

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE *B-GALACTOSIDASE*

SCHUBER, Lilian Cristina Lopes^{*}; CRUZ, Michele Cristina Rodrigues^{**};
BONFIM, Tânia Maria Bordin^{***}; BRAND, Débora^{****}; PASTORE, Gláucia Maria^{*****};
ALMEIDA, Mareci Mendes de^{*****}

Resumo

Os micro-organismos representam a maior diversidade biológica, química, molecular e fisiológica dos seres vivos, e o isolamento a partir de recursos naturais, como o solo, é de grande importância para a obtenção de novas linhagens. O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar linhagens de fungos com potencial para a produção de β -galactosidase, com atividade de transgalactosilação. Foram coletadas amostras de solos, feitas diluições seriadas e inoculadas, em ágar *Sabouraud* modificado com lactose. Os fungos foram repicados até a obtenção de colônias isoladas e os micro-organismos selecionados foram identificados por cultivo entre lâmina e lamínula. O processo fermentativo para a produção da enzima foi feito no estado sólido com lactose a 1% (p/v) em frascos de cultura e mantido a 26 °C por 7 dias. A β -galactosidase produzida foi parcialmente purificada com etanol e determinados os efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática, por meio de planejamento fatorial de dois níveis. A atividade de transgalactosilação foi avaliada, variando o pH e a concentração da enzima e o perfil dos carboidratos obtidos foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. O fungo que expressou a maior atividade de β -galactosidase foi identificado como *Penicillium* sp e apresentou para a atividade enzimática os valores ótimos de pH e temperatura de 4,5 e 60 °C, respectivamente. A β -galactosidase produzida pelo fungo *Penicillium* sp apresentou atividade hidrolítica e de transgalactosilação, tendo potencial para ser explorada industrialmente na produção de prebióticos.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Fermentação no estado sólido. Galacto-oligossacarídeos, Transgalactosilação.

^{*} Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa; lilianschuber@uol.com.br

^{**} Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa; chelecruzdez@yahoo.com.br

^{***} Professora adjunta de Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Paraná; tbonfim@ufpr.br

^{****} Professora associada de Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Paraná; dbrand@ufpr.br

^{*****} Professora titular de Ciência de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas; glaupast@unicamp.br

^{*****} Professora associada de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Estadual de Ponta Grossa; mareci@uepg.br

Isolation and selection of producing fungi β -galactosidase

Abstract

*The micro-organisms represent the greatest biological diversity, chemistry, molecular and physiological of living and isolation from natural resources such as soil, is of great importance for obtaining new strains. The objective of this study was to isolate and select strains of fungi with potential for the production of β -galactosidase, with transgalactosylation activity. Were collected soil samples, serial dilutions and inoculated on Sabouraud ágar modified with lactose. The fungi were transferred to obtain isolated colonies and selected micro-organisms were identified by cultivation between slide and coverslip. The fermentation process for production of the enzyme was made solid state with lactose (1% w/v) in culture flasks and maintained at 26 °C for 7 days. The β -galactosidase produced was partially purified with ethanol and determined the effects of pH and temperature on enzyme activity through two-level factorial design. The transgalactosylation activity was assessed by varying the pH and enzyme concentration and profile of carbohydrates obtained was analyzed by high performance liquid chromatography. The fungus that expressed the highest activity of β -galactosidase was identified as *Penicillium* sp and presented for the enzymatic activity optimum values of pH and temperature of 4.5 and 60 °C, respectively. The β -galactosidase produced by the fungus *Penicillium* sp presented hydrolytic activity and transgalactosylation having the potential to be exploited industrially in the production of prebiotic.*

Keywords: Fungi. Solid state fermentation. Galactooligosaccharides. Transgalactosylation.

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade de ecossistemas, participando de processos ecológicos básicos como os ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, muitas vezes mantendo relações ecológicas com outros organismos, tendo como seu *habitat* primário o solo (STALEY et al., 1988; LOREAU et al., 2001; RODRIGUES, 2009).

O isolamento e a identificação de novas fontes microbianas, não tóxicas, são de grande interesse, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

A β -galactosidase (E.C.3.2.1.2.3) catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose, sendo utilizada para melhorar a digestibilidade do leite e dos produtos lácteos fermentados, proporcionando efeitos benéficos sobre a assimilação de alimentos que contêm lactose (JURADO et al., 2002; ANSARI; SATAR, 2012). Ainda, apresenta atividade de transgalactosilação, produzindo galactooligosacarídeos, carboidratos resistentes às enzimas digestivas e fermentados por bifidobactérias, conferindo benefícios à saúde, como imunomodulação para a prevenção de alergias, proteção contra infecções entéricas; regula o trânsito intestinal, estimula a absorção de nutrientes, menor risco de formação de cáries, aumento da absorção de minerais, redução do metabolismo dos micro-organismos

toxigênicos, diminuindo os fatores de risco para o câncer de colón (MARTINS; BURKERT, 2009; TORRES et al., 2010; VIKAS et al., 2011).

Os galacto-oligossacarídeos são formados pela transgalactosilação da galactose por ação da β -galactosidase, a partir de substratos ricos em lactose (MAHONEY, 1998; NIZAMUDDIN; SRIDEVI; NARASIMHA, 2008; MANUCCI, 2009). A produção da β -galactosidase a partir de micro-organismos é a fonte mais utilizada na aplicação industrial, podendo ser produzida a partir de diferentes micro-organismos como *Penicillium chrysogenum* (NAGY et al., 2001), *Penicillium restrictum* (GUTARRA, 2005), *Trichoderma* sp, *Penicillium* sp, *P. spinulosum* (SEYES; AKSOZ, 2004), *Penicillium canescens* (BUDRIENE et al., 2004), *Kluyveromyces lactis* (LISBOA et al., 2012) e *Aspergillus oryzae* (VERA et al., 2012).

A finalidade deste trabalho foi isolar e selecionar linhagens de fungos que apresentassem potencial para a produção de β -galactosidase por fermentação no estado sólido com atividade hidrolítica e de transgalactosilação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de solo nos municípios de Jaguariaíva, Castro, Palmeira, Londrina e Ponta Grossa do Estado do Paraná, em locais de pecuária leiteira, raspando-se a parte superficial do solo e fazendo cortes de 5 cm de profundidade, de 3 áreas com distância de 5 m entre elas e acondicionadas em pacotes plásticos estéreis, identificados por algarismos arábicos (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008; EMPRESA BRASILEIRA DE PESUISA AGROPECUÁRIA, 2000). As amostras foram mantidas em gelo durante o transporte e no laboratório sob refrigeração a 8 °C até o momento da sementeira.

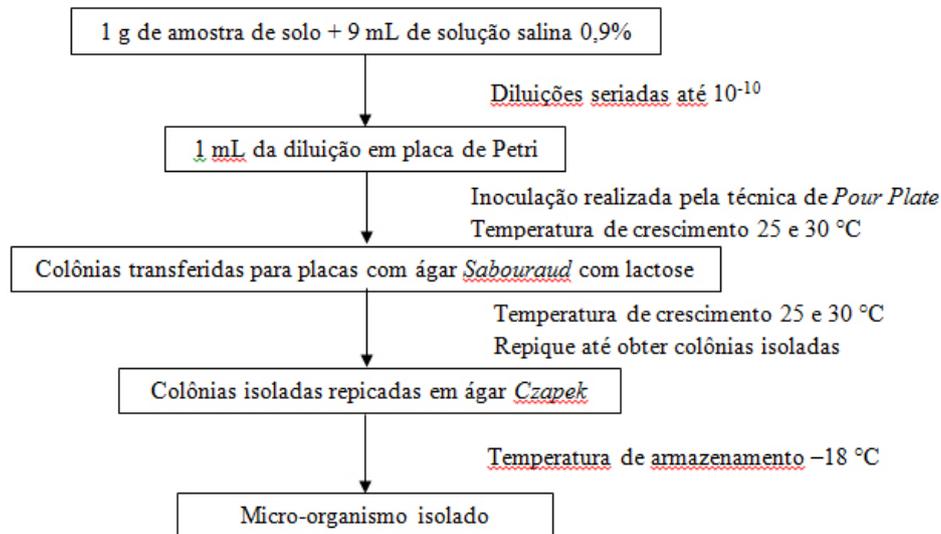
2.2 ISOLAMENTOS DOS MICRO-ORGANISMOS

Para o isolamento dos fungos, foi homogeneizado 1 g da amostra em 9 mL de solução salina 0,9% (p/v) estéril; em seguida, foram feitas diluições decimais seriadas (até 10^{-10}), a inoculação foi realizada pela técnica de *pour plate*, em ágar *Sabouraud* com lactose, composto de 10 g de peptona bacteriológica, 20 g de ágar-ágar e 40 g de lactose para 1000 mL de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C, em seguida, com temperatura de aproximadamente 45 °C, o pH foi corrigido para 4 com ácido tartárico 10% (p/v). De cada diluição, foi transferido 1 mL da amostra para placas de Petri estéreis e o meio de cultura foi adicionado a uma temperatura de aproximadamente 45 °C. Na tampa da placa foi colocado um papel filtro previamente esterilizado para que a umidade gerada durante a incubação fosse absorvida e não prejudicasse o crescimento.

As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a temperaturas de 25 a 30 °C, em duplicatas por 10 dias (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Após o crescimento, os micro-organismos foram novamente repicados em placas de Petri com ágar *Sabouraud* lactose até a obtenção de colônias isoladas, as quais foram confirmadas por microscopia ótica e inoculadas em tubos inclinados com ágar *Sabouraud* lactose. Os tubos foram incubados em estufa a 26 °C para posterior

armazenamento em geladeira, sendo repicados a cada três meses para manutenção das culturas. As colônias isoladas também foram repicadas em tubo de ensaio com ágar *Czapek* inclinado (ágar para armazenamento) e mantidas sob temperatura de -18 °C (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 – Isolamento dos fungos



Fonte: as autoras.

2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

Para a caracterização físico-química do farelo de trigo, utilizado como substrato para a fermentação no estado sólido, foram realizadas análises de açúcares redutores (SOMOGYI, 1952; NELSON, 1944), cinzas (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL, 2000), umidade, fibras, lipídios e proteínas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), em triplicata.

2.4 PRODUÇÃO DE B-GALACTOSIDASE

A produção da β -galactosidase foi avaliada para todos os micro-organismos isolados, utilizando como substrato 20 g de farelo de trigo com adição de lactose a 1% (p/v) em água na proporção de 1:1 (PASTORE; PARK, 1980). Foi adicionado 1 mL de inóculo com 10⁷ conídios.mL⁻¹ em fermentadores, com capacidade de 500 mL, e incubados a 26 °C por 7 dias. Após o crescimento dos micro-organismos, o meio foi homogeneizado com água, para liberação enzimática. Essa solução foi filtrada em papel whatman nº 1, sob banho de gelo, para a obtenção do extrato bruto enzimático. No extrato bruto foram determinadas as atividades enzimáticas, com dois substratos diferentes: lactose e *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). O mesmo procedimento foi realizado com *Aspergillus niger* (ATCC 22342), utilizado como fungo de referência. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para verificar a diferença estatística entre as atividades enzimáticas obtidas nos extratos brutos dos fungos isolados, sendo aplicado o Teste de Tukey (5% de significância; Software SASM-AGRI).

2.5 ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE UTILIZANDO LACTOSE COMO SUBSTRATO

A mistura reativa foi formada com 4 mL de solução a 1% de lactose em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e 1 mL de extrato enzimático bruto. Foi incubada a 55 °C por 15 minutos e a reação paralisada com a inativação da enzima em banho fervente por 10 minutos. A determinação da atividade enzimática, na hidrólise da lactose, com liberação de glicose, foi determinada pelo método enzimático glicose-oxidase-peroxidase (GOD) e reativo cromogênico (DAHLQVIST, 1961). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glicose por minuto em 1 mL, nas condições de ensaio.

2.6 ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE UTILIZANDO O-NITROFENIL-B-D-GALACTOPIRANOSÍDEO COMO SUBSTRATO

O meio de reação constou de 1,55 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0; 0,15 mL de solução enzimática; 0,15 mL de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo-ONPG (Sigma) a 0,25%. A mistura foi incubada a 60 °C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 0,15 mL de carbonato de sódio a 10% e o produto da reação é o cromóforo *o*-nitrofenol que tem cor amarela (PARK; SANTI; PASTORE, 1979), medida em espectrofotômetro a 420 nm. Para a determinação da atividade enzimática foi feita uma curva padrão de *o*-nitrofenol-ONP (Biotec) com carbonato de sódio a 10% e concentrações entre 0,01 e 0,2 μ mol.mL⁻¹. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ONP, por minuto, em 1 mL, nas condições de ensaio (WALLENFELS; MALHOTRA, 1961).

2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Para a identificação dos fungos filamentosos isolados e selecionados, o estudo da fisiologia de crescimento foi realizado por meio da germinação de esporos e do crescimento radial do micélio (BRAND, 2006); e o estudo das estruturas de crescimento pelo cultivo entre lâmina e lamínula (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004), observados por microscopia.

Para a análise da velocidade de crescimento radial foi feito o cultivo em placa, nos meios de batata-dextrose-ágar (BDA), extrato de farelo de trigo e em ágar *Sabouraud* com lactose. O meio de cultivo BDA foi preparado conforme especificação do fabricante e o extrato de farelo de trigo preparado a 8% (p/v) em água, mantido em autoclave por 40 minutos sob vapor fluente; esta suspensão foi filtrada, no filtrado foi adicionado ágar 2% (p/v) e lactose a 2% (p/v), os meios foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Os fungos selecionados e a cepa de referência (*Aspergillus niger* ATCC 22342) foram padronizados e inoculados nos meios de cultivo em placa estéril e incubados a 26 °C. O crescimento foi avaliado a partir da medida dos raios a cada 12 horas, nos sentidos: diagonal, longitudinal e transversal, até 96 horas de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata. A velocidade de crescimento radial foi calculada mediante a regressão linear dos dados de raio das colônias *versus* o tempo, segundo a Equação 1 (BRAND et al., 2010; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

$$r(mm) = VCR.t + b \quad (1)$$

r (mm) = raio;

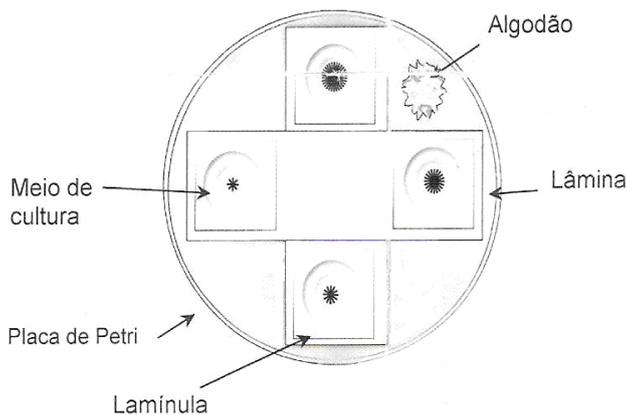
t = tempo (horas);

VCR = velocidade de crescimento radial ($mm.h^{-1}$); e b = coeficiente linear da regressão.

Os dados de VCR dos fungos foram analisados por meio da ANOVA e Teste de Tukey (5% de significância) para a comparação das médias.

Para verificar o desenvolvimento microscópico dos fungos selecionados foi feito o cultivo entre lâmina e lamínula, que consistiu em colocar sobre duas lâminas cruzadas, contidas em uma placa de Petri, uma gota de ágar *Sabouraud* lactose em cada extremidade. O fungo foi inoculado, com agulha de platina, na região central do meio de cultivo e coberto com uma lamínula; dentro da placa foi feita uma câmara úmida, com um pequeno algodão embebido em água estéril, para evitar a dessecação do meio durante o crescimento (Figura 1), sendo mantida em estufa a 26 °C por 5 a 7 dias.

Figura 1 - Desenho esquemático do cultivo entre lâmina e lamínula.



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004).

As estruturas morfológicas foram observadas e fotografadas mediante de microscópio ótico com captura de imagem a cada 12 horas, em fator de aumento de 100 vezes e 400 vezes. A identificação foi realizada com base em literatura científica (SMITH, 1991; PORTO et al., 1998). Com o fungo selecionado como melhor produtor da enzima β -galactosidase, foi feita a microscopia de varredura preparada segundo Dykstra e Jaeger (2001) e Castro, Tirapegui e Silva (2002), para destacar as estruturas do corpo de frutificação.

2.8 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE B-GALACTOSIDASE DE *PENICILLIUM* SP

Para o estudo cinético de produção da enzima o fungo *Penicillium* sp foi cultivado em farelo de trigo com e sem lactose; nesse caso, a solução de lactose foi substituída pelo mesmo volume em água. O cultivo foi realizado a 26 °C por 14 e 7 dias com e sem lactose, respectivamente. Os fermentadores foram retirados da estufa a cada 24 horas, em triplicata, sendo o meio homogeneizado com água, para liberação da enzima, filtrado em papel *whatman* n. 1, sob banho de gelo, para obtenção do extrato bruto e determinada a atividade enzimática utilizando ONPG como substrato.

2.9 SEMIPURIFICAÇÃO DA B-GALACTOSIDASE DE *PENICILLIUM* SP

O fungo selecionado como melhor produtor de β -galactosidase foi cultivado em fermentação no estado sólido com substrato de farelo de trigo, para a obtenção do extrato bruto enzimático, tratado com etanol a 70% e deixado em repouso em geladeira com aproximadamente 4 °C por 12 horas. Foi retirado o sobrenadante e o precipitado centrifugado por 10 minutos a 150 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado depositado em placa de *Petri* e mantido em ambiente refrigerado durante 24 horas para a evaporação do etanol (PASTORE; PARK, 1979; KLEIN, 2010). A enzima foi raspada com uma espátula, obtendo-se a enzima semipurificada, e armazenada a -2 °C.

2.10 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA B-GALACTOSIDASE SEMI-PURIFICADA

Para a determinação da temperatura e pH ótimos de atividade da enzima foi feito um planejamento fatorial completo 2² (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 1. A resposta foi a atividade de β -galactosidase, determinada por ONPG.

Tabela 1 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para a temperatura e o pH ótimos de atividade

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	46	50	60	70	74
pH	3	3,5	4,5	5,5	6

Fonte: as autoras.

2.11 PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Para avaliar o efeito da concentração da enzima e do pH na conversão da lactose em galacto-oligosacarídeos, foram utilizadas concentrações de enzima semipurificada que variaram de 2 a 9,2 U.mL⁻¹, e variações de pH entre 3,3 a 8,5. Os ensaios foram preparados em solução de lactose a 30% (p/v) e realizados por 24 horas em banho Dubnoff, a 45 °C, em agitação pendular com 80 bpm. As amostras foram retiradas do banho, e a enzima foi inativada por desnaturação em banho fervente por 10 minutos. O experimento foi realizado em triplicata. Após a ação da enzima sobre a lactose, a análise dos carboidratos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ALMEIDA; PASTORE, 2004), em cromatógrafo marca *Waters* 2695, com bomba peristáltica, degasser e detector de índice de refração *Waters* 2414, controlados pelo *software Empower – Waters*. A coluna utilizada foi de troca iônica (Shodex SC 1011 (8x300 mm), coluna de guarda Shodex SC – LG (6x50 mm), sendo a fase móvel água ultrapura (Milli-Q); fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, temperatura do forno e detector de 80 °C a 50 °C, respectivamente. Os padrões de grau cromatográfico utilizados foram glicose, galactose e lactose. Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana 0,22 μ m antes de serem injetados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FARELO DE TRIGO

A caracterização físico-química do farelo de trigo foi feita com o objetivo de determinar a composição do meio de fermentação sólida utilizado neste estudo. As médias dos resultados obtidos do farelo de trigo estão expressas em base seca e apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização físico-química do farelo de trigo

Parâmetros	Resultados %
Carboidratos	61,15
Lipídeos	4,29
Proteínas	17,32
Umidade	11,92
Cinzas	4,30
Fibra bruta	45,31
pH	5,90

Fonte: as autoras.

Conforme a Tabela 2 o farelo de trigo doado pela Bunge Alimentos, unidade Ponta Grossa, utilizado nesta pesquisa para FES, apresenta composição centesimal semelhante ao citado pela literatura (CAMPOS et al., 2010).

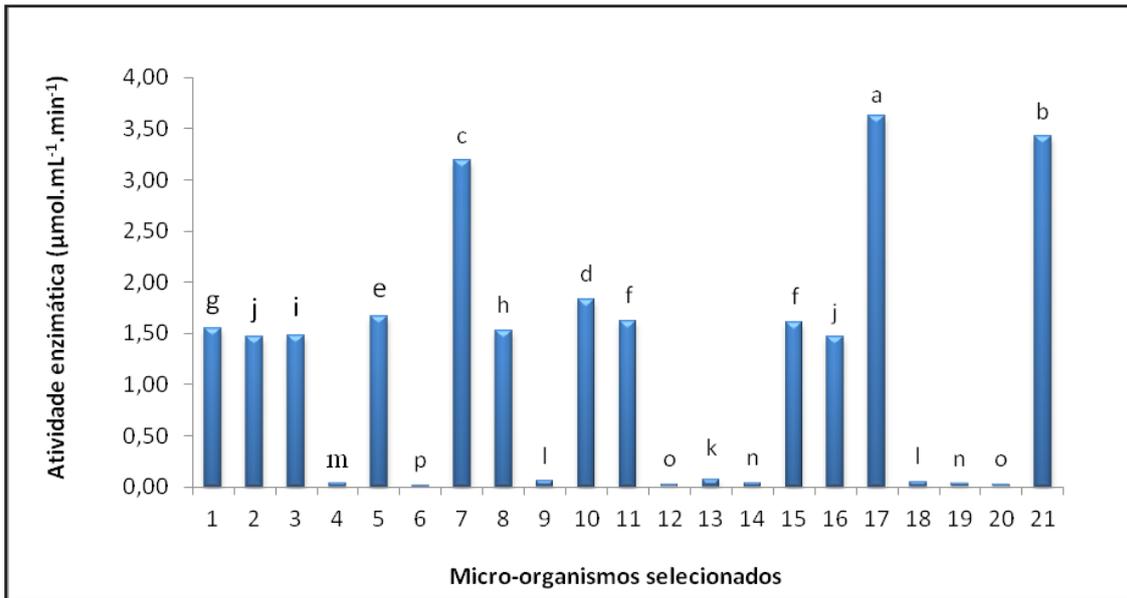
3.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

Das amostras de solo coletadas e cultivadas em ágar *Sabouraud* modificado com lactose para seleção de micro-organismos produtores de β -galactosidase, foram isolados 20 fungos, inoculados em farelo de trigo com lactose por sete dias; o tempo de crescimento foi estabelecido quando o meio de cultivo apresentou sua superfície coberta pelo micélio. Os fungos filamentosos pela sua capacidade de crescer em ambientes com baixa umidade relativa e na ausência de água livre são os micro-organismos que melhor se adaptam à fermentação no estado sólido. Os micro-organismos que crescem na natureza, sobre substratos com reduzida umidade, pertencem geralmente a espécies de um dos seguintes gêneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (PANDEY et al., 2000; PINTO, 2005).

Após o crescimento dos fungos foi preparado o extrato bruto enzimático e determinada a atividade de β -galactosidase. Quando foi utilizada lactose como substrato, todos os micro-organismos apresentaram atividade hidrolítica (dados não mostrados), podendo ser utilizados para hidrolisar a lactose. Industrialmente essa é uma aplicação importante porque diminui o teor de lactose no leite e seus derivados, ou deixa os produtos isentos dela, podendo ser utilizada na produção de alimentos para pessoas com intolerância à lactose (TORRES et al., 2010) ou minimizando problemas causados pela cristalização da lactose e formando açúcares de maior poder adoçante e de maior solubilidade (EVANGELISTA, 2001; NIZAMUDDIN; SRIDEVI; NARASIMHA, 2008; MANUCCI, 2009).

A atividade enzimática também foi determinada utilizando ONPG como substrato, estando os resultados apresentados na Gráfico 1.

Gráfico 1 - Atividade de β -galactosidase no extrato bruto dos fungos isolados, utilizando ONPG como substrato. A amostra 21 é a representação da atividade enzimática de *A. niger* (ATCC 22342), fungo de referência. Letras minúsculas iguais representam que não há diferença estatisticamente significativa, segundo o Teste de Tukey (5% de significância); software SASM-AGRI.



Fonte: as autoras.

Dos 21 micro-organismos isolados, 6 foram selecionados (5, 7, 10, 11, 15 e 17), para identificação de seus gêneros. As atividades enzimáticas de todos os fungos foram comparadas entre si. O fungo de referência utilizado foi o *A. niger* (ATCC 22342), considerado um bom produtor da enzima (BARBOSA et al., 2010). De acordo com o Gráfico 1, o micro-organismo n. 17 foi o que apresentou maior atividade enzimática, superior ao fungo de referência, sendo este o escolhido para os ensaios de produção de galacto-oligossacarídeos.

A lactose e o *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo são considerados bons substratos para a β -galactosidase para determinar a atividade enzimática. A aplicação de hidrólise da lactose é a mais conhecida, porém, a enzima também atua como catalisador biológico em reações que hidrolisam as ligações β -galactosil em glicoproteínas, polissacarídeos, dissacarídeos e compostos como *orto* e *para*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeos, sendo estes dois últimos mais usados para determinar a atividade de β -galactosidase (BLANCH; CLARK, 1997) em razão da enzima apresentar maior afinidade a estes quando comparados à lactose (WALLENFELS; MALHOTRA, 1961).

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Foi acompanhada a velocidade de crescimento radial dos fungos selecionados e do de referência para comparar a eficiência do crescimento nos diferentes substratos. Os valores do crescimento radial expressos em mm.h⁻¹ estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Determinação da velocidade de crescimento radial dos fungos selecionados

Fungos filamentosos	Crescimento Radial (mm.h ⁻¹)		
	Meio sólido PDA	Meio sólido extrato farelo de trigo lactose	Meio sólido ágar Sabouraud lactose
5	0,30 ± 0,03 ⁱ	0,32 ± 0,05 ^g	0,32 ± 0,05 ^g
7	0,23 ± 0,06 ⁿ	0,25 ± 0,05 ^l	0,27 ± 0,05 ^k
10	0,21 ± 0,01 ^p	0,22 ± 0,01 ^o	0,24 ± 0,02 ^m
11	0,51 ± 0,06 ^b	0,45 ± 0,05 ^e	0,48 ± 0,03 ^d
15	0,21 ± 0,02 ^p	0,20 ± 0,03 ^q	0,23 ± 0,02 ⁿ
17	0,29 ± 0,02 ^j	0,31 ± 0,03 ^h	0,43 ± 0,04 ^f
<i>A. niger</i>	0,53 ± 0,08 ^a	0,48 ± 0,08 ^d	0,50 ± 0,06 ^c

Fonte: as autoras.

Nota: Resultados de média ± desvio padrão, letras iguais indicam similaridade entre os tratamentos, nível de significância de 5%.

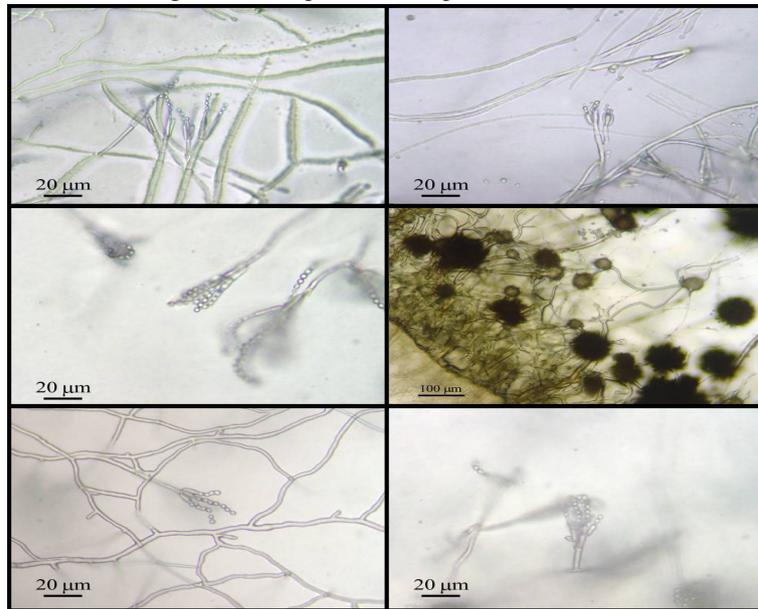
As velocidades de crescimento radial apresentadas pelos fungos 5, 7, 10, 11, 15 e 17 indicam a habilidade destes fungos de crescerem em meios contendo lactose. O fungo indicado pelo número 11 apresentou a maior velocidade de crescimento radial nos meios testados em relação aos demais micro-organismos e esta foi similar quando comparada ao fungo de referência; a atividade de β -galactosidase determinada no extrato bruto por ONPG foi de 1,62 U.mL⁻¹. Esse dado é importante para se estabelecer um menor tempo de cultivo aos micro-organismos que apresentaram maior velocidade de crescimento radial. Embora o fungo 11 se desenvolva mais rápido, o fungo 17 foi selecionado para os demais experimentos porque produziu a enzima β -galactosidase com maior atividade (3,63 U.mL⁻¹).

Os meios de cultivo ágar *Sabouraud* e BDA são amplamente citados na literatura como eficientes na seleção e cultivo de diferentes fungos filamentosos (MACHADO et al., 2001; DONINI et al., 2005; OSTROSKY et al., 2008; FASANELLA, 2008; RODRIGUES, 2009; BARBOSA et al., 2010; ROVEDA, HEMKEMEIER; COLLA, 2010). Colla et al. (2008) cita a utilização do meio BDA para isolamento e seleção de fungos a partir do solo e Santiago et al. (2004) cita a utilização do meio ágar *Sabouraud* na manutenção de *Kluyveromyces marxianus*, para a produção de β -galactosidase.

A seleção de cepas selvagens produtoras de enzimas é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil, o que justifica a busca de fontes alternativas de novas cepas fúngicas para a produção de β -galactosidase (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Para a identificação dos fungos filamentosos, que se apresentaram como bons produtores da enzima β -galactosidase e representados pelos números 5, 7, 10, 11, 15 e 17, foi feito o cultivo entre lâmina e lamínula. O desenvolvimento das estruturas vegetativas foi acompanhado por microscopia ótica (Figura 2) e comparadas com a literatura (SMITH, 1991; PORTO, 1998; BENSON, 2001).

Figura 2 – Fungos selecionados, crescidos em meio BDA, em lâmina.
Imagens obtidas por microscopia ótica com aumento de 400x



Fonte: as autoras.

Os resultados da identificação dos fungos filamentosos, obtidos de amostras de solo, estão relacionados na Tabela 4.

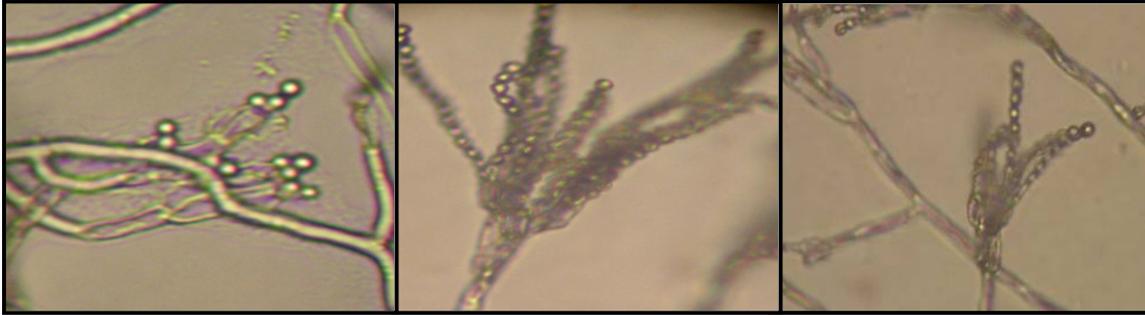
Tabela 4 – Identificação dos fungos filamentosos isolados de amostras de solo, melhores produtores de β -galactosidase

Fungos isolados das amostras de solo	Identificação (Gênero)
5	<i>Penicillium</i> sp
7	<i>Penicillium</i> sp
10	<i>Penicillium</i> sp
11	<i>Aspergillus</i> sp
15	<i>Penicillium</i> sp
17	<i>Penicillium</i> sp

Fonte: as autoras.

O fungo filamentoso representado pelo número 17 foi identificado como *Penicillium* sp, as imagens de seu crescimento por microcultivo estão apresentadas na Figura 3.

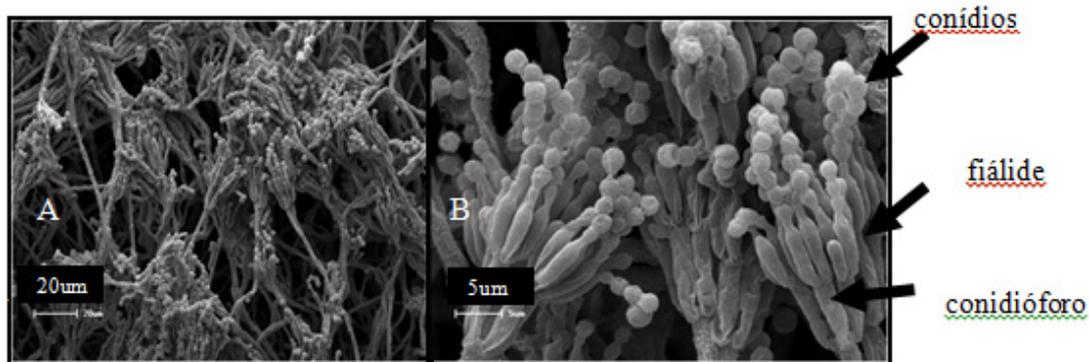
Figura 3 – Crescimento do *Penicillium* sp, em meio ágar *Sabouraud* com lactose. Técnica de microcultivo, observações ao MO, 400 x



Fonte: as autoras.

Para definir as características dos esporos, das hifas e dos conidióforos, foi feita a microscopia de varredura. As imagens obtidas (Figura 3) contribuíram para a identificação do *Penicillium* sp.

Figura 4 – Microscopia de varredura do *Penicillium* sp. Meio ágar *Sabouraud* com lactose, em placa, por 168 horas, a 26 °C. Imagem A, aumento de 1500 x; imagem B, aumento de 2800 x.



Fonte: as autoras.

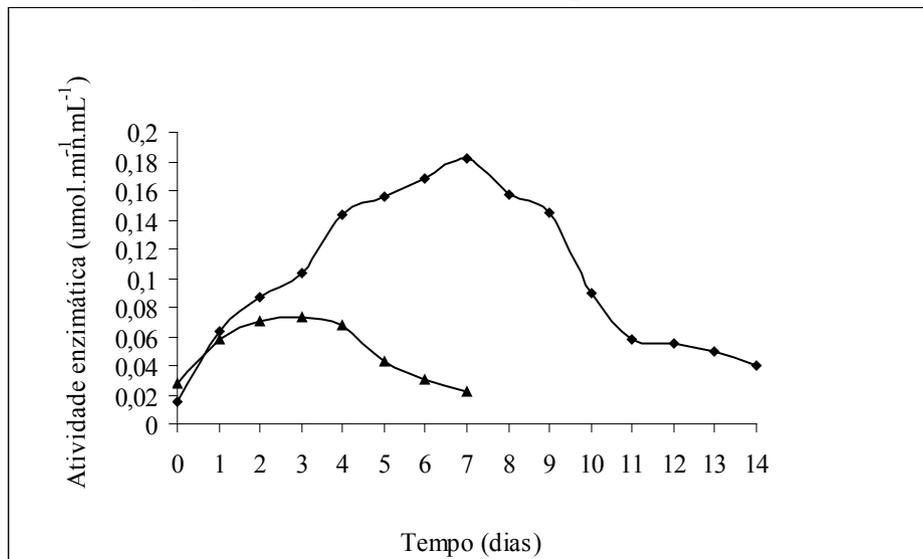
O desenvolvimento do fungo 17, identificado como *Penicillium*, apresentou colônias de coloração branca, com aspecto cremoso nas primeiras 48 horas de crescimento e tornaram-se amareladas até atingir 120 horas. Após 168 horas de crescimento ficaram esverdeadas, com aspecto aveludado. Essas características foram semelhantes às citadas na literatura para fungos do gênero *Penicillium* (PORTO et al., 1998; PITT, 1987; RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

O fungo *Aspergillus niger*, utilizado como fungo de referência, também apresentou as mesmas características descritas por outros pesquisadores (PORTO et al., 1998; BENSON, 2001; PRADO; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2005).

3.4 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE B-GALACTOSIDASE DE *PENICILLIUM* SP

O *Penicillium* sp apresentou um bom crescimento no substrato sólido de farelo de trigo com lactose, sintetizando a β -galactosidase que teve maior atividade após o sétimo dia de crescimento. Quando o fungo cresceu em meio de farelo de trigo sem lactose, inicialmente houve produção da enzima, mas ocorreu um decréscimo progressivo na atividade enzimática a partir do terceiro dia de crescimento, como mostra o Gráfico 2.

Gráfico 2 - Produção da enzima β -galactosidase, pelo fungo *Penicillium* sp. Ensaio a 26 °C, por 14 dias com adição de lactose e por 7 dias sem adição de lactose



Fonte: as autoras.

Com a adição de lactose no meio, o fungo sintetizou mais a β -galactosidase, demonstrando ser uma enzima indutiva. A maioria dos micro-organismos relatados na literatura apresenta melhor produção de β -galactosidase quando a lactose é adicionada ao meio de cultura (NAKAO et al., 1994; ONISHI; TANAKA, 1997; SANTIAGO et al., 2004; SEHNEM et al., 2000; NAKAGI, 2007).

Torres et al. (2010) encontraram produção de β -galactosidase para *Penicillium expansum*, *Penicillium funiculosum* e *Penicillium simplicissimum*. Outros fungos do gênero *Penicillium* também são citados como bons produtores de diferentes enzimas no meio farelo de trigo (SILVA JUNIOR, 2002; KO et al., 2003; SEYES; AKSOZ, 2004; BUDRIENE et al., 2004; RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004; SEHNEM, et al. 2005; TERRASAN, et al., 2010; MENONCIN et al., 2009; TAUK-TORNISIELO et al., 2009).

Tauk-Tornisielo et al. (2009) comparam a produção enzimática por *P. fellutanum* e *P. citrinum*, a 25 °C, em pH 5 por 72 horas, em meio sólido de farelo de trigo e em meio líquido de cultivo. O fungo crescido em meio de farelo de trigo apresentou o melhor resultado, sendo a atividade enzimática cerca de 56% maior do que no meio líquido.

3.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA B-GALACTOSIDASE SEMIPURIFICADA

Para a determinação da temperatura e do pH ótimos da atividade de β -galactosidase semipurificada foi utilizado planejamento fatorial completo de dois níveis (2^2), tendo como variáveis independentes o pH e a temperatura, e a variável dependente foi a atividade de β -galactosidase, tendo ONPG como substrato. Os resultados estão apresentados na Tabela 5, as análises estatísticas foram realizadas utilizando as variáveis independentes codificadas.

Tabela 5 – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de dois níveis e a atividade de β -galactosidase

Ensaio	Valores codificadas		Valores reais		Atividade (U.mL ⁻¹ .10 ⁻²)
	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	pH	
1	-1	-1	50	3,5	5,92
2	+1	-1	70	3,5	3,64
3	-1	+1	50	5,5	4,61
4	+1	+1	70	5,5	5,82
5	-1,41	0	46	4,5	6,95
6	+1,41	0	74	4,5	4,05
7	0	-1,41	60	3,0	4,43
8	0	+1,41	60	6,0	2,53
9	0	0	60	4,5	9,76
10	0	0	60	4,5	9,74
11	0	0	60	4,5	9,76

Fonte: as autoras.

Tabela 6 - Efeito do pH e da temperatura na atividade de β -galactosidase

	Efeitos	Erro puro	t(2)	P
	9,75120	0,006667	1462,697	0,000000
(1) Temperatura (L)*	-1,29360	0,008177	-158,197	0,000040
(2) pH (L)*	-0,45360	0,008177	-55,472	0,000325

Fonte: as autoras.

Nota: $\alpha = 0,05$ $R^2 = 0,9518$ *efeitos foram significativos

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que a maior atividade enzimática foi obtida com os valores dos pontos centrais, ou seja, em pH 4,5 a 60 °C e conforme a Tabela 6, quando houve o aumento do nível -1 para +1, os efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática foram negativos, indicando que o pH de 3,5 foi melhor que 5,5 e a temperatura de 50 °C foi melhor que 70 °C. Os efeitos da variação de temperatura afetaram mais a atividade da enzima do que a variação do pH.

Quanto à atividade enzimática, a qualidade do ajuste da equação do modelo polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 (0,9518), o qual indica que o modelo adequadamente representou a real relação entre os parâmetros escolhidos.

A análise de variância (Tabela 7) demonstrou que o modelo é estatisticamente significativo com a relação de F_{cal}/F_{tab} de 5,05; $p < 0,05$.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para efeito do pH e da temperatura na atividade da *b*-galactosidase

	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (SQ/GL)	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	65,5648	5	13,1129	19,77	5,05	3,91
Resíduo	3,3162	5	0,6632			
Falta de ajuste	3,3159	3	1,1053			
Erro puro	0,00027	2	0,000135			
Total	68,8810	10				

Fonte: as autoras.

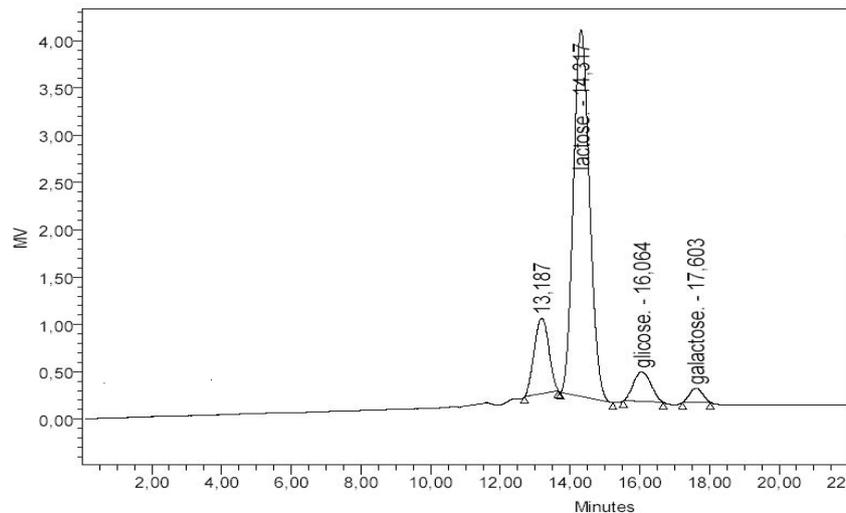
Nota: $R^2 = 0,9518$.

Prakash et al., (1989) cita a β -galactosidase produzida por *Penicillium frequentans*, e obteve valores ótimos de atividade em pH 4,0 e temperatura de 62 °C. Cruz et al. (1999) relata valores equivalentes para a β -galactosidase produzida por *Penicillium simplicissimum*. A β -galactosidase produzida por *Penicillium notatum* apresentou valores ótimos de atividade em pH variando de 4,0 a 5,0 e temperaturas entre 50 °C e 60 °C (SZCZODRAK; WIATER, 1999).

3.6 PRODUÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os resultados do efeito da concentração da enzima e do pH na conversão da lactose, analisados por CLAE, demonstraram que utilizando 2 U.mL⁻¹ de concentração de enzima ou pH 3,3, não houve ação enzimática sendo detectado apenas um pico no cromatograma identificado como lactose. Nos demais ensaios foram observadas a diminuição da concentração de lactose, a formação de glucose e galactose e a síntese de moléculas maiores que a lactose, cuja natureza não pôde ser identificada pela inexistência de padrão, que eluíram em 13,187 minutos. O perfil dos cromatogramas obtidos está exemplificado no Cromatograma 1.

Cromatograma 1 – Perfil cromatográfico de carboidratos. Reação a partir de solução de lactose 30% (p/v), pH 5,0, a 45 °C, por 24 horas, utilizando 8 U.mL⁻¹ de β -galactosidase de *Penicillium* sp



Fonte: as autoras.

Foram identificados os carboidratos galactose, glicose e lactose. Como a coluna cromatográfica utilizada também separa os compostos pela massa molecular, o pico detectado no tempo de retenção de 13,187 pode ser considerado de massa molecular maior que a lactose, sendo denominado como galacto-oligossacarídeo (GOS). Para confirmar esse comportamento, foi realizado um experimento em que foram determinados, nas mesmas condições cromatográficas deste ensaio, os tempos de retenção da mistura dos carboidratos glicose, galactose, lactose e rafinose (trissacarídeo); os três primeiros apresentaram os mesmos tempos de retenção e o da rafinose foi inferior ao da lactose, confirmando o comportamento dos açúcares quanto ao tamanho e à interação na coluna cromatográfica.

Nos ensaios fixando o valor de pH em 5,0 e variando a concentrações enzimáticas em 5, 8 e 9,2 U.mL⁻¹, foram obtidos picos nomeados como GOS com porcentagem de área de 15,33%, 14,21% e 15,83%, respectivamente, quando foi fixada a concentração de enzima em 5 U.mL⁻¹ e variando o valor de pH para 7,5 houve aumento de 26% na área do GOS. Comparando os picos obtidos de galactose e glucose nos cromatogramas, a glucose apresentou-se em maior concentração, indicando que o teor de galactose diminuiu porque parte das moléculas foram utilizadas para sintetizar os oligossacarídeos (TORRES et al., 2010). Segundo Berger, Lee e Lacroix (1995), na reação de transgalactosilação catalisada por β -galactosidase ocorre primeiro a formação de trissacarídeos, principalmente 4' galactosil-lactose, provavelmente porque estes são os precursores para a síntese dos tetrassacarídeos.

Os galacto-oligossacarídeos são uma mistura de compostos produzidos a partir da lactose, compreendendo entre 2 e 8 monômeros, sendo uma dessas unidades a glucose e as demais unidades a galactose; quando se tratar de um dissacarídeo, este é formado por duas moléculas de galactose (TZORTZIS; VULEVIC, 2009).

O trissacarídeo 4' galactosil-lactose [*O*- β -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal-(1-4)-D-Gli] foi preferencialmente formado por *Sporobolomyces singularis* (GORIN; SPENCER; PHAFF, 1964) e *Sterigmatomyces elviae* (ONISHI; YAMASHIRO; YOKOZEKI, 1996). A produção de 4' galactosil-lactose é de interesse porque tem sido considerado um efetivo promotor de crescimento de bifidobactérias (TANAKA et al., 1983; OHTSUOKA et al., 1989), além do interesse do uso dos oligossacarídeos, como ingredientes nos alimentos, em razão suas propriedades fisiológicas (TOMOMATSU, 1994).

Este estudo demonstra a potencialidade de atividade de transgalactosilação da enzima com possível utilização desse oligossacarídeo em alimentos, associada ao fato de o *Penicillium* ser considerado um micro-organismo GRAS (*generally recognized as safe*) e a possibilidade de ter ação bifidogênica.

4 CONCLUSÃO

Os fungos filamentosos selecionados como bons produtores da enzima β -galactosidase foram identificados como do gênero *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. O *Penicillium* sp (micro-organismo n. 17) apresentou maior capacidade de produção de β -galactosidase sintetizada indutivamente, que expressou atividade hidrolítica para lactose e atividade de transferase para síntese de galacto-oligossacarídeos. Este fungo é de interesse para a indústria de alimentos como produtor de β -galactosidase, sendo essa afirmação fortalecida pelo fato de os fungos desse gênero serem considerados GRAS.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e identificação dos fungos de importância médica**. 2004. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2011.
- ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Açúcares funcionais: Galactooligossacarídeos. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 32, p. 10-14, 2004.
- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the Production of Amylase, Lipase, Polygalacturonase and Protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 4, oct./dec. 2002.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R. Recombinant β -galactosidases—past, present and future: a mini review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Accepted Manuscript, abr. 2012.
- BARBOSA, A. S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 63-79, jan./mar. 2010.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2002. 299 p.
- BENSON, H. J. **Microbiological Applications Lab. Manual**. 8. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2001.
- BERGER, J. L.; LEE, B. H.; LACROIX, C. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermos aquaticus* YT-1. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 10, p. 1077-1080, 1995.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York: Marcel Dekker, 1997. 720 p.
- BRAND, D. et al. Production of Fungal Biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. **Micologia Aplicada Internacional**, v. 22, n. 1, p. 31-48, 2010.
- BRAND, D. **Fisiologia de crescimento e de esporulação de fungos nematófagos cultivados em meio sólido**. 2006. 187 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)—Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- BUDRIENE, S. et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2004.
- CAMPOS, A. et al. Predatory activity, radial growth and sporulation of nematode-trapping fungus *Monacrosporium* spp, submitted to cryopreservation. **Ciência Rural**, v.34, n.2, 2010.
- CANTERI, M. G. et al. SASM – AGRI: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18-24, dez. 2001.

CASTRO, I. A.; TIRAPEGUI, J.; SILVA, R. S. S. F. Application of multivariate statistical methods to the analysis of the cost, nutritional and sensorial quality for some proteins used in food formulation. **Journal Food Quality**, v. 25, p. 83-90, 2002.

COLLA, L. M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio/jun. 2008.

CRUZ, R. et al. Production of transgalactosylated oligosaccharides TOS by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 165-171, 1999.

DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. **Biochemistry Journal**, v. 80, p. 547-551, fev 1961.

DONINI, L. P. et al. Desenvolvimento in vitro de *Pleorotus sp* sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivo: Instituto de Biologia, São Paulo**, v. 72, n. 3, p. 331-338, jul./set. 2005.

DYKSTRA B. W.; JAEGER, K. E. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. **Coloids and surfaces**, v. 26, p. 37-46, nov. 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.gov.br>>. Acesso em: 25 jul. 2010.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 652 p.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; PHAFF, H. J. The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by *Sporobolomyces singularis*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 42, 1964.

GOULAS, T. et al. Expression of four β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171 and their contribution on the hydrolysis and synthesis of galactooligosaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 899-907, maio 2009.

GUTARRA, M. L. E. et al. Lipase production by solid-state fermentation Cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 105-116, 2005.

HORWITZ, W. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL, 17. ed. Horwitz, W.; Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. v. 1.

- JURADO, E. et al. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hydrolysis of Lactose by β -galactosidase from *Kluyromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.
- KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- KO, S. R. et al. Enzymatic Preparation of Ginsenosides Rg2, Rh1, and F1¹. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 4, p. 404-408, 2003.
- LISBOA, C. R. et al. Síntese de galacto-oligosacarídeos a partir de lactose usando β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 30-40, jan./mar. 2012.
- LOREAU, M. et al. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. **Science**, v. 26, p. 804-808, 2001.
- MACHADO, J. C. et al. Use of water restriction in the inoculation of fungi in maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 147-154, out. 1998.
- MANUCCI, F. **Enzymatic synthesis of Galactooligosaccharides from Whey Permeate**. 2009. Tese (Doutorado)–Dublin Institute of Technology, Dublin, 2009.
- MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, jul./set. 2009.
- MENONCIN, S. et al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação no estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 440-443, abr./jun. 2009.
- NAGY, Z. et al. β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24-29, fev. 2001.
- NAKAGI, V. S. **Caracterização da atividade da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum***. 2007. Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- NAKAO, M. et al. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *saccharopolyspora rectivirgula*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 657-663, 1994.
- NIZZAMUDDIN, S.; SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1096-1100, 2008.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

OHTSUOKA, K. et al. Effects of 4-galactosyl-lactose intake on human fecal flora. **Bifidus**, v. 2, p. 143-149, 1989.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 82-86, 1997.

ONISHI, N.; YAMASHIRO, A.; YOKOZEKI, K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4022-4025, 1996.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória CMI de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, mar. 2008.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, ago. 2000.

PARK, Y. K.; SANTI, M. S. S. de; PASTORE, G. M. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 1, p. 100-103, jan. 1979.

PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Purification and characterization of β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. **Journal of Fermentation Technology**, v. 58, n. 1, p. 79-81, 1980.

_____. Screening of high β -galactosidase-producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1577-1579, 1979.

PINTO, N. F. de A. Grãos ardidos em milho. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, 2005. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo, Circular técnica, 66).

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and Production of Ochratoxin A. **American Society for Microbiology**, v. 53, p. 266-269, 1987.

PORTO, E. et al. **Guia de identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. São Paulo: FAPESP, 1998.

PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Relation between Citric Acid Production by Solid-State Fermentation from Cassava Bagasse and Respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in Semi-Pilot Scale. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 29-36, jun. 2005.

PRAKASH, S. et al. Structure elucidation of major galacto oligosaccharides formed by growing culture of *Trichoderma harzianum*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 37, p. 334-337, 1989.

- RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats**. 2009. Dissertação (Mestrado em Concentração de Microbiologia)–Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 126-131, jan./mar. 2010.
- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, abr./jun. 2004.
- SANTIAGO, P. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, Campinas, 2004.
- SEHNEM, N. T. et al. Produção de celulases por *Penicillium echinulatum* em meio de cultura contendo lactose. **Instituto de Biotecnologia**, Universidade de Caxias do Sul, 2000.
- SEYES, I.; AKSOZ, N. Production of Lactase by *Trichoderma* sp. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 121-124, 2004.
- SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 5. ed. São Paulo: Varela, 2002.
- SMITH, D. **Maintenance of filamentous fungi**. London: Academic Press, 1991.
- SOMOGYI, N. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19-23, 1952.
- SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 116-124, 2008.
- STALEY, T. E. et al. Soil microbial biomass and organic component alterations in a no-tillage chronosequence. **Soil Science. Society American Journal**, v. 52, p. 998-1000, 1988.
- SZCZODRAK, J.; WIATER, A. Selection of method for obtaining an active lactase preparation from *Penicillium notatum*. **Journal Microbiology**, v. 38, p. 71-75, 1999.
- TANAKA, R. et al. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. **Bifidobacteria Microflora**, v. 2, n. 1, p. 17-24, 1983.
- TAUKE-TORNISIELO, S. M. et al. Lipid formation and α -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 342-345, 2009.

TERRASAN, C. R. et al. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4139-4143, jun. 2010.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 61-65, out. 1994.

TORRES, D. P. M. et al. Galacto-oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 9, 2010.

TZORTZIS, G.; VULEVIC, J. Galacto-oligosaccharide prebiotic. In: CHARALAMPOPOULOS, RASTALLRA. (Ed.). **Prebiotics and probiotics science and technology**. New York: Springer, 2009.
VERA, C. et al. Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 188-194, 2012.

VIKAS, S. S. K. et al. Galacto-oligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, jan. 2011.

WALLENFELS, K.; MALHOTRA, O. P. Galactosidase. **Advances Carbohydrate Chemistry**, v. 16, p. 239-298, 1961.

Recebido em 2 de julho de 2012

Aceito em 20 de julho de 2012