and with statistical model it was possible to maximize the synthesis of the enzyme in a low cost medium.

**Keywords:** Lactose; agroindustrial waste; Lactic acid bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

As Bactérias Ácido Láticas (LAB) constituem um grupo diversificado de *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. A  $\beta$ -galactosidase derivada de LAB é amplamente estudada devido aos aspectos de segurança e aplicação em indústrias alimentares (NGUYEN *et al.*, 2012). Essa enzima desempenha um papel importante na redução de algumas dificuldades tecnológicas associadas ao processamento de alimentos, como o teor de lactose, baixa solubilidade, fácil cristalização e falta de doçura (GOSH *et al.*, 2003). Dentre as reações realizadas pela  $\beta$ -galactosidase está a hidrólise dos resíduos terminais não redutores encontrados na lactose ( $\beta$ -D-galactose em  $\beta$ -D-galactosídeos) (PEREIRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012) e transgalactosilação levando a síntese de galactooligossacarídeos (GOSLING *et al.*, 2010).

A produção extensiva de enzimas por microrganismos tem levado a busca por alternativas que visam a diminuição dos custos nos processos industriais. Principalmente quando o microrganismo é fastidioso e requer numerosos fatores de crescimento como as BAL (STILES e HOLZAPFEL, 1997). Existe um interesse crescente na utilização de resíduos agroindustriais por ser uma alternativa de baixo custo e com menor impacto ambiental, uma vez que esses resíduos não possuem destinação adequada.

Nos últimos anos, as microalgas foram reconhecidas como uma fonte promissora de matéria-prima de biomassa sustentável para a produção de muitos produtos adicionados, incluindo nutrição alimentar, farmacêutica e cosmética, produtos fitossanitários, biocombustíveis, rações (animais e aquicultura) e corantes naturais (HAN *et al.*, 2016; GULDHE *et al.*, 2017). Para a produção industrial de produtos à base de microalgas, é necessário acumular uma grande quantidade de biomassa em larga escala e com isso o processo de cultura também precisa de grandes quantidades de água e nutrientes (WANG *et al.*, 2018).

Alguns estudos têm mostrado que as microalgas não consomem totalmente os nutrientes contidos no meio de cultura, como também existem relatos de que esses metabólitos (lipídios, polissacarídeos, proteínas e outros componentes nitrogenados) são liberados pelas microalgas durante o crescimento quando o estresse fisiológico

ou a lise celular ocorrem. Principalmente em culturas com altas concentrações de biomassa (FOGG, 1966; 1971; RICHMOND *et al.*, 2004). Portanto, a aplicação de métodos de reciclagem motivados pela geração simultânea de produtos de alto valor a partir do meio gasto tem potencial nas perspectivas comercial e ambiental (LIU *et al.*, 2016).

De acordo com Markou *et al* (2014) no que se refere à nutrientes deixados no meio de cultivo após a colheita de biomassa, uma estratégia é reciclar o meio e complementar apenas os nutrientes esgotados. A otimização de constituintes do meio também é um passo crucial que pode ser utilizado para aumentar a produção de enzimas a fim de atingir um rendimento de produção (KARAM *et al.*, 2016). A reciclagem de sobrenadante de microalgas para produção de enzimas ainda não foi relatado na literatura. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi selecionar um meio alternativo contendo sobrenadante proveniente do cultivo de microalgas em meio comercial para produção da  $\beta$ -galactosidase de *E.faecium* e por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR) obter a melhor condição de produção da enzima.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo:

*Enterococcus faecium* foi obtido da coleção de Bactérias Ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal pertencente ao Laboratório de Bioativos (Labtecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A bactéria foi previamente identificada e estocada em leite desnatado reconstituído (LDR) 10% de glicerol sob 4°C de congelamento. As culturas foram reativadas por duas vezes em LDR (Leite Desnatado Reconstituído) 10%, em seguida em TSB (Tryptone Soy Broth) e incubadas a 37°C durante 24h entre as reativações.

## 2.2 Produção do meio alternativo

O sobrenadante de 3 microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp* e *Dunaliella tertiolecta*) foram cedidos pelo Laboratório de Bioativos (Labtecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O sobrenadante foi separado das células na fase estacionária por meio da centrifugação (10000rpm, 10min, 4°C) em seguida foram adicionados em meio comercial TSB (Tryptone Soy Broth) nas concentrações de acordo com a tabela 1 e esterilizados (15 min a 121°C). As culturas foram crescidas durante 48h em temperatura de 37°C.

**Tabela 1.** Meio alternativo contendo sobrenadante de microalgas em diferentes concentrações para produção de  $\beta$ - Galactosidase por *E.faecium*.

Meio alternativo	
Sobrenadante (%)	TSB (%)
25	75
50	50
75	25
100	0

## 2.3 Extração da enzima:

Após o período de cultivo, as células foram centrifugadas (8000 rpm, 10min, 4°C), lavadas em tampão 0,1M fosfato de sódio pH 7 e ressuspendidas no mesmo tampão. As células foram submetidas a lise utilizando sonicador (Sonoplus, bandelin) e novamente centrifugadas para obtenção da enzima intracelular.

## 2.4 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase:

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com o procedimento de Nagy et al (2001) modificado onde  $8,3 \times 10^{-3} \text{M}$  do substrato cromogênico o-nitrofenol-b-D-galactopiranosídeo (ONPG – Sigma Co, USA) foi dissolvido em 0,05M tampão fosfato pH 7. Foram adicionados 50ul do substrato e 50ul da enzima em microplaca de 96 poços e incubados em estufa por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A reação foi parada com adição de 200ul de carbonato de sódio 0,1M e a absorbância foi determinada a 405 nm (leitor de microplaca Bio-rad, modelo imark, Japão). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de ONP por minuto sob as condições do ensaio.

## 2.5 Planejamento experimental:

Com o objetivo de verificar a influência das variáveis na produção da  $\beta$ -galactosidase, foram realizados dois planejamentos utilizando o Statistic 7.0 software sendo o primeiro  $2^4$  com as variáveis independentes: concentração de lactose, pH, temperatura e tempo de fermentação e seus respectivos níveis mostrados na tabela 2.

**Tabela 2.** Níveis e variáveis utilizados no planejamento fatorial  $2^4$  pra produção da  $\beta$ -galactosidase.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	30	35	40
Concentração de lactose %	0	2,5	5
pH	6	7	8
Tempo de fermentação	12	18	24

Em seguida, um planejamento central composto  $2^3$  foi utilizado para obter as melhores condições experimentais e pontos centrais para estimar a variabilidade do processo para produção da  $\beta$ -galactosidase como resposta (Y). Apenas as variáveis que influenciaram estatisticamente na produção da enzima foram testadas. A combinação foi testada, resultando em um conjunto de 16 experimentos, com 5 pontos centrais (Tabela 3).

Os coeficientes de regressão linear, quadrática e as interações para cada variável foram determinados e ajustados para uma equação polinomial de segunda ordem.

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Onde  $Y_i$  é a resposta prevista,  $\beta_0$  é o coeficiente constante,  $X_{ij}$  são variáveis de entrada que influenciam a variável de resposta Y;  $\beta_i$  é o coeficiente linear;  $\beta_{ii}$  o coeficiente quadrático e  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação, k é o número de fatores.

Neste estudo, os níveis codificados foram utilizados em vez dos valores atuais das variáveis independentes para regressão. Para cálculo estatístico, as variáveis foram codificadas de acordo com a equação.

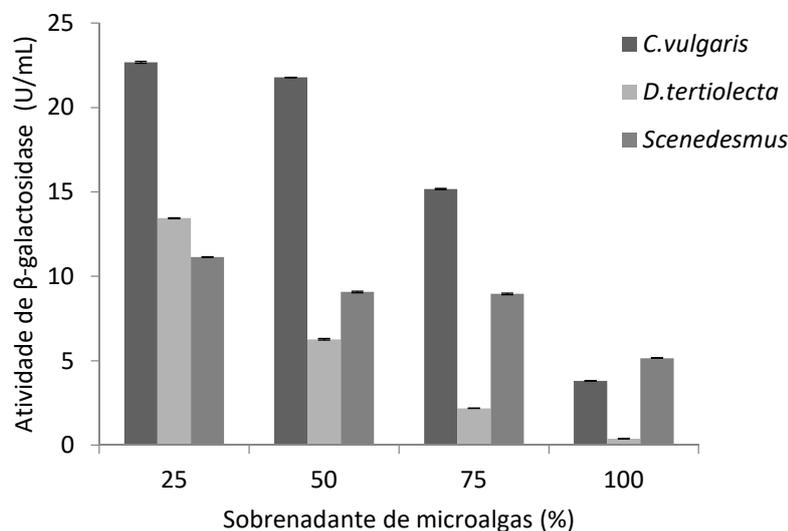
$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad (2)$$

onde  $X_i$  é o valor codificado variável independente,  $x_i$  é o valor real variável independente,  $x_0$  é o valor real variável independente no ponto central e  $\Delta x_i$  é o valor da mudança de etapa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Seleção do meio alternativo para produção de $\beta$ -Galactosidase:

Os valores de atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase produzida por *E.faecium* em meio alternativo são mostrados na figura 1. Os resultados desse experimento mostraram que em baixas concentrações do sobrenadante de microalgas, a atividade da enzima é aumentada. Dentre todos os meios, a maior atividade encontrada foi de 22,68 e 21,78 U/ml com concentração de 25 e 50% do sobrenadante de *Chlorella vulgaris*, respectivamente. Porém, com o aumento da quantidade de sobrenadante a atividade diminui gradativamente em todos os ensaios.



**Figure 1.** Atividade de  $\beta$ -galactosidase produzida em diferentes meios contendo sobrenadante de microalgas.

Na adição do sobrenadante de *Scenedesmus sp* e *D.tertiolecta*, foram encontradas valores de atividade inferiores aos de *C.vulgaris*, sendo 13,44 e 11,14 U/ml respectivamente com 25% de concentração (Figura 1). Esse fato pode ser atribuído ao esgotamento dos nutrientes do meio comercial a medida que ocorre o aumento da concentração do sobrenadante, onde o mesmo pode não exercer influencia na reposição desses nutrientes ou até mesmo pode atuar como inibidor da produção da enzima. Visto que o sobrenadante possui uma composição que é resultado de uma determinada condição de cultivo como também de algumas características fisiológicas que diferencia uma microalga da outra.

O sobrenadante da *D.tertiolecta*, por exemplo, vem de um cultivo concentrado em NaCl, uma vez que essa microalga é destinada para a produção de biodiesel devido a grande quantidade de lipídios produzidos por ela sob estresse salino (KUMAR *et al.*, 2018). Neste caso, a utilização do sobrenadante proveniente do cultivo de *D.tertiolecta* pode resultar num efeito inibitório para a produção da enzima, como mostrado na figura 1. Malakar *et al.* (2014) relataram que altas concentrações de NaCl não apenas inibe a síntese de  $\beta$ -galactosidase, mas também na sua atividade, como foi observado em seus estudos usando *E. coli* para produzir a enzima. Sendo assim, pode-se aferir que o sobrenadante de *D.tertiolecta* suprimiu a produção da enzima devido a concentração de NaCl presente no meio.

Com relação ao meio contendo sobrenadante do *Scenedesmus sp*, Pektov *et al* (2010) descobriram em seus estudos que esse gênero excreta pouca quantidade de substâncias no meio, mantendo um baixo potencial nutricional para o desenvolvimento de bactérias. A produção da  $\beta$ -galactosidase de um dado microrganismo depende das características do meio e para atingir uma atividade máxima é necessário um meio rico (VASILJEVIC *et al.*, 2003) . Isso demonstra que a limitada quantidade de nutrientes presentes no sobrenadante de *Scenedesmus sp* não impulsionou a produção da  $\beta$ -galactosidase.

Os resultados mostraram que a adição do sobrenadante de *C.vulgaris* exerceu efeito positivo frente ao esgotamento de nutrientes. De acordo com Hadj-Homdhane *et al* (2013) ao caracterizar o sobrenadante dessa microalga, foram detectados como componentes mais abundantes materiais orgânicos, principalmente polissacarídeos e em menor quantidade o nitrogênio e proteínas. Também foi confirmada a presença de bactérias no sobrenadante, cujo gênero não foi divulgado pelo autor. Isso indica que o meio possui constituintes favoráveis para o desenvolvimento de bactérias. Portanto, a melhor condição para a produção da  $\beta$ -galactosidase por *E.faecium* é com a adição de sobrenadante de *C.vulgaris* tornando-o um meio econômico e sustentável.

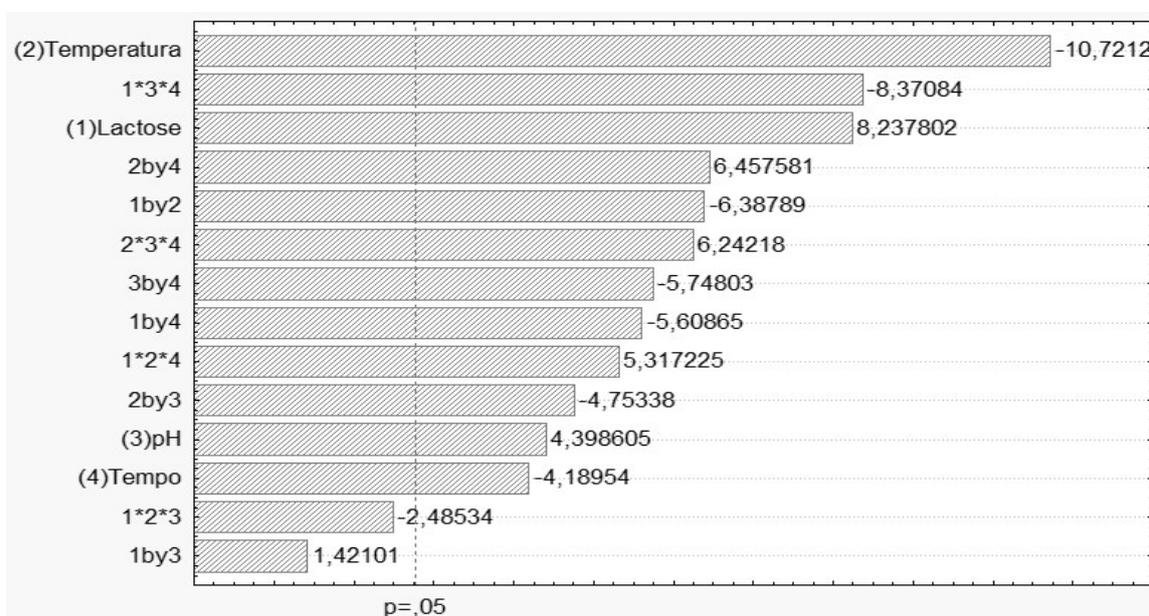
### 3.2 Planejamento fatorial completo:

Um delineamento fatorial  $2^4$  completo foi utilizado para avaliar a interação das variáveis (tempo de fermentação, temperatura, pH e concentração de lactose) utilizadas na produção de  $\beta$ -galactosidase presente na matriz da tabela 3. A maior atividade de  $\beta$ -galactosidase encontrada foi de 30,2 U/mL obtida no ensaio 6, correspondendo a 12 horas de fermentação, 30°C de temperatura, pH 8,0 e 5% (p/v) da concentração de lactose.

**Tabela 3.** Matriz contendo as condições experimentais e valores de atividade da  $\beta$ -galactosidase obtidos para *Enterococcus faecium*.

Variáveis independentes (valor real e codificado)					Variável dependente
Ensaio	Lactose (%)	Temperatura (°C)	pH	Fermentação time (h)	Atividade de $\beta$ -galactosidase (U/ml)
1	0(-1)	30(-1)	6(-1)	12(-1)	11.8
2	5(+1)	30(-1)	6(-1)	12(-1)	14.2
3	0(-1)	40(+1)	6(-1)	12(-1)	10.2
4	5(+1)	40(+1)	6(-1)	12(-1)	11.0
5	0(-1)	30(-1)	8(+1)	12(-1)	12.5
6	5(+1)	30(-1)	8(+1)	12(-1)	30.2
7	0(-1)	40(+1)	8(+1)	12(-1)	9.85
8	5(+1)	40(+1)	8(+1)	12(-1)	10.7
9	0(-1)	30(-1)	6(-1)	24(+1)	10.5
10	5(+1)	30(-1)	6(-1)	24(+1)	16.6
11	0(-1)	40(+1)	6(-1)	24(+1)	10.5
12	5(+1)	40(+1)	6(-1)	24(+1)	12.0
13	0(-1)	30(-1)	8(+1)	24(+1)	14.0
14	5(+1)	30(-1)	8(+1)	24(+1)	10.9
15	0(-1)	40(+1)	8(+1)	24(+1)	11.5
16	5(+1)	40(+1)	8(+1)	24(+1)	11.2
17	2,5(0)	35(0)	7(0)	18(0)	11.7
18	2,5(0)	35(0)	7(0)	18(0)	13.7
19	2,5(0)	35(0)	7(0)	18(0)	13.3
20	2,5(0)	35(0)	7(0)	18(0)	13.1
21	2,5(0)	35(0)	7(0)	18(0)	13.3

Para avaliar os efeitos estimados das variáveis independentes e interações na resposta, foi feito um gráfico de pareto representado na figura 2. Os resultados mostraram que todas as variáveis estudadas surtiram efeito significativo na produção de  $\beta$ -galactosidase. Dentre os parâmetros, o efeito do tempo de fermentação foi inferior em relação aos demais, indicando a diminuição do mesmo. Assim, um segundo planejamento fatorial completo  $2^3$  foi empregado com o objetivo de avaliar a resposta referente ao primeiro planejamento para atividade da  $\beta$ -galactosidase.



**Figura 2.** Gráfico de Pareto com o efeito da interação das variáveis na produção de  $\beta$ -galactosidase.

Os resultados obtidos do planejamento composto central  $2^3$  com os níveis de fatores totalizando 16 ensaios ligeiramente modificados, seguindo a tendência dos efeitos do primeiro desenho estão presentes na tabela 4. A maior produção de  $\beta$ -galactosidase encontrada foi de 30,6 U/mL obtida por um dos pontos centrais (11), correspondendo aos mesmos resultados obtidos no primeiro teste (30 °C de temperatura, 5% de concentração de lactose e pH 8).

**Tabela 4.** Condições experimentais e valores de atividade da  $\beta$ -galactosidase obtidos para *Enterococcus faecium* usando um planejamento fatorial completo de 2<sup>3</sup>.

Variáveis independentes (valores reais e codificados)				Variável dependente
Ensaio	Temperatura °C	Lactose (%)	pH	Atividade da $\beta$ -galactosidase (U/ml)
1	25(-1)	4(-1)	7.5(-1)	5.20
2	35(+1)	4(-1)	7.5(-1)	13.5
3	25(-1)	6(+1)	7.5(-1)	7.00
4	35(+1)	6(+1)	7.5(-1)	15.1
5	25(-1)	4(-1)	8.5(+1)	10.0
6	35(+1)	4(-1)	8.5(+1)	16.5
7	25(-1)	6(+1)	8.5(+1)	12.4
8	35(+1)	6(+1)	8.5(+1)	19.2
9	30(0)	5(0)	8(0)	28.9
10	30(0)	5(0)	8(0)	29.3
11	30(0)	5(0)	8(0)	30.6
12	30(0)	5(0)	8(0)	29.0
13	30(0)	5(0)	8(0)	29.0
14	35(+1)	8(3)	9(2)	3.40
15	35(+1)	5(0)	9(2)	1.20
16	35(+1)	8(3)	8(0)	4.00

A análise de variância (ANOVA) para produção de  $\beta$ -galactosidase é mostrada na Tabela 5. Os resultados do modelo de superfície de resposta de acordo com o ANOVA, indicaram que os efeitos linear e quadrático da temperatura, pH, concentração de lactose e a interação entre as variáveis foram significativos para a resposta da atividade de  $\beta$ -galactosidase com valores de  $p < 0,05$ .

O coeficiente de determinação  $R^2$  foi de 96,4%, sugere que o modelo foi uma ferramenta eficiente para determinar os efeitos das variáveis na produção da  $\beta$ -galactosidase por *E.faecium*. De acordo com Haaland *et al* (1989) se houver muitos termos no modelo e se o tamanho da amostra não for muito grande, o  $R^2$  ajustado deve ser visivelmente mais baixo do que o  $R^2$ . Neste caso, o valor de  $R^2$  ajustado

(0.933) foi inferior ao  $R^2$  (0.964), indicando que o modelo está ajustado. Sendo assim, pode-se deduzir que o modelo polinomial quadrático e linear foram significativos e adequados para representar a interação real entre a variável dependente da resposta e as variáveis independentes.

**Tabela 5.** Análise de variância para a produção de  $\beta$ -galactosidase

Fatores	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valores de F	Valores de P
Modelo	1681.27	1			0.0000
A-Temperatura (°C) (L)	86.954	1	86.95	171.55	0.0001
Temperatura (°C) (Q)	146.678	1	146.67	289.38	0.0000
B-Concentração de lactose (%) (L)	89.802	1	89.80	177.16	0.0226
Concentração de lactose (%) (Q)	117.831	1	117.87	232.46	0.0001
C-pH (L)	26.015	1	26.01	51.32	0.0015
pH (Q)	185.902	1	185.90	366.76	0.0000
D-BC	62.827	1	62.82	123.95	0.0003
Erro puro	0.5069	1			
Falta de ajuste	57.776	4			
Cor total	1.681.277	15			

$R^2 = 0.964$  e  $Adj R^2 = 0.933$ .  
Valor de P significativa  $< 0.05$ .

O modelo obtido é representado pela Eq. 3. A equação de regressão polinomial de segunda ordem para a produção de  $\beta$ -galactosidase foi correlacionada com uma relação empírica entre a atividade de  $\beta$ -galactosidase e as variáveis de teste em unidades codificadas e é dada a seguir, onde Y representa a produção de  $\beta$ -galactosidase, X1 a temperatura, X2 concentração de lactose e X3 o pH.

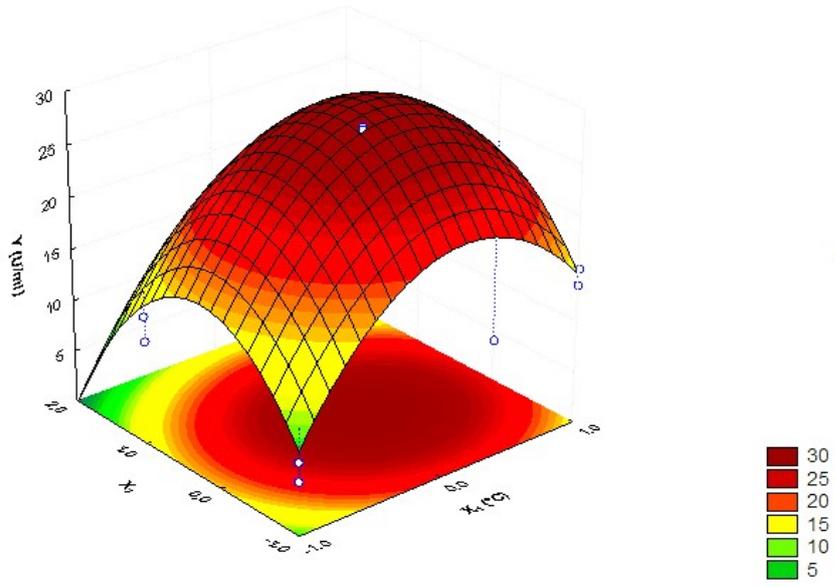
$$Y = 29.36 + 3.24 - X_1^2 + 0.90 - X_2^2 + 1.90 - X_3^2 + 2$$

(3)

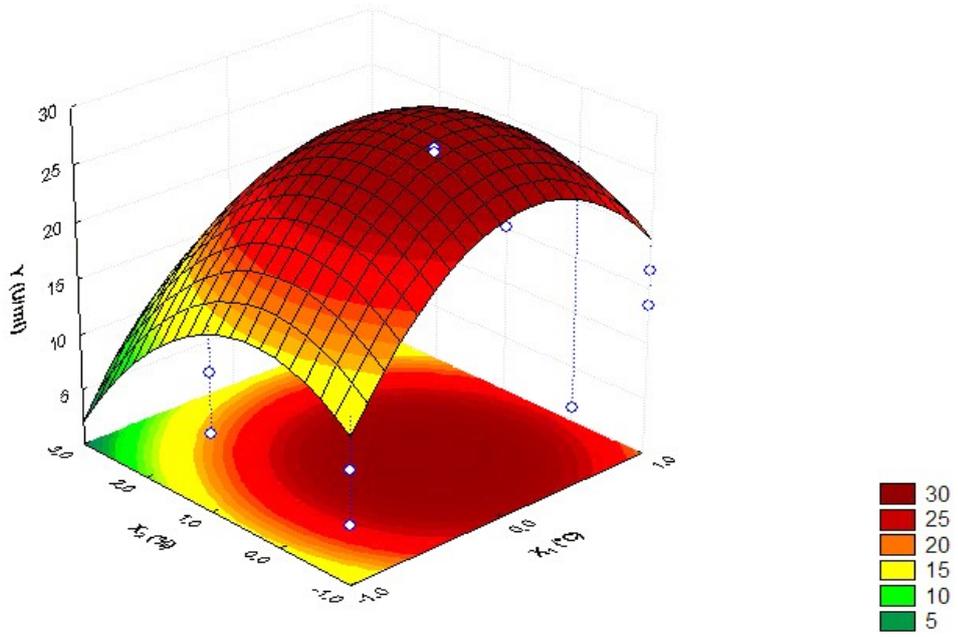
Este modelo foi validado através de experimentos reais, realizados em triplicata, onde o valor foi de 29,86 U/mL, enquanto o valor previsto pelo modelo estatístico foi de 30,83 U/mL, isso sugere que o modelo foi perfeitamente ajustado à realidade experimental avaliada.

A superfície de resposta com cada interação variável é representada na figura 3. A figura 3a mostra o efeito da temperatura representada por X1 e pH por X3, onde a máxima atividade da  $\beta$ -galactosidase foi obtida com a diminuição do pH e aumento da temperatura, correspondendo ao pH 7,5-8,0 e 30°C, respectivamente. A faixa de pH encontrada por Kumar *et al* (2012) e Rajoka *et al* (2003) foi de até 7 para  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus sp* e *Kluyveromyces marxianus*, respectivamente. Eles observaram a diminuição na produção de enzimas com aumento do pH. Enquanto que neste estudo a faixa de pH alcalina foi considerada ótima. Isso pode ser atribuído a resistência do microrganismo, dado que Nakajo *et al* (2005) relataram que o gênero *Enterococcus* possui membrana impermeável ao ácidos e alcalinos, ou seja, a produção da enzima não foi afetada pelo pH.

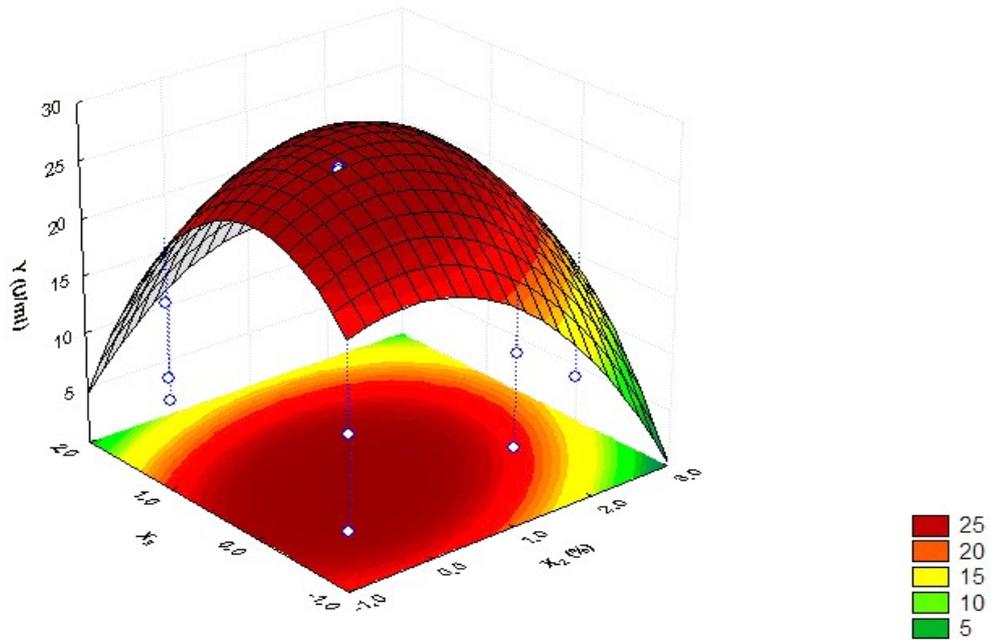
As faixas de temperatura consideradas ótimas para a produção de  $\beta$ -galactosidase neste estudo, também foram encontradas por Devi *et al* (2011), onde observaram a temperatura ótima de 35°C para  $\beta$ -galactosidase da BAL *Lactobacillus sp*. A temperatura foi o fator mais importante de influencia na produção da enzima, pois é possível observar que a interação da temperatura com as demais variáveis estavam em torno da mesma condição (Fig. 3a e 3b).



(a)



(b)



(c)

**Figura 3.** Superfície de resposta da atividade da  $\beta$ -galactosidase em função das variáveis codificadas. Y atividade da  $\beta$ -galactosidase. (a) efeito da interação entre o pH (X3) e a temperatura (X1). (b) interação entre a lactose (X2) e a temperatura (X1) e (c) interação entre o pH (X3) e a concentração de lactose (X2).

A figura 3b mostra que a redução na concentração de lactose junto a temperatura de 30°C é favorável para a produção de  $\beta$ -galactosidase. A mesma concentração foi observada no estudo realizado por Domingues *et al* (2004), quando testaram diferentes concentrações de lactose no meio de fermentação para a produção de  $\beta$ -galactosidase por *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com Rehman *et al* (2012) o aumento do substrato no meio de cultivo pode suprimir a produção de enzimas, devido ao aumento da viscosidade do meio de crescimento que pode criar obstáculos na disponibilidade adequada de oxigênio e nutrientes para as células levando a multiplicação celular mínima e interrompendo as outras atividades metabólicas. No entanto, de acordo com Kamran *et al* (2016), a diminuição na concentração de substrato também suprime a produção de  $\beta$ -galactosidase, o que indica que a quantidade insuficiente de substrato estava disponível para a produção máxima de enzima. Ambas afirmações corroboram com os resultados desse estudo, quando pode-se notar que nas matrizes presentes nas tabelas 3 e 4, os níveis baixos de lactose também apresentaram baixa atividade

enzimática. Isso significa que a concentração de substrato é crucial para a produção da enzima dependendo da fonte microbiana.

#### 4. CONCLUSÃO

O meio alternativo contendo sobrenadante da microalga *Chlorella vulgaris* adicionado ao meio de cultura comercial foi selecionado como um potencial sistema de produção de  $\beta$ -galactosidase de baixo custo, reduzindo o consumo de água e meio comercial em 50%. A utilização do modelo de superfície de resposta (MSR) se mostrou uma ferramenta eficiente ao maximizar a produção da enzima alcançando atividade de 29,86 U/mL. Também foi possível estabelecer as condições de produção (31 °C, pH 8 and 5% lactose). Diante dos resultados conclui-se que foi possível reaproveitar os resíduos do sobrenadante de microalgas para a produção de uma enzima importante para indústria de alimentos, como a  $\beta$ -galactosidase.

#### 5. REFERÊNCIAS

- DEVI, M. C.; MEERA, N.S.; THEJA, P.C.; GOPAL, D.V.R. Production and optimization of  $\beta$ -galactosidase enzyme from probiotic *Lactobacillus sp*, v.5, p.153-159, 2011.
- DOMINGUES, L., OLIVEIRA, C., CASTRO, I., LIMA, N. 2004. TEIXEIRA, J. A. Production of beta-galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. J.Chem. Technol. Biotechnol., v.79, p. 809-815, 2004.
- FOGG, G. E. The extracelular products of algae. Oceanogr. Mar. Biol., 4, 195-212, 1966.
- FOGG, G. E. Extracellular products of algae in freshwater. Archiv für hydrobiologie., 5, 1-25, 1971.
- GOSLING, A.; STEVENS, G.W.; BARBER, A.R.; KENTISH, S.E.; GRAS, S.L. Recent advaces refining galactooligosaccharide production from lactose. Food. Chem., v.121, p. 307-318, 2010.
- GULDHE, A., KUMARI, S., RAMANNA, L., RAMSUNDAR, P., SINGH, P., RAWAT, I., BUX, F. Prospects recente advancements and challenges of diferente wastewater streams or microalgal cultivation. J. Environ Manage., v. 203, p. 299-315, 2017.
- HAALAND, P.D. Experimental design in Biotechnology, Marcel Dekker Inc. New York, 76-77, 1989.

- HADJ-ROMDHANE, F.; ZHENG, X.; JAOUEN, P.; PRUVOST, J.; GRIZEAU, D.; CROUE, J.P.; BOURSEAU, P. The culture of *Chlorella vulgaris* in a recycled supernatant: effects on biomass production and médium quality. *Bioresour. Technol.*, v. 92, p. 132-285, 2013.
- HAN, F., PEI, H., HU, W., JIANG, L., CHENG, J., ZHANG, L. Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. *Bioresour. Technol.*, v.209, p.16-22, 2016.
- KARAM, A., BIBI, Z., AMAN, A., QADER, S. A. U. Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of  $\beta$ -galactosidase from newly isolated *Bacillus strain B-2*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v. 5, p. 99-103, 2016.
- KUMAR, D. M., SUDHA, M., DEVIKA, S., BALAKUMARAN, M. D., KUMAR, M. R., & KALAICHELVAN, P. T. Production and optimization of  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus Sp.* MPTK 121, isolated from dairy plant soil. *Ann Biol Res.*, v.3, p.1712-1718, 2012.
- LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Mar. Drugs.*, v.14, p. 191, 2016.
- MALAKAR, P.; SINGH, V. K.; KARMAKAR, R., & VENKATESH, K. V. (2014). Effect on  $\beta$ -galactosidase synthesis and burden on growth of osmotic stress in *Escherichia coli*. *SpringerPlus*, 3(1), 748, 2014.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLEAERT, K. Using natural zeolite for ammonia sorption from wastewater and as nitrogen releaser for the cultivation of *Arthrospira platensis*. *Bioresour. Technol.*, v. 155, p. 373 e 378, 2014.
- NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S.  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification and characterization of the enzyme., v. 21, p. 24-29, 2001.
- NAKAJO, K., IWAMI, Y., KOMORI, R., ISHIKAWA, S., UENO, T., SUZUKI, Y. & TAKAHASHI, N. The resistance to acidic and alkaline environments of endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Int Congr Ser.*, v.1284, p.191–192, 2005.
- NGUYEN, T.T.; NGUYEN, H.A.; ARREOLA, S.L.; MLYNEK, G.; DJINOVIC-CARUGO, D. et al. Homodimeric  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081: expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. *J Agric Food Chem.*, v.60, p.1713-1721, 2012.
- PEREIRA-RODRIGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M.I.; CERDÁN, M.E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specificity *Biology* 177., v.177, p.392-401, 2012.
- RAJOKA, M. I., KHAN, S., & SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 315-320, 2003.
- REHMAN, H.U., AMAN, A., ULQADER, S.A. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Carbon-hydr. Polym.*, v.90, p.387-391, 2012.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Science Ltd, Oxford, 2004.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food. Microbiol.*, v. 36, p.1–29, 1997.

VASILJEVIC, T. AND JELEN, P. Retention of crude  $\beta$ -galactosidase activity in crude cellular extracts from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 11842 upon drying. Inter.J. Dairy Technol., v.56, p.111-116, 2003.

WANG, S.; WANG, X.; MIAO, J.; TIAN, Y. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. Bior. Technol., v. 253, p. 79-84, 2018.

## CAPÍTULO II

Purificação e caracterização da  $\beta$ -galactosidase de *Enterococcus faecium* produzida em meio contendo sobrenadante de *Chlorella vulgaris*

Elaine Cristina da Silva<sup>1</sup>; Júlia Hayale Oliveira Simas<sup>1</sup>; Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa<sup>1</sup>; Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1</sup>; Maria Taciana Holanda Cavalcanti<sup>1</sup>

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900 Recife, PE, Brazil

**Resumo:**  $\beta$ -galactosidase derivada de bactérias ácido lácticas são extensivamente estudadas devido ao seu aspecto de segurança e aplicações na indústria de alimentos. Esta enzima catalisa a hidrólise da lactose e por isso tem sido muito utilizada como um importante biocatalisador. Porém, nos dias atuais existe uma grande preocupação em reduzir os custos de produção em escala industrial. A utilização do sobrenadante de microalgas como meio de cultivo, ainda é algo pouco estudado, mas alguns estudos mostram que sua composição é rica em nutrientes que podem ser reaproveitados para o crescimento de microrganismos. Sendo assim, este estudo teve por objetivo a purificação e caracterização parcial da  $\beta$ -galactosidase produzida em meio de baixo custo. A *E.faecium* cresceu em meio contendo sobrenadante de *C.vulgaris* e meio comercial, 5% de lactose em temperatura de 30°C durante 12h. Após crescimento a enzima intracelular foi extraída pelo rompimento da parede celular e purificada utilizando o método de precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. Para validar a purificação, foi realizado a eletroforese SDS-PAGE e a enzima purificada foi caracterizada parcialmente quanto a temperatura (10-90°C) e pH (3-10). Nos resultados do processo de purificação foi encontrado fator de purificação de 3,05 com rendimento de 7,02% da atividade enzimática. A eletroforese revelou que a enzima foi parcialmente purificada ao apresentar 3 bandas, havendo a possibilidade de ser uma proteína heterodímera. A temperatura e pH ótimos encontrados na caracterização foi de 40°C e pH 7,0. Quando testada para a estabilidade, a enzima manteve sua atividade constante durante o tempo total de 90 minutos na temperatura de 30°C e 45 minutos no pH ótimo. Os resultados evidenciam o potencial da  $\beta$ -galactosidase produzida por *E.faecium* por apresentar características de aplicação industrial com baixo custo, porém existe a necessidade de aprimorar as etapas do processo de purificação a fim de se obter a enzima pura.

Palavras-chave: Lactose; resíduo agroindustrial; bactérias ácido lácticas.

**Abstract:**  $\beta$ -galactosidase from bacteria are extensively studied because of their safety aspect and applications in the food industry. This enzyme catalyzes the hydrolysis of lactose and therefore has been widely used as an important biocatalyst. Currently there is a great concern in reducing production costs on an industrial scale. The use of the microalgae supernatant as a culture medium is still not well explored, but some studies show that its composition is rich in nutrients that can be reused for the growth of microorganisms. Thus, the aim of this study was purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase produced in low cost culture medium. *E.faecium*, based on 1% 1.1 v / v, 5% lactose and 30 ° C temperature for 12 h. After intracellular enzymatic growth was extracted by cell shock and purified using the ammonium sulfate precipitation method and ion exchange chromatography. In order to validate the purification, a SDS-PAGE electrophoresis and temperature (10-90 ° C) and pH (3-10) control were performed. The results of the purification process were achieved in the yield of 3.05 with yield of 7,02% of the enzymatic activity. The electrophoresis of an enzyme was partially isolated by presenting 3 bands, having a possibility of being a heterodimeric protein. The temperature and pH were found at 40 ° C and pH 7.0. When tested for stability, the temperature of one of its applications was throughout the time of 90 minutes at the temperature of 30 ° C and 45 minutes without optimum pH. Evidence for  $\beta$ -galactosidase potential is produced by *E. faecium* because it presents low cost industrial application characteristics, but there is a need for improvement as steps in the purification process in order to obtain the pure enzyme.

Keywords: Lactose; agroindustrial waste; lactic acid bacteria;

## 1. INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -galactosidase possui aplicações significativas nas indústrias biofarmacêutica, alimentar e de laticínios atuando na prevenção da cristalização da lactose, no melhoramento da doçura, solubilidade de produtos lácteos e no preparo de produtos alimentícios com baixa concentração de lactose para pessoas intolerantes (MLICHOVÁ *et al.*, 2006; PANESAR, 2010). Tal utilidade se deve a duas reações importantes realizadas por esta enzima, sendo a hidrólise dos resíduos terminais não redutores encontrados na lactose ( $\beta$ -D-galactose em  $\beta$ -D-galactosídeos) (PEREIRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012) e transgalactosilação levando a síntese de galactooligossacarídeos (GOSLING *et al.*, 2010).

As principais fontes da  $\beta$ -galactosidase são microbianas, dentre elas, as Bactérias Ácido Lácticas (LAB), consideradas uma fonte segura devido ao seu status GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) (HUSAIN *et al.*, 2011; VINDEROLA E REINHEIMER, 2003). LAB são veículos adequados para a produção de enzimas, e sua aplicação industrial tem sido sugerida como uma forma segura e eficiente de obter enzimas para alimentos (SPLECHTNA *et al.* 2007; VASILJEVIC & JELEN 2003). No entanto, a natureza fastidiosa da LAB exige numerosos fatores de crescimento, como minerais e vitaminas, além de fontes caras de carbono e nitrogênio no meio de cultura (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Vários tipos de meio comercial tais como MRS (de Man Rogosa e Sharpe) e TSB (Tryptone Soy Broth) podem oferecer estes elementos. Contudo, a demanda por nutrientes gera altos custos, levando à busca de outras alternativas.

Materiais renováveis como o sobrenadante de microalgas é a chave para o desenvolvimento de culturas em larga escala para minimizar o custo de consumo de água e nutrientes (YANG *et al.*, 2011). A produção global de microalgas é de cerca de 10.000 ton/ano (DEPRAETERE *et al.*, 2015). Gerando uma grande quantidade de sobrenadante, por causa da concentração de biomassa em sistemas de cultivo aberto. Conseqüentemente, são necessários 2000L de água para produzir 1kg de biomassa seca (DEPRAETERE *et al.*, 2015).

As microalgas exibem ampla biodiversidade e têm sido usadas por muitas décadas como uma importante fonte de metabólitos específicos, como proteínas, carboidratos, pigmentos, vitaminas e minerais (MATA *et al.*, 2010). Muitos desses elementos podem ser encontrados no material extracelular, visto que ao longo do cultivo as microalgas liberam esses metabólitos naturalmente (FOGG *et al.*, 1971, 1983; MORINEAU-THOMAS *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2012). Com isso, o reaproveitamento desse resíduo pode ser uma alternativa para minimizar os insumos de nutrientes e os impactos econômicos e ecológicos do processo. Assim, o objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a  $\beta$ -galactosidase em meio contendo sobrenadante da microalga *C.vulgaris*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo:

*Enterococcus faecium* foi obtido da coleção de Bactérias Ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal pertencente ao Laboratório de Bioativos (Labtecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A bactéria foi previamente identificada e estocada em leite desnatado reconstituído (LDR) 10% de glicerol sob 4°C de congelamento. As culturas foram reativadas por duas vezes em LDR (Leite Desnatado Reconstituído) 10%, em seguida em TSB (Tryptone Soy Broth) e incubadas a 37°C durante 24h entre as reativações.

### 2.2 Produção de $\beta$ -galactosidase:

Para formulação do meio alternativo foi utilizado sobrenadante proveniente do cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* cedida pelo Laboratório de Bioativos (Labtecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Em erlenmeyers de 250 mL, 100mL do sobrenadante foi adicionado em 100mL do meio TSB (Tryptone Soy Broth) formando o volume total de 200mL, com adição de 5% de lactose e pH

controlado em 8. O volume de 2% do cultivo contendo a bactéria ativada foi inoculado no meio previamente esterilizado e levada a estufa a 30°C durante 12h.

### 2.3 Extração da enzima:

Após o período de cultivo, as células foram centrifugadas (8000 rpm, 10min, 4°C), lavadas em tampão 0,1M fosfato de sódio pH 7 e ressuspensas no mesmo tampão. As células foram submetidas a lise utilizando sonicador (Sonoplus, bandelin) e novamente centrifugadas para obtenção da enzima intracelular.

### 2.4 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase:

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com o procedimento de Nagy *et al* (2001) modificado onde  $8,3 \times 10^3$ M do substrato cromogênico o-nitrofenol-b-D-galactopiranosideo (ONPG – Sigma Co, USA) foi dissolvido em 0,05M tampão fosfato pH 7. Foram adicionados 50ul do substrato e 50ul da enzima em microplaca de 96 poços e incubados em estufa por 30 minutos a 37°C. A reação foi parada com adição de 200ul de carbonato de sódio 0,1M e a absorbância foi determinada a 405 nm (leitor de microplaca Bio-rad, modelo imark, Japão). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de ONP por minuto sob as condições do ensaio.

### 2.5 Purificação da $\beta$ -galactosidase:

A enzima intracelular foi inicialmente precipitada em sulfato de amônio em fração de saturação de 40-60%. A amostra foi posteriormente ressuspensa em tampão 0,05M fosfato de sódio pH 6,5 (tampão A). A solução contendo a enzima foi dialisada utilizando o tampão A durante 24h e em seguida aplicada em coluna de cromatografia de troca iônica DEAE Sephadex (30x2 cm, 10ml) equilibrada com o tampão A. A proteína foi eluída com gradiente linear de NaCl 0,1M-1M em coleta de

frações de 1ml/min. As proteínas foram determinadas utilizando o método de Bradford (1976).

## 2.6 Determinação do peso molecular:

Determinação da massa molecular foi realizada por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% (p/v) seguindo os procedimentos de Laemmli (1970). Proteínas marcadoras de peso molecular para SDS-PAGE 6,5 - 200 KDa (Sigma-Aldrich, EUA) foram usadas para calibração e Coomassie Brilliant Blue R-250 como corante.

## 2.7 Caracterização bioquímica parcial da $\beta$ -galactosidase.

### 2.7.1 Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade ao pH da $\beta$ -galactosidase.

Para determinar o efeito do pH na atividade de  $\beta$ -galactosidase, as amostras da enzima parcialmente purificada foram avaliadas na presença de soluções tampões em diferentes valores de pH no intervalo de 3,0-10,0. O pH ótimo foi determinado pela incubação da enzima com substrato diluído em tampão citrato 0,1 M (pH 3,0-4,0), tampão fosfato (pH 5,0-7,0), e tampão tris-HCL (pH 8,0-10). A atividade foi quantificada conforme previamente descrito no item 2.4. O resultado do ensaio do efeito de pH foi expresso em atividade relativa, sendo o valor de 100% de atividade correspondente ao pH de maior atividade. A estabilidade do pH da enzima foi estimada após a pré-incubação do extrato purificado, em pH 3,0, 7,0 e 10,0, por 90 min.

### 2.7.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica da $\beta$ -galactosidase:

A temperatura ótima da  $\beta$ -galactosidase foi determinada numa faixa de 10-90° C por 30 minutos. A atividade foi quantificada conforme previamente descrito no item

2.4. O resultado do ensaio do efeito da temperatura foi expresso em atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade é correspondente a maior atividade. A estabilidade térmica da enzima foi estimada após a pré-incubação do extrato pós-purificação, em 30, 40 e 60°C, por 90 min.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

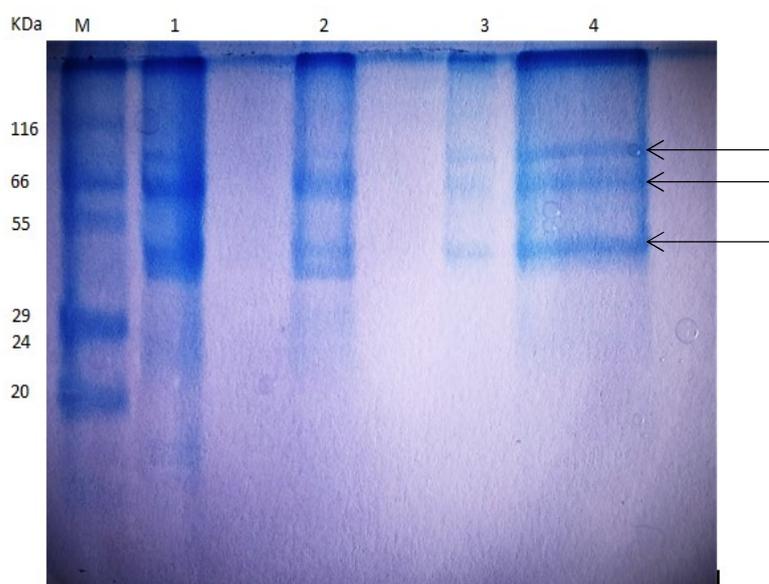
#### 3.1 Purificação parcial da $\beta$ -galactosidase:

O sumário de purificação da  $\beta$ -galactosidase de *E. faecium* cultivada em meio de cultura TSB (Tryptone Soy Broth) contendo sobrenadante de *C.vulgaris* é dado na tabela 1. O fator de purificação alcançado foi de 3,05 e rendimento final de 7,02%. Resultado similar ao encontrado por Chanalía *et al* (2017) que encontrou fator de purificação de 30,6, porém o rendimento foi mais elevado ao obtido neste estudo, sendo 28,26%. Princely *et al* (2013) também utilizaram resíduo (soro de leite) para produção da  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* e obteve fator de purificação de 1,13.

**Table 1.** Sumário com as etapas de purificação da  $\beta$ -galactosidase de *E. faecium*

Amostra	Atividade total (U)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	1030.0	33,0	31,21	1	100
Precipitação em sulfato de amônio e diálise	73,83	0,92	80,25	2,57	7,16
Cromatografia em coluna de troca iônica	72.4	0,76	95,26	3,05	7,02

O perfil eletroforético das bandas é mostrado na Figura 1, onde apresenta 4 trilhas, cada uma representando uma amostra. Da esquerda para direita temos: o marcador representado pela letra (M), extrato bruto (1), extrato dialisado (2) e a amostra pós cromatografia (3) e (4) sendo esta última mais concentrada. É possível observar que a maioria das proteínas de baixo peso molecular presentes no extrato bruto foram removidas a cada etapa de purificação. As amostras das linhas 3 e 4 apresentam 3 bandas, uma das quais pode está associada a presença da  $\beta$ -galactosidase, representada por 2 monômeros destacados com pesos aproximados de 66 e 80 kDa. Muitos trabalhos têm relatado a presença de valores diferentes de massas moleculares para essa enzima, obtida a partir de diferentes fontes microbianas, denominadas heterodímeros, ou seja, a  $\beta$ -galactosidase que consiste em duas bandas de proteínas distintas. A exemplo do trabalho realizado por Bhalla *et al* (2015) que encontraram bandas de proteínas de 45 e 60 kDa para a  $\beta$ -galactosidase de *Lactobacillus brevis*. A Massa molecular de 41 e 19 KDa também foram relatados para a  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces lactis*, no estudo feito por Mbuyi-Kalala, et al. (1988). Apesar disso, os resultados do peso molecular não foram confirmados, sendo necessário outras etapas de purificação a fim de se obter a enzima purificada.



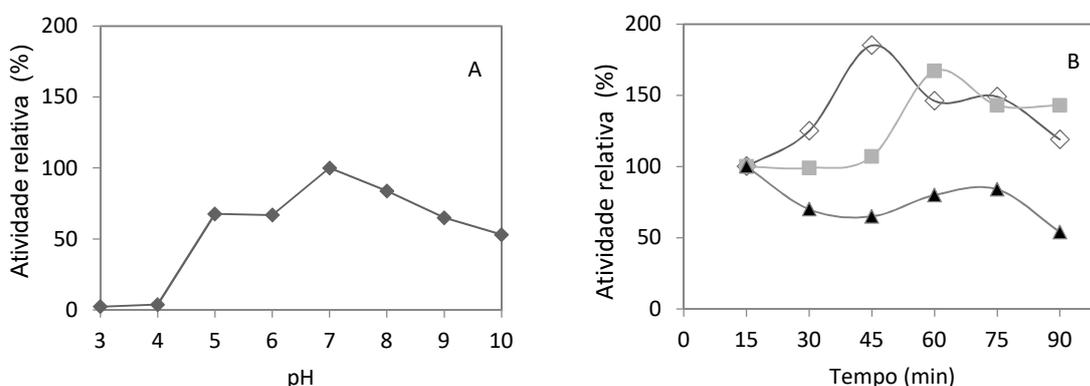
**Fig. 1.** Perfil eletroforético das amostras. (M) Marcador molecular; (1) extrato bruto (2) extrato dialisado, (3) amostra pós cromatografia e (4) amostra pós cromatografia concentrada.

### 3.2 Caracterização parcial da $\beta$ -galactosidase.

#### 3.2.1 Efeito do pH na atividade da $\beta$ -galactosidase e estabilidade a variação do pH:

Para explorar a importância comercial da enzima, foram realizados estudos de pH ótimo e estabilidade. Verificou-se que o pH ótimo da  $\beta$ -galactosidase foi o 7 (Fig. 2A). O mesmo, também foi observado nos estudos realizados por Chanalía *et al* (2017) e Hung *et al* (2002), para a  $\beta$ -galactosidase de *Pediococcus acidilactici* e *Bifidobacterium infantis*, respectivamente.

O efeito de diferentes tampões e valores de pH na estabilidade também foi investigado (Fig. 2B). A enzima foi estável em pH 7 durante 45min e aumentou a atividade relativa para 167% em 60 min. O oposto foi encontrado por Badarinath *et al* (2011), onde a enzima era estável na faixa de pH de 8,0 a 9,0 para  $\beta$ -galactosidase de *E. faecium*. De acordo com os nossos resultados, a enzima mostra uma atividade ótima e a estabilidade na faixa de pH neutro tornando-a adequada para o processamento de alimentos.



**Figura 2.** Efeito do pH na atividade enzimática (A) e estabilidade (B) de  $\beta$ -galactosidase. Símbolos em (B)  $\diamond$ , pH 3  $\blacksquare$ , pH 7; and  $\blacktriangle$ , pH 10;

#### 3.2.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica:

O efeito da temperatura na atividade enzimática é mostrada na figura 3A, onde a melhor temperatura encontrada foi de 40°C. A mesma condição também foi

encontrada por Badarinath *et al* (2011) para  $\beta$ -galactosidase de *E.faecium*. Prasad *et al* (2013) que também utilizaram resíduo como meio de cultivo (soro de leite de vaca) para a produção da  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus delbrueckii*, obteve da caracterização a temperatura ótima de 35 e 40°C respectivamente.

Na caracterização é possível observar que ocorre uma diminuição da atividade quando a temperatura ultrapassa 40°C, isso pode ser atribuído a inativação da enzima, como explicado por Haider e Husain (2007), onde relataram que temperaturas mais altas diminuem a atividade devido ao desdobramento da estrutura proteica e subsequente perda de sítio ativo da enzima. Cho *et al.* (2003) mostraram que a atividade da enzima reduziu rapidamente a ou acima de 50 °C sem atividade detectada além de 60 °C. Corroborando com os resultados da figura 3A.

A figura 3B mostra o efeito da estabilidade térmica da enzima ao longo de 90 minutos de incubação. A enzima se manteve estável durante o tempo total na temperatura de 30°C, perdendo apenas 10% da atividade. É possível observar que a enzima também se manteve estável na temperatura ótima (40°C), perdendo apenas 32% da atividade (Figura 3B). Saishin *et al* (2010), observaram o melhor ponto de estabilidade de  $\beta$ -galactosidase de *Bifidobacterium* em 35°C durante 5h.

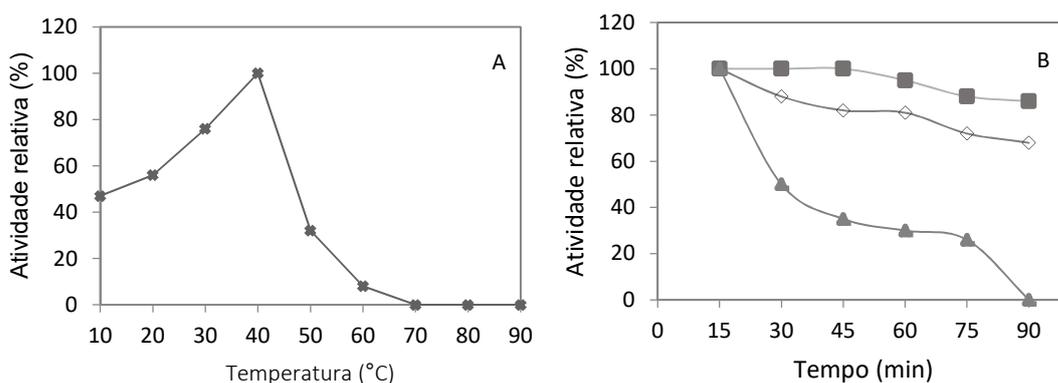


Fig. 3. Efeitos da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) da  $\beta$ -galactosidase. Símbolos em (B) ■, 30 °C; ◇, 40 °C. e ▲, 60 °C;

#### 4. CONCLUSÃO

A  $\beta$ -galactosidase produzida foi parcialmente purificada, apresentando três bandas em gel poliacrilamida de eletroforese, sendo uma com peso de 40 kDa e duas seguidas com peso molecular estimado de 50 kDa e 66 kDa. Porém, não foi possível concluir se estas bandas representam uma enzima dimérica ou se são duas enzimas com peso molecular muito próximo. Na caracterização a enzima apresentou melhor pH e temperatura de 7 e 40°C, respectivamente. Porém, a enzima apresentou melhor estabilidade térmica a 30°C e em pH ótimo. Diante dos resultados, pode-se aferir que embora pré-purificada, a enzima apresentou características favoráveis para aplicação industrial. Além do benefício de se utilizar um resíduo ainda pouco explorado como o sobrenadante de microalgas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BADARINATH, V.; PRAKASH, M.H. Purification of new  $\beta$ -galactosidase from *Enterococcus faecium* MTCC 5153 with transgalactosylation activity. *Food, Biotechnol.*, v. 25, p. 225-239, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, v. 2, p.248-254, 1976.
- CHANALIA, P.; GANDHI, D.; ATTRI, P.; DHANDA, S. Purification and Characterization of  $\beta$ -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioor. Chem.*, v. 77, p. 176-189, 2018.
- CHO, Y.J., SHIN, H.J. AND BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnol. Letters.*, v.25, p. 2107–211, 2003.
- DEPRAETERE, O.; PIERRE, G.; NOPPE, W.; et al. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*, v. 10, p. 48–54, 2015.
- FOGG, G. E. Extracellular products of algae in freshwater. *Archiv für hydrobiol.*, v.5, p.1-25, 1971.
- FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.*, v.25, p.3-14, 1983.
- GOSLING, A.; STEVENS, G.W.; BARBER, A.R.; KENTISH, S.E.; GRAS, S.L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food. Chem.*, v.121, p. 307-318, 2010.

- HAIDER, T., & HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International J. Biol. Macromol.*, v.41, p.72-80, 2007.
- HUNG, M. N., LEE, B. H. Purification and characterization of recombinant  $\beta$ -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96., v.58, p.439-445, 2002.
- HUSAIN, Q., ANSARI, S. A., ALAM, F., AZAM, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *Inter. J. Biol. Macromol.*, v.49, p.37-43, 2011.
- MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v.14, p.217-232, 2010.
- MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; 2006. Current trends of  $\beta$ -galactosidase application in food technology. *J. Food. Nutr. Res.*, v.45, p. 47–54, 2006.
- MORINEAU-THOMAS, O.; JAOUEN, P., LEGENTILHOMME, P. The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella sp.* and *Porphyridium purpureum*): Advantage of a swirling decaying flow. *Bioprocess Biosystems Eng.*, v.25, p.35–42, 2002.
- MBUYI-KALALA, A., SCHNEK, A.G., LEONIS, J. 1988. Separation and characterization of four enzyme forms of beta-galactosidase from *Saccharomyces lactis*, *Eur. J. Biochem.*, v.178, p.437-43, 1988.
- NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S.  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification and characterization of the enzyme., v. 21, p. 24-29, 2001.
- PANESAR, S. P. S.; KUMARI, S., PANESAR, S. Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Res.*, p.1-16, 2010.
- PEREIRA-RODRIGUEZ, A.; FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; GONZÁLEZ-SISO, M.I.; CERDÁN, M.E.; BECERRA, M.; SANZ-APARICIO, J. Structural basis of specificity *Biology.*, v.177, p.392-401, 2012.
- PRASAD, L.N., GHOSH, B.C., SHERKAT, F. SHAH, N.P. Extraction and characterization of  $\beta$ -Galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. *Lactis Bb12* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bugaricus* TCC 1842 grown in whey., v.20, p.487-494, 2013.
- PRINCELY, S., BASHA, S.N., KIRUBAKARAN, J.J., DHANARAJU, M.D. Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Pelagia Res. Library.*, v.3, p.242-251, 2013.
- SAISHIN, N., UETA, M., WADA, A., YAMAMOTO, I. Properties of  $\beta$ -Galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* subsp. *Logum* JCM 7052 grown on gum arabic., p.10, v.23-31, 2010.
- SPLECHTNA, B., NGUYEN, T.H., ZEHETNER, R. Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus sp.* *Biotechnol. J.*, v.2, p.480-5, 2007.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Inter. J. Food. Microbiol.*, v. 36, p.1–29, 1997.

VASILJEVIC, T. AND JELEN, P. Retention of crude  $\beta$ -galactosidase activity in crude cellular extracts from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 11842 upon drying. *Inter.J. Dairy Technol.*, v.56, p.111-116, 2003.

VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative "in vitro" study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. *Food. Res. Inter.*, v.36, p.895-904, 2003.

YANG, J., XU, M., ZHANG, X., HU, Q., Sommerfeld, M., & Chen, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource. technol.*, v.102, p.159-165, 2011.

YU, Y., HU, H.Y., LI, X. Accumulation characteristics of soluble algal products (SAP) by a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* LX1 during batch cultivation for biofuel production. *Bioresource. Technol.*, v.110, p.184–189, 2012.