

REGIANE GONÇALVES FEITOSA LEAL NUNES

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lentinula edodes* E PRODUÇÃO DE
SHIITAKE EM SUBSTRATO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N972a
2005

Nunes, Regiane Gonçalves Feitosa Leal, 1966-
Atividade biológica de *Lentinula edodes* e produção de
shiitake em substrato enriquecido com selênio. / Regiane
Gonçalves Feitosa Leal Nunes. – Viçosa: UFV, 2005.
xv, 127f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografias.

1. Cogumelos shiitake – Efeito de selênio. 2. Cogume-
los shiitake – Crescimento. 3. Cogumelos shiitake – Es-
curecimento enzimático. 4. *Lentinula edodes*. I. Univer-
sidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.8

REGIANE GONÇALVES FEITOSA LEAL NUNES

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lentinula edodes* E PRODUÇÃO DE
SHIITAKE EM SUBSTRATO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 18 de março de 2005

Prof. Maurício Dutra Costa
(Conselheiro)

Dra. Virgínia Maria Chaves Alves

Prof^a Neuza Maria Brunoro Costa

Prof. Eustáquio Souza Dias

Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos meus pais, Benjamim e Rda Gonçalves

Aos meus irmãos, Régio Luís, Ricardo Wagner, Regina Fátima e Reginaldo
Pelo apoio e incentivo constantes

Ao meu esposo, Luis Alfredo
“Que me completa”

As minhas filhas, Carolina, Camila e Cecília
“Que dão sentido à minha vida”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por se fazer presente em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro com a concessão de bolsa em nível de Doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelos ensinamentos, incentivo e precisa orientação.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya por está sempre à disposição em colaborar para o andamento deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Maurício Dutra Costa pelas sugestões e ensinamentos que foram de extrema importância na realização deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos valiosos ensinamentos.

A Doutora Virgínia Maria Chaves Alves, a professora Neuza Maria Brunoro Costa do Departamento de Nutrição, a professora Margarida Matos de Mendonça da Universidade Federal de Santa Catarina e ao professor Eustáquio Souza Dias da Universidade Federal de Lavras pelas valiosas sugestões.

À Ângela Sayaka Higuchi, a quem eu tenho enorme gratidão, que tornou meu trabalho menos árduo com sua presença e ajuda constantes.

Ao Rodrigo de Barros Freitas, pela sua preciosa ajuda, apoio e estímulo durante a realização dos trabalhos no laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Associações Micorrízicas pela alegre convivência, em especial a Cristiane Santana, pela presteza em colaborar no andamento deste trabalho, ao Akihiko Manabi pelo apoio e ajuda quando necessário e a Daniela Campos pelo apoio constante e a todos os colegas do curso pelo companheirismo.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, sem distinção, por estarem sempre prontos a colaborar.

A minha querida amiga Silvia Rosane Colodeti Yokota, pela maravilhosa convivência, pelo incentivo e apoio constantes.

A Selene pela calorosa acolhida, pelo apoio e incentivo. Ao Paulo Henrique pelo apoio e colaboração constantes. A Cláudia Macedo pelos momentos de descontração, pelo incentivo e ajuda. A Mauren, Ivaneide e Gisele pela amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, a minha sincera gratidão.

ÍNDICE GERAL

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
REVISÃO DE LITERATURA	1
1. IMPORTÂNCIA DO SELÊNIO PARA O ORGANISMO HUMANO	1
2. SUPLEMENTAÇÃO DE ALIMENTOS COM SELÊNIO	7
2.1. Enriquecimento de cogumelos com selênio	7
3. COGUMELO SHIITAKE	10
4. EFEITO DO SELÊNIO SOBRE FUNGOS FILAMENTOSOS	12
4.1. Efeito do selênio sobre a atividade enzimática de fungos produtores de cogumelos	12
4.2. Efeito do selênio sobre a morfologia dos fungos	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1 - CRESCIMENTO E MORFOLOGIA MICELIAL DE <i>Lentinula edodes</i> CULTIVADO EM SUBSTRATOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SELENITO DE SÓDIO	28
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Crescimento de <i>L. edodes</i> em meios de cultura com diferentes concentrações de selênio	30
2.2. Morfologia micelial	31
2.3. Análise estatística	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Crescimento de <i>L. edodes</i> em meios de cultura com diferentes concentrações de selênio	33
3.2. Morfologia da colônia	40
3.3. Morfologia micelial	42
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

CAPÍTULO 2 - ATIVIDADES ENZIMÁTICA E RESPIRATÓRIA DO FUNGO <i>Lentinula edodes</i> CULTIVADO EM SUBSTRATO LIGNINOCELULÓSICO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SELENITO DE SÓDIO	49
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1. Atividade enzimática específica	52
2.1.1. Lacase	52
2.1.2. Celulase	53
2.1.3. Xilanase	54
2.2. Atividade respiratória	54
2.3. Análise estatística	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Atividade enzimática específica	56
3.2. Atividade respiratória	63
4. CONCLUSÕES	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 3 - ENRIQUECIMENTO DE COGUMELO SHIITAKE (<i>Lentinula edodes</i>) COM SELÊNIO	75
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1. Isolados e inóculo	77
2.2. Enriquecimento de cogumelo shiitake com Se	77
2.3. Análises físico-químicas do substrato ligninocelulósico e da água de umidificação desse substrato	78
2.4. Análises físico-químicas do cogumelo	78
2.4.1. Tamanho	79
2.4.2. Cor	79
2.4.3. Umidade	79
2.4.4. Proteínas solúveis	79
2.4.5. Minerais e selênio	80
2.5. Produtividade	80
2.6. Eficiência biológica	80
2.7. Análise estatística	80

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1. Análises físico-químicas do substrato ligninocelulósico e da água de umidificação desse substrato	81
3.2. Análises físico-químicas do cogumelo	81
3.3. Produtividade	89
3.4. Eficiência biológica	90
4. CONCLUSÕES	92
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	99

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
Revisão de Literatura	
Tabela 1 – Ingestão Diária Recomendada dos elementos traços durante o ciclo de vida de uma pessoa	5
Capítulo 3	
Tabela 1 – Eficiência Biológica de cogumelos shiitake enriquecidos com Se, produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais imersas em 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L ⁻¹ de selenito de sódio e controle sem Se	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
Capítulo 1	
Figura 1 – Curvas de crescimento de 12 isolados do fungo <i>L. edodes</i> UFV11, UFV16, UFV53, UFV62, UFV63, UFV73, UFV74, UFV75, UFV78, UFV80, UFV81, UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em BDA acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio, A= 0,32 mmol L ⁻¹ ; B= 0,64 mmol L ⁻¹ ; C= 0,96 mmol L ⁻¹ ; D= 1,28 mmol L ⁻¹ e E= controle sem selênio	34
Figura 2 – Aspecto das colônias do isolado UFV53 cultivado, a 25 °C por 12 dias, em BDA (A) ou em substrato ligninocelulósico (B) com concentrações crescentes de selenito de sódio	35
Figura 3 – Curvas de crescimento de 12 isolados do fungo <i>L. edodes</i> , UFV11, UFV16, UFV53, UFV62, UFV63, UFV73, UFV74, UFV75, UFV78, UFV80, UFV81, UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em substrato ligninocelulósico acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio, A= 0,32 mmol L ⁻¹ ; B= 0,64 mmol L ⁻¹ ; C= 0,96 mmol L ⁻¹ ; D= 1,28 mmol L ⁻¹ e E= controle sem selênio	36
Figura 4 – Taxas específicas de crescimento de 12 isolados do fungo <i>L. edodes</i> , UFV11, UFV16, UFV53, UFV62, UFV63, UFV73, UFV74, UFV75, UFV78, UFV80, UFV81, UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em BDA (A) ou em substrato ligninocelulósico (B) acrescidos de quatro concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio	38
Figura 5 – Massa seca de 12 isolados do fungo <i>L. edodes</i> , UFV11, UFV16, UFV53, UFV62, UFV63, UFV73, UFV74, UFV75, UFV78, UFV80, UFV81, UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em BDA acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio	39
Figura 6 – Aspecto da colônia do isolado UFV74 de <i>L. edodes</i> cultivado, por 12 dias a 25 °C, em substrato ligninocelulósico não adicionado (controle) ou adicionado de 0,32 mmol L ⁻¹ de selenito de sódio	41
Figura 7 – Distribuição dos pares de núcleos no micélio do isolado UFV11, cultivado por 6 dias a 25 °C, em BDA acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio, A= 0,32 mmol L ⁻¹ (100x); B= 0,64 mmol L ⁻¹ (100x); C= 0,96 mmol L ⁻¹ (100x); D= 1,28 mmol L ⁻¹ (100x) e E= controle sem selênio (100x). As setas exemplificam alguns núcleos onde suas distâncias foram determinadas	42

Figura 8 - Diâmetro das hifas (A), distância entre septos (B), distância entre núcleos (C) dos isolados UFV11, UFV16 e UFV53, do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados em BDA com diferentes concentrações de selenito de sódio	43
---	----

Capítulo 2

Figura 1 - Atividade enzimática da lacase dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53, do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados a 25 °C por 7 dias; 14 dias e 21 dias, em diferentes concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio	57
--	----

Figura 2 - Atividade enzimática da celulase dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53, do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados a 25 °C por 7 dias; 14 dias e 21 dias, em diferentes concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio	59
--	----

Figura 3 - Atividade enzimática da xilanase dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53, do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados a 25 °C por 7 dias; 14 dias e 21 dias, em diferentes concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio	61
--	----

Figura 4 - Atividade respiratória medida do quinto ao décimo segundo dia de crescimento, dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53 do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados a 25 °C, em substrato ligninocelulósico acrescido de 0,32 mmol L ⁻¹ ; 0,64 mmol L ⁻¹ ; 0,96 mmol L ⁻¹ ; 1,28 mmol L ⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio	64
--	----

Figura 5 - Atividade respiratória medida do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento, dos isolados (A) UFV11 (B) UFV16 e (C) UFV53 do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados a 25 °C, em substrato ligninocelulósico acrescido de 0,32 mmol L ⁻¹ ; 0,64 mmol L ⁻¹ ; 0,96 mmol L ⁻¹ ; 1,28 mmol L ⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio	65
--	----

Figura 6 - Atividade respiratória acumulada, medida do quinto ao décimo segundo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados, a 25 °C, em substrato ligninocelulósico	67
--	----

Figura 7 - Atividade respiratória acumulada medida do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo <i>L. edodes</i> , cultivados a 25 °C, em substrato ligninocelulósico	67
---	----

Capítulo 3

Figura 1 – Valores L (A), a (B) e b (C) referentes à cor dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio	83
---	----

Figura 2 – Teor de umidade dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52, em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio	84
--	----

Figura 3 – Teor de Ca (A), Mg (B), P (C) e K (D) dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio	86
Figura 4 – Teor de selênio dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio	87
Figura 5 – Produtividade dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio	89

RESUMO

NUNES, Regiane Gonçalves Feitosa Leal, D.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2005. **Atividade biológica de *Lentinula edodes* e produção de shiitake em substrato enriquecido com selênio**. Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Maria Catarina Megumi Kasuya, Maurício Dutra Costa e Margarida Matos de Mendonça.

O enriquecimento do cogumelo shiitake com selênio (Se) pode ser uma alternativa para elevar seu valor nutricional e funcional. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Se sobre o crescimento e atividade biológica do fungo *Lentinula edodes* e produzir shiitake enriquecido com esse elemento. O crescimento de doze isolados de *L. edodes*, cultivados em ágar batata dextrose (BDA) e em substrato ligninocelulósico, contendo 0,32; 0,64; 0,96; 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem Se, variou com o substrato, com o isolado e com a concentração de Se. A matéria seca fúngica da maioria dos isolados cultivados em BDA diminuiu com o aumento da concentração de Se no meio de cultivo. Foram selecionados os isolados UFV11, UFV16 e UFV53, para continuidade do estudo, com base no crescimento da colônia, na biomassa seca e no potencial de produção de cogumelos. Os diâmetros das hifas, as distâncias entre septos e entre núcleos tenderam a diminuir nas maiores concentrações de Se. A atividade da lacase foi crescente com o aumento da dose de selenito de sódio enquanto que as atividades da celulase e xilanase diminuíram. A taxa respiratória acumulada variou com o isolado e foi maior no isolado UFV11. A morfologia e o tamanho dos cogumelos, cultivados em substratos enriquecidos com 0,08; 0,16 e 0,32 mmol L⁻¹ de selenito de sódio, não variaram com a presença de Se e nem entre os isolados. Os valores de L, a e b, referentes à cor dos cogumelos foram menores nos tratamentos com Se quando comparados com o controle. O teor de umidade dos cogumelos variou de 89 a 91 % e aumentou na maior dose de Se. Os

valores de proteínas solúveis foram em média 22,3 mg g⁻¹ de matéria seca e não variaram com a presença de Se e nem com o isolado. Os teores de cálcio e de fósforo não variaram com o aumento da concentração de Se enquanto que os de magnésio tenderam a aumentar e os de potássio a diminuir. As concentrações de Se dos cogumelos aumentaram linearmente com o aumento da dose de selenito de sódio, sendo encontrado valores superiores a 17 mg 100 g⁻¹ de cogumelos desidratados no tratamento com 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio. Nos cogumelos do tratamento controle não foi detectado Se. A produtividade dos cogumelos aumentou até a concentração 0,32 mmol L⁻¹ de selenito de sódio. O isolado UFV16 foi o que apresentou maior eficiência biológica em doses mais elevadas de Se.

ABSTRACT

NUNES, Regiane Gonçalves Feitosa Leal, D.S. Universidade Federal de Viçosa, March 2005. **Biological activity of *Lentinula edodes* and mushroom production in substrate enriched by Selenium.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee Members: Maria Catarina Megumi Kasuya, Maurício Dutra Costa and Margarida Matos de Mendonça.

Enrichment of shiitake mushroom by selenium (Se) can be an alternative to elevate its nutritional and functional value. The objective of this work was to evaluate the effect of Se on the growth and biological activity of fungus *Lentinula edodes* and to produce shiitake enriched with that element. The growth of 12 isolates of *L. edodes*, cultivated in Potato Dextrose Agar (PDA) and in ligninocelulosic substrate, containing 0.32; 0.64; 0.96; 1.28 mmol L⁻¹ of sodium selenite and control without Se, varied according to substrate, to fungus isolate and to Se concentration. Fungal dry matter of most of the isolates cultivated in PDA decreased with the increase of the Se concentration in the cultivation medium. Isolates UFV11, UFV16 and UFV53 were selected, for the continuity of the study, based in the growth of the colony, in the dry biomass and in the potential of mushrooms production. Hyphae diameters, distances between septa and between nuclei tended to decrease in higher Se concentrations. Laccase activity was growing with the increase of sodium selenite while cellulase and xylanase activities decreased. The accumulated respiratory rate varied with the isolate and was higher in Isolate UFV11. Mushrooms morphology and size, cultivated in substrate enriched with 0.08; 0.16 and 0.32 mmol L⁻¹ of sodium selenite, did not varied according to Se concentration and neither among isolates. L, a and b values, regarding the mushroom's color were lower in treatments by Se compared with control. Mushrooms humidity varied from 89 to 91% and increased in the higher Se

concentration. Soluble proteins were 22.3 mg g^{-1} of dry matter on average and did not varied with Se presence neither among isolate. Calcium and phosphorus did not varied with the increase of Se concentration while magnesium tended to increase and potassium to decrease. Se concentrations of the mushrooms increased lineally with the increase of the sodium selenite, being found values above to $17 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ of mushrooms dehydrated in the treatment with 0.64 mmol L^{-1} sodium selenite. In the mushrooms of the treatment control Se was not detected. Mushroom productivity increased until 0.32 mmol L^{-1} sodium selenite. Isolate UFV16 was the one presented greater biological efficiency in higher Se concentration.

REVISÃO DE LITERATURA

1. IMPORTÂNCIA DO SELÊNIO PARA O ORGANISMO HUMANO

A utilização de nutrientes pelo organismo é comprometida pela deficiência de vitaminas e de minerais. Os minerais desempenham funções importantes nas células, seja na forma iônica ou como constituintes de compostos vitais (Mahan e Escott-Stump, 2002). Os autores afirmam que de modo geral, os minerais regulam a atividade de diversas enzimas, mantêm o equilíbrio ácido-básico, a pressão osmótica, facilitam a transferência de compostos essenciais através das membranas, mantêm a estabilidade muscular e nervosa e, em alguns casos, fazem parte dos elementos constituintes dos tecidos do organismo. A ingestão inadequada desses elementos pode impedir a função celular ou causar doenças. A carência de nutrientes como ferro (Fe), iodo (I), zinco (Zn), cálcio (Ca), vitaminas A e B₁₂ prejudica a nutrição, a saúde, a resistência às infecções, o desenvolvimento físico, o aprendizado e a capacidade de trabalho de seus portadores (Neumann et al., 2002) e a deficiência de selênio (Se) pode levar a formação de câncer, doenças cardiovasculares e muitas outras doenças endêmicas (Min et al., 2004). A baixa ingestão de Se tem sido relacionada com o aumento da incidência de várias doenças (Pagmantidis et al., 2005).

O Se é um micronutriente essencial em baixas concentrações (µg), mas é tóxico ao homem e animais em altas doses (Brätter et al., 1984; Simonoff e Simonoff, 1991; Viñas et al., 2005). Recentemente, o Se tem despertado interesse na pesquisa médica e nutracêutica, bem como na indústria de alimentos (Werner e Beelman, 2002). É um mineral presente em todas as células e em todos os tecidos do organismo animal, em concentrações que variam com o tecido e a forma química do elemento na dieta (Martin, 1993). Quimicamente, é classificado como metalóide, com propriedades tanto de metal como de não metal. Está diretamente relacionado com o enxofre (S) em estrutura e função e forma compostos inorgânicos, como o selenito e o selenato e compostos orgânicos, como os selenoaminoácidos, que correspondem aos sulfitos, sulfatos e aminoácidos sulfurados (Reilly, 1998).

Os sais de Se inibem a peroxidação de lipídios e, desta forma, atuam na proteção da integridade das membranas biológicas, das mitocôndrias, de

microssomos e de lisossomos (Martin, 1993). Participa, ainda, juntamente com o tocoferol, na proteção das células e organelas contra lesões oxidativas, possibilitando a união entre o oxigênio e hidrogênio no final da cadeia respiratória, na transferência de íons através das membranas celulares e auxilia a síntese de imunoglobulinas e ubiquinona (Mahan e Escott-Stump, 2002; Czajka-Narins, 1995).

Tolonen (1990) atribuiu ao Se as seguintes funções e importância fisiológica: imunidade orgânica, prevenção de mutações e neoplasias e inibição da agregação plaquetária, além de ser antioxidante. A atividade biológica do Se se deve à ação de selenoenzimas. Embora o Se tenha numerosas funções fisiológicas, sua função mais conhecida é como cofator necessário ao sistema glutathiona peroxidase, responsável pela remoção dos radicais livres do organismo, reduzindo o dano oxidativo. O Se participa da estrutura de alguns aminoácidos, como os sulfurados, que são precursores da glutathiona peroxidase (GSH-Px) (Martin, 1993).

Diversas funções biológicas importantes do Se dependem da atividade de certas proteínas contendo esse elemento. As primeiras selenoproteínas funcionais identificadas foram as enzimas GSH-Px, que são parte do sistema de defesa antioxidante do corpo (Reilly, 1998). O autor afirma que a função destas enzimas é degradar peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídeo gerados por radicais livres que podem danificar membranas celulares e interromper as funções das células. Neste estudo foi informado que mais de 30 selenoproteínas foram identificadas e suas estruturas, pelo menos em parte, determinadas, sendo que essa variedade indica a larga gama de vias bioquímicas e funções fisiológicas para as quais o Se contribui. O autor comenta que quando as estruturas e funções das selenoproteínas se tornarem conhecidas, é provável que problemas clínicos que não têm até agora sido relacionados ao Se, sejam revelados.

Doenças causadas pela deficiência de Se têm sido relatadas em muitos países (Tinggi, 2003). A deficiência de Se causa a doença de Kaschim-Beck que afeta juntas e cartilagens, aumentando o risco de doenças cardíacas e câncer (Tolonen, 1990; Werner e Beelman, 2002). O Se atenua os efeitos tóxicos do arsênio (Tolonen, 1990; Miyazaki, 2005) e pode também proteger contra imunossupressão relacionada à idade (Turner e Finch, 1991).

Manifestações constatadas de deficiência de Se incluem mialgia, músculos flácidos, miopatia cardíaca, aumento de fragilidade das células vermelhas sanguíneas

e degeneração pancreática (Mahan e Escott-Stump, 2002). Doenças relacionadas com o funcionamento da glândula tireóide, doenças degenerativas (National Research Council-NRC 1989) e outras, como artrite e diabetes também estão associadas com a deficiência de Se no organismo humano (Reilly, 1998). Reilly (1998) considerou que existe uma possível relação entre ingestão dietética de Se e doenças cardiovasculares e câncer, pois há evidências de um efeito protetor do Se contra essas doenças em humanos. Além disso, o Se parece desempenhar função importante no sistema imune e na resposta do corpo a infecções.

Certos compostos derivados do Se vem sendo usados com sucesso no tratamento de câncer (Gasó et al., 2000). Além disso, tem sido verificado que uma dieta suplementada com Se pode inibir a incidência e o número de tumores que ocorrem em vários modelos experimentais de câncer, em estudos epidemiológicos usando cobaias em laboratório (Spolar et al., 1999). Sieja e Talerczyk (2004) e Sieja e Talerczyk (2005) atribuíram à suplementação de Se, os benefícios observados em mulheres em tratamento quimioterápico contra câncer de ovário. Neste estudo, foi observado que a atividade antioxidante do Se é 200 % maior do que a da vitamina C, que é considerada um excelente antioxidante. A suplementação com Se pode aumentar a eficácia da substância usada em tratamento de câncer colorretal em estado avançado (Altundag et al., 2005). A consequência mais severa da deficiência de Se em humanos é a doença de Keshan, uma cardiomiopatia fatal que afeta crianças e gestantes. Esta doença é prevalente em regiões da China, onde a ingestão média de Se é da ordem de 3 µg/dia a 22 µg/dia, de acordo com Yang et al. (1983) e 4 µg/dia a 11 µg/dia de acordo com Robinson (1989).

Em crianças alimentadas com nutrição parenteral sem suplementação com Se, foi observada redução no crescimento, peso elevado em relação à estatura, despigmentação da pele e cabelos e perda de cabelos (Newly, 1989). Os dois últimos problemas foram corrigidos com dois meses de tratamento constituído da administração de 2 µg/kg de Se na forma de ácido selenoso.

A necessidade de Se pelo organismo está relacionada com o peso corporal. O IOM (2000a) recomenda uma ingestão de 55 µg/dia para os norte-americanos adultos do sexo masculino e feminino. Recomenda ainda, um acréscimo de 5 µg/dia durante a gestação e 15 µg adicionais durante a lactação. Os requerimentos podem aumentar

quando se eleva o conteúdo de ácidos graxos insaturados na dieta em razão da necessidade da atividade antioxidante do Se (Mahan e Escott-Stump, 2002).

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) é a quantidade de vitaminas, minerais e proteínas que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia. A IDR de Se (Tabela 1) do brasileiro toma como referências a Resolução GMC nº 18/94 - Mercosul e Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances (RDA), 10th revised edition, National Academy of Science (NAS), Washington D.C., 1989 (Brasil, 1998).

Robinson e Thomson (1983) verificaram que o Se foi absorvido sob condições de alimentação normal no organismo humano, pois a absorção não é fator limitante para a biodisponibilidade. Estudos que compararam o destino metabólico do Se consumido na forma de sal, como selenito ou selenato ou na forma orgânica, como selenometionina, mostraram que a forma química do Se ingerido afeta diretamente seu metabolismo (Finley, 1999; Viñas et al., 2005). A selenometionina é mais bem absorvida que o selenito e pode ser ativamente absorvida pelo mesmo mecanismo da metionina e, presumivelmente, o mesmo é verdadeiro para a selenocisteína (Robinson e Thomson, 1983). Este estudo comprovou que o selenito é absorvido passivamente mas, rapidamente, evidenciando o seu aparecimento no plasma 30 min após sua ingestão.

A selenometionina ingerida substitui a metionina em várias proteínas, especialmente proteínas do músculo esquelético e, particularmente, quando grandes doses de selenometionina são ingeridas. Entretanto, a extensão desta substituição depende da proporção selenometionina/metionina na dieta e não parece estar sob controle homeostático (Burk e Hill, 1993). Neste estudo foi ainda observado que a selenometionina pode ser metabolizada a selenocisteína pelas vias da transaminação da metionina e transsulfuração, quando quantidades adequadas de metionina estão disponíveis.

Tabela 1 – Ingestão Diária Recomendada dos elementos traços durante o ciclo de vida de uma pessoa

GRUPO	IDADE (anos)	FERRO	ZINCO	ODO	SELÊNIO
		(mg/dia)		(µg/dia)	
Bebês	0 - 0,5	0,27	2	110	15
	0,5 - 1,0	11	3	130	20
Crianças	1 - 3	7	3	90	20
	4 - 8	10	5	90	30
Homens	9 - 13	8	8	120	40
	14 - 18	11	11	150	55
	19 - 30	8	11	150	55
	31 - 50	8	11	150	55
	51 - 70	8	11	150	55
	> 70	8	11	150	55
Mulheres	9 - 13	8	8	120	40
	14 - 18	15	9	150	55
	19 - 30	18	8	150	55
	31 - 50	18	8	150	55
	51 - 70	8	8	150	55
	> 70	8	8	150	55
Gestantes	≤ 18	27	12	220	60
	19 – 30	27	11	220	60
	31 - 50	27	11	220	60
Lactantes	≤ 18	10	13	290	70
	19 – 30	9	12	290	70
	31 - 50	9	12	290	70

FONTES: IOM (2000a); IOM (2000b)

Por meio da determinação da atividade da GSH-Px verificou-se que em humanos, a selenometionina é absorvida e retida mais eficientemente que o selenato ou selenito, pois as formas orgânicas de Se são melhor retidas do que o Se inorgânico, embora todas as formas causaram aumentos similares na atividade da GSH-Px (Levander, 1983). O selenato foi absorvido mais eficientemente que o selenito, neste estudo, mas não foi tão efetivo para manter o Se no organismo. O selenato pode compartilhar a mesma via de absorção do enxofre e tem uma absorção de 95 % quando comparado ao selenito, com 62 % (Robinson e Thomson, 1983). O Se orgânico parece ser prontamente armazenado por incorporação não específica dentro do músculo esquelético enquanto o Se inorgânico pode não ser prontamente armazenado, mas permanecer em um *pool* no corpo e ser utilizado na síntese imediata de selenoproteínas funcionais (Daniels, 1996).

O metabolismo do Se, particularmente a reutilização da forma orgânica, está intrinsecamente ligada ao metabolismo dos aminoácidos e depende, em grande parte, da forma de Se ingerida ou usada como suplementação (Daniels, 1996). O metabolismo do Se é também afetado pela quantidade de Se ingerido na dieta diária e tais diferenças também estão parcialmente relacionadas à incorporação de Se nas proteínas (Finley, 1999). De acordo com o autor, a forma de Se fornecido na dieta também pode influenciar a propriedade anticarcinogênica desse elemento traço.

Alimentos marinhos, rins e fígado e, em menor quantidade, outras carnes, são boas fontes de Se, enquanto que em grãos e outras sementes o teor de Se é variável e depende do teor desse mineral no solo em que foram produzidos (WHO, 1987). Os alimentos de origem vegetal contêm maior proporção de selenometionina que o tecido animal. O teor de Se nos alimentos depende, em grande parte, de fatores ambientais, incluindo o teor de Se do solo e a porosidade do mesmo (Geering et al., 1988). De acordo com Ferreira (1995), o Se é um mineral deficitário na alimentação básica do brasileiro, provavelmente, em razão das baixas concentrações desse elemento nos solos do Brasil o que impossibilita que os alimentos tenham teores suficientes para atender aos requerimentos humanos, inclusive, a população com poder econômico mais elevado.

Os alimentos constituem a principal via de entrada dos elementos essenciais ao homem e, o conteúdo de nutrientes destes, é um fator importante no seu valor nutricional (Tannenbaum et al., 1993). Portanto, a adição de nutrientes aos alimentos

poderá constituir-se um procedimento recomendável para garantir o suprimento nutricional adequado desses elementos.

2. SUPLEMENTAÇÃO DE ALIMENTOS COM SELÊNIO

Diversos produtos alimentícios suplementados com Se estão disponíveis no mercado de certos países. Formulações infantis enriquecidas com Se são alimentos funcionais ou alimentos produzidos para propósitos fisiológicos especiais (Reilly, 1998). Embora a forma química do Se nos alimentos seja o determinante primário da sua absorção e subsequente utilização pelo organismo humano (Levander, 1983), vários fatores da dieta afetam a biodisponibilidade do Se ingerido (Coombs, 1988). Dentre as substâncias que aumentam a disponibilidade desse elemento, estão: metionina/proteína, vitamina E, concentrações elevadas de vitamina A, antioxidantes, substâncias inibidoras incluindo metais pesados e dieta rica em enxofre (Fairweather-Tait, 1997).

O enriquecimento de alimentos com Se pode reduzir a incidência de má formação fetal e de doenças crônico-degenerativas, próprias da idade adulta, e proporcionar maior resistência às infecções em indivíduos de todas as idades (Ferreira, 1999). A modificação do conteúdo de Se dos alimentos também pode ser uma estratégia efetiva para reduzir o risco de câncer em humanos (Spolar et al., 1999).

2.1. Enriquecimento de cogumelos com selênio

Nos últimos anos, a produção e o consumo de cogumelos vêm aumentando e ganhando destaque, em razão do reconhecimento das suas características nutricionais e sensoriais e por apresentarem propriedades benéficas à saúde (Diez e Alvarez, 2001). A possibilidade da reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais é outro fator determinante no aumento do interesse no cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais.

A composição do substrato utilizado no cultivo dos fungos produtores de cogumelos é fator importante na absorção de alguns nutrientes pelo fungo, mas

existem diferenças individuais na absorção desses elementos (Michelot et al., 1998). O substrato usado para o cultivo de cogumelos, bem como seu estágio de desenvolvimento e as condições pré e pós-colheita podem influenciar a composição química e conseqüentemente, o valor nutricional dos cogumelos cultivados nesse substrato (Bano e Rajarathnam, 1988; Bento, 2001). O acúmulo de um elemento, essencial ou não, pelo fungo é atualmente uma questão relevante nos aspectos relacionados à poluição ambiental, toxicologia de alimentos e, principalmente, do ponto de vista nutricional (Kalac et al., 1996). Alguns estudos demonstraram que os fungos são capazes de acumular P, K, Ca e metais pesados como cádmio (Cd), chumbo (Cu) e mercúrio (Hg) presentes no substrato (Kalac et al., 1991). As análises da composição química de cogumelos mostram grande variação de todos os constituintes que pode ser causada por diferenças na espécie, substrato de cultivo e estágio de desenvolvimento (Miles e Chang, 1997). Chang e Miles (1989), comentaram que os cogumelos são fontes de minerais, pois estes são absorvidos pelo micélio em crescimento e translocados para os corpos de frutificação.

Organismos como os fungos reduzem o Se biologicamente disponível a formas insolúveis elementares ou produzem formas orgânicas voláteis de Se os quais são perdidos na atmosfera (Girling, 1984). Os cogumelos têm alta capacidade de acumular Se o que, em parte, depende da espécie (Simonoff e Simonoff, 1991) e portanto, podem servir como uma fonte dietética de Se suprimindo o organismo com esse elemento traço essencial e escasso nas dietas.

Os cogumelos são fonte de Se, mas o conteúdo desse elemento é variável e dependente do substrato usado no crescimento do fungo (Spolar et al., 1999; Kalac e Svoboda, 2000). A análise da distribuição de Se no cogumelo *Agaricus bisporus* mostrou que uma proporção desse elemento está localizada em (i) compostos inorgânicos e orgânicos de baixa massa molecular enquanto pequenas proporções estão localizadas em (ii) lipídeos e lipoproteínas, (iii) ácidos nucleicos e (iv) proteínas, quitinas e polissacarídeos (Piepponen et al., 1990). Segundo Spolar et al. (1999), a ingestão de cogumelos enriquecidos com Se pode suprimir a carcinogênese experimental resultando em efeitos benéficos à saúde. Esses autores observaram que a ingestão de cogumelos enriquecidos com Se altera, de forma benéfica, o processo de formação de câncer. Portanto, o enriquecimento de cogumelos com Se, em concentrações adequadas para que possam ser utilizados como alimentos funcionais

ou nutracêuticos, tem sido uma estratégia adotada (Spolar et al., 1998; Werner e Beelman, 2001, 2002).

Durante o cultivo do fungo produtor de cogumelos, *A. bisporus*, foi observado que compostos voláteis do Se podem ser adsorvidos ou absorvidos pelo corpo de frutificação (van Elteren et al., 1998). Os resultados de enriquecimento de *A. bisporus* com Se, mostraram o potencial destes cogumelos em absorver esse elemento. A adição de Se na forma de selenito de sódio, nas concentrações 0,01g/L, 0,02 g/L e 0,05 g/L na água de irrigação resultou em cogumelos com concentrações de Se que variaram de 3,58 mg/kg a 52,84 mg/kg do peso da matéria seca (Spolar et al., 1998). Esses mesmos autores constataram que, nos cogumelos não enriquecidos com Se, as concentrações de Se variaram de 0,60 mg/kg a 2,46 mg/kg de peso da matéria seca. Werner e Beelman (2001) acrescentaram 3,0 mg/kg de selenito de sódio ao composto para a produção de *A. bisporus* e obtiveram cogumelos com uma concentração, em média, de 12,1 mg de Se por kg da matéria seca. A adição de 30,1 mg/kg; 82,5 mg/kg e 197,1 mg/kg de selenito de sódio ao composto seco resultou em 89,4 mg/kg a 1.304 mg/kg de Se no cogumelo *A. bisporus* (Werner e Beelman, 2002). Quando se adicionou Se ao inóculo de *A. bisporus*, observou-se aumento da concentração deste elemento no cogumelo (Werner e Beelman, 2001) mas, quando o Se foi adicionado ao composto, a concentração desse elemento no cogumelo foi duplicada (Werner e Beelman, 2002). Esses autores sugeriram que o Se contido no inóculo é incorporado em compostos orgânicos durante o crescimento micelial e não se encontra disponível para ser absorvido pelo corpo de frutificação.

O teor de Se em cogumelos *A. bisporus* cultivados em substrato não suplementado com esse elemento, diminuiu significativamente durante todo o ciclo de colheita. O estudo demonstrou que o acúmulo de Se foi diretamente dependente da concentração de selenito de sódio, do estágio do ciclo da colheita e do número de irrigação total com Se (Spolar et al., 1998). Verificou-se ainda, que o Se também foi acumulado durante os subseqüentes fluxos de colheita, quando o selenito de sódio foi adicionado à água de irrigação durante toda a produção dos cogumelos. Além disso, o número de irrigações com selenito de sódio aplicadas durante o cultivo do fungo também afetou o acúmulo de Se nos cogumelos. Esse resultado foi observado após a aplicação de concentrações elevadas de até 197,1 mg/L de selenito de sódio na água de irrigação. Werner e Beelman (2001) confirmaram que as variações no conteúdo de

Se acumulado pelos cogumelos são dependentes da composição do substrato usado no cultivo do fungo, da quantidade desse substrato e das práticas utilizadas para a produção dos cogumelos.

3. COGUMELO SHIITAKE

Atualmente, as quatro espécies de cogumelos comestíveis mais cultivadas no mundo são *A. bisporus* (champignon), *Lentinula edodes* (shiitake), *Volvariella volcacea* e *Pleurotus* sp. (Chang, 1980). Dentre esses, o shiitake é um dos mais explorados por ser usado também como nutracêutico ou alimento funcional, pois pode ser consumido como parte da dieta normal ou pode ser modificado e, ou enriquecido para aumentar os benefícios à saúde. Pode também ser considerado um nutracêutico, ou seja, consumido em forma de cápsulas ou tabletes, com fins terapêuticos e, ainda, ser usado em preparações farmacêuticas, quimicamente definidas e com propriedades específicas (Chang e Buswell, 1996). *L. edodes* pertence ao filo Basidiomycota, ordem Agaricales, classe Hymenomycetes, família Tricholomataceae (Tsuneda, 1994; Alexopoulos et al., 1996, Campbell e Racjan, 1999). Decompositor primário, habita naturalmente a madeira morta de várias espécies de árvores sob diferentes condições climáticas (Przybylowicz e Donoghue, 1990; Ohga, 1992). No ano de 1992, foram produzidas 1.123 toneladas de shiitake e, em 1999, a produção atingiu 3.914 toneladas, aumentando cerca de 3,5 vezes (USDA, 1999). O shiitake é o cogumelo comercial mais consumido no Japão, representando mais de 60 % dos cogumelos comercializados nesse país (Manzi et al., 2001) e é o segundo cogumelo mais consumido no mundo (Chang e Buswell, 1996). No Brasil também se tem evidenciado o aumento do consumo do shiitake, seguindo a tendência mundial de consumo de alimentos saudáveis e de alta qualidade.

O shiitake apresenta propriedades medicinais pela presença de compostos biologicamente ativos, com atividade hipolipidêmica, hipocolesterolemiantes, antitrombótica, antiviral, antibacteriana, anticarcinogênica, imunopotenciadora, hepatoprotetora (Przybylowicz e Donoghue, 1990), antimutagênica (Lima et al., 2001) e antitumoral (Miles e Chang, 1997). A substância hipocolesterolemiantes ativa no shiitake foi isolada e identificada como um derivado da adenosina chamado de

lentinacina ou lentisina conhecido como eritadenina e que atua baixando os níveis de todos os tipos de lipoproteínas, ou seja, as lipoproteínas de alta densidade bem como as de baixa densidade (Breene 1990). O agente ativo antitumor é o polissacarídeo β -1,3 glucano, conhecido como lentinano, que também aumenta a resistência do hospedeiro contra infecções causadas por bactérias, fungos e vírus, incluindo os agentes da AIDS. O mecanismo de ação da atividade antiviral é, em muitos casos, via indução do interferon (Miles e Chang, 1997). Acredita-se que o cogumelo shiitake também tenha sido usado na cura de resfriados comuns por centenas de anos e na prevenção da multiplicação do vírus da poliomielite (Johl et al., 1995).

A composição nutricional do cogumelo shiitake varia de acordo com o substrato onde o fungo é cultivado. Przybylowicz e Donoghue (1990) encontraram no cogumelo shiitake fresco cerca de 85 % a 95 % de água e de 43 % a 78 % da matéria seca do shiitake constituem carboidratos. Seu valor protéico é relativamente alto, representando entre 10 % e 29 % de sua matéria seca, sendo esse valor semelhante, ou até maior, ao encontrado em muitos grãos (Pascholati et al., 1998). De acordo com Chang (1980) e Chang e Buswell, (1996) as proteínas do shiitake contêm a maioria dos aminoácidos essenciais em concentrações adequadas para a nutrição humana. Przybylowicz e Donoghue (1990) sugerem que, do total de aminoácidos presentes no cogumelo shiitake, 39 % são representados pelos essenciais e que a metionina é o aminoácido limitante. Longvah e Deosthale (1998) encontraram no cogumelo shiitake, 23 % de proteína de alta digestibilidade, 2 % de lipídios, dos quais, 72 % a 77 % são constituídos de ácidos oléico e linoléico.

O shiitake é rico em vitaminas, como tiamina, riboflavina, niacina, biotina, ácido fólico (Chang e Buswell, 1996) e ergocalciferol (Takamura e Hoshino, 1991). Segundo Parrish (1979), a origem do ergosterol e vitamina D₂ (ergocalciferol) está no reino Fungi. O ergosterol é submetido a fotólise quando exposto a luz ultravioleta, de comprimento de onda de 280 nm a 320 nm, formando uma variedade de produtos, como taquisterol, lumisterol e provitamina D₂ que, após rearranjo térmico espontâneo, forma a vitamina D₂. A vitamina D é um componente essencial ao ser humano que pode ser produzida na pele pela ação da luz do sol ou absorvida da dieta no trato intestinal (Mattila et al., 2002).

Os minerais no cogumelo shiitake constituem uma fração de 2,6 % a 6,5 % (Przybylowicz e Donoghue, 1990). Cálcio (Ca), fósforo (P), ferro (Fe), sódio (Na),

potássio (K) e magnésio (Mg) estão presentes em concentrações significantes neste cogumelo (Kurtzman, 1997; Bento, 2001). O teor de selênio (Se) no shiitake é baixo: 39 µg/kg de cogumelo seco (Mattila et al., 2001). O composto contendo Se encontrado em maior quantidade, no cogumelo shiitake enriquecido com Se, foi selenometionina ligada a proteínas (Ogra et al., 2004). Bento (2001) verificou que a qualidade nutricional do cogumelo shiitake é maior quando o fungo é cultivado em substrato à base de serragem e quando enriquecido com farelo de cereais porque os nutrientes estão disponíveis em maiores quantidades do que em toras de madeira, facilitando a sua absorção. Em razão do alto rendimento e custo, o cultivo desse cogumelo pode ser uma alternativa promissora para os agricultores brasileiros e, a possibilidade de enriquecer nutricionalmente esse cogumelo deve ser considerada.

A produção de shiitake é um exemplo de bioconversão da madeira e de outros materiais ligninocelulósicos, que constituem grande parte da biomassa renovável (Buswell et al., 1995). Esse fungo é um organismo ligninocelulolítico ativo capaz de degradar componentes individuais de ligninocelulose, como lignina, celulose e hemicelulose, secretando uma série de enzimas oxidativas e hidrolíticas incluindo lacase, xilanase, celulase, hemicelulase, manganês peroxidase, fosfatase ácida, dentre outras que contribuem para a degradação e reciclagem (Leatham, 1985; Buswell et al., 1993; Buswell et al., 1995; Lee et al., 1999; Cavallazzi et al., 2004).

4. EFEITO DO SELÊNIO SOBRE FUNGOS FILAMENTOSOS

4.1. Efeito do selênio sobre a atividade enzimática de fungos produtores de cogumelos

A serragem é o ingrediente básico mais popular usado nas formulações sintéticas do substrato para produzir shiitake (Royse, 1997a). Adiciona-se a esta, suplementos à base de cereais, como farelo de trigo, farelo de arroz, milho e centeio, correspondendo entre 20 % e 60 % da massa seca do substrato, os quais podem ser adicionados à mistura e servir como nutrientes para favorecer o crescimento do fungo (Royse, 1997b).

A lignina é um polímero de fenilpropanóide que tem uma estrutura altamente complexa e variável e é conhecida por ter baixa degradabilidade comparada a outros componentes das folhas (Stott et al., 1983). Somente um número restrito de organismos, como Basidiomicetos, é capaz de metabolizar a molécula de lignina intacta (Swift et al., 1979). Em razão da natureza e do tamanho da molécula de lignina, as enzimas responsáveis pela sua hidrólise inicial são extracelulares e não específicas (Kirk e Farrell, 1987). Porém, a degradação da lignina é um processo complexo e as enzimas têm, provavelmente, efeitos sinérgicos entre si (Tuomela et al., 2000).

A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase) é uma enzima extensamente estudada em razão do seu uso potencial em várias áreas tais como têxtil, de papel, indústria de polpa e de alimentos (Thurston, 1994). O autor descreve esta enzima como um tipo de polifenoloxidase contendo cobre (p-difenoloxidase) que oxida polifenóis, fenóis metoxi substituídos, diaminas e uma considerável variedade de outros compostos. Yaropolov et al. (1994) descreveram a lacase como uma glicoproteína da família de oxidases azuis contendo cobre que varia entre 10 % a 45 %, e com o tipo de carboidrato de sua composição, entre espécies e entre isozimas da mesma espécie. De acordo com os autores, essas enzimas têm especificidade pelo substrato, e não atuam sobre o produto reduzido por elas. A afinidade da lacase ao substrato pode ser estendida às subunidades não fenólicas de lignina. Kahraman e Gurdal (2002) afirmaram que muitos fungos produzem altas quantidades de lacase extracelular. Nos estádios iniciais do período de crescimento vegetativo de *L. edodes*, foram constatadas altas taxas de degradação da lignina (Leatham, 1985). Este resultado pode indicar uma atividade significativa da lacase.

A degradação natural completa de materiais de plantas lenhosas é resultante da ação de fungos, dentre os quais basidiomicetos formadores de cogumelos (Kvesitadze et al., 1999). A capacidade de degradação resulta da presença e da atividade de um sistema de enzimas que agem por mecanismos de despolimerização diferenciados e degradam todos biopolímeros de plantas superiores como a celulose, a hemicelulose e a lignina. A ação de enzimas como as celulasas e as xilanasas permite que os fungos usem materiais lenhosos como fonte de carbono e energia. Assim, a colonização eficiente pelo fungo e a utilização de toras de madeira e toras artificiais, à base de serragem de madeira, usualmente usadas como substratos de

crescimento dependem da capacidade do fungo para produzir as enzimas extracelulares requeridas para degradar os componentes principais de ligninocelulose, tais como, celulose, hemicelulose e lignina (Kirk, 1983). Entretanto, na parede celular de plantas lenhosas, estes materiais estão intimamente associados na forma de uma matriz complexa onde a lignina pode atuar como uma barreira para a degradação de polissacarídeos pelo micélio do fungo, restringindo a disponibilidade de nutrientes requerida para o crescimento.

4.2. Efeito do selênio sobre a morfologia dos fungos

Não se têm informações do efeito do Se sobre a morfologia do micélio de *L. edodes* e sobre os eventos de desenvolvimento dos primórdios do corpo de frutificação. Porém, alguns elementos, como metais pesados, podem interferir na morfologia das células de diversos grupos de fungos. Darlington e Rauser (1988) verificaram que, no fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus*, a adição de Cd aumentou a densidade das hifas evidenciada pelo aumento no número de ramificações e uma diminuição da distância entre os pontos das ramificações. Gildon e Tinker (1981) verificaram que o excesso de Cu e Zn interferiu na morfologia do micélio que apresentou comprimento irregular e pouca ramificação.

Lilly et al. (1992) observaram que uma diminuição na taxa de crescimento do fungo *Schizophyllum commune* causada por metais pesados é freqüentemente acompanhada por mudanças morfológicas do micélio. Nesse estudo, constatou-se que o crescimento desse fungo em meio sólido contendo Cd, levou a um aumento na formação da hifa aérea e a mudanças morfológicas durante o crescimento da hifa e a extensão dessas mudanças reflete o aumento na concentração do metal. O cultivo de *Daedalea quercina* em meio líquido com Cd resultou em encurtamento da hifa e aparência irregular na superfície da mesma (Gabriel et al., 1996). Os mecanismos relacionados à ramificação das hifas não são conhecidos (Müller et al., 2000). No entanto, de acordo com os autores, o diâmetro da hifa, a freqüência e o padrão de ramificação são influenciados pela taxa específica de crescimento. Estas mudanças indicam que a morfologia do fungo é cuidadosamente ajustada em resposta às condições de crescimento (Dynesen e Nielsen, 2003).

Culturas fúngicas cultivadas na presença de metais pesados podem também mudar sua coloração. O fungo *Stereum hirsutum* produziu um pigmento amarelo-laranja, extracelularmente e no micélio, quando cultivado na presença de 0,25 mol L⁻¹ ou mais de Cd (Baldrian et al., 1996).

O núcleo, como outras organelas nas células, é dinâmico e pode se mover no citoplasma (Morris, 2003). O autor afirma que em muitas células, movimentos nucleares estão relacionados com mitose ou meiose; em outras, estão relacionados com divisões nucleares e, em outras ainda, eles estão relacionados com distribuição do mesmo pelo citoplasma. Ainda de acordo com o autor, a movimentação dos núcleos pode ser afetada por diversos fatores, como presença de alguns elementos minerais no meio de crescimento.

Investigar o crescimento micelial e atividades metabólicas do fungo *L. edodes* na presença de Se, é de fundamental importância, pois disponibiliza informações para otimizar técnicas de cultivo, tornando o sistema mais confiável e eficiente. Os dados obtidos podem ser úteis no desenvolvimento de processos para o enriquecimento de cogumelos shiitake com Se, buscando suprir uma proporção significativa da ingestão dietética recomendada desse elemento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 1996, 869p.
- ALTUNDAG, K.; SILAY, Y.S.; ALTUNDAG, O. YIGITBASI, O.G.; GUNDESLIOGLU, O.; GUNDUZ, M. Selenium supplementation may increase the efficacy of cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. **Med. Hypoth.**, v. 64, n. 6, p. 1162-1165, 2005.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J.; NERUD, F. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiol.**, v. 41, p. 363-367, 1996.
- BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. **CRC Critical Rev. Food Sci. Nutrit.**, v. 27, p. 87-158, 1988.
- BENTO, K.B.P. **Atividade antimicrobiana e composição mineral do cogumelo shiitake produzido em diferentes substratos**. 2001. 37f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 105/1999. **Diário Oficial**, Brasília, 20 de maio de 1999, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 1998.
- BRÄTER, P.; NEGRETTI, V.E.; RÖSICK, V.; JAFFÉ, W.G.; HERNÁN MENDEZ, C.; GUILHERMO TOVAR, E. Effects of Selenium intake in man at high dietary levels of seleniferous areas of Venezuela. **Trace Elem. Anal. Chem. Med. Biol.** v. 3, p. 29-46, 1984.

- BRENE, W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **J. Food Prot.**, p. 853-883, 1990.
- BURK, R.F.; HILL, K.E. Regulation of selenoproteins. **Annu. Rev. Nutr.** v. 13, p. 65-81, 1993.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*, **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 128, p. 81-88, 1995.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. Fungal and substrate associated factors affecting the ability of individual mushroom species to utilize different lignocellulosic growth substrates. In: CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A.; CHIU, W.P. (Eds) **Mushroom Biology Mushroom Products**. Hong Kong: Chinese University Press, 1993. p. 141-150.
- CAMPBELL, A.C.; RACJAM, M. The commercial exploration of the white rot fungus *Lentinula edodes* (Shiitake). **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 43, p. 101-107, 1999.
- CAVALLAZZI, J.R.P.; BRITO, M.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; VILLAS-BÔAS, S.G.; KASUYA, M.C.M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium. **Food Agric. Environ.**, v. 2, n. 1, p. 291-297, 2004.
- CHANG, S.T. Mushrooms as human food. **Bioscience**, v. 30, n. 6, p. 399-401, 1980.
- CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A. Mushroom Nutraceuticals. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, n. 5, p. 473-476, 1996.
- CHANG, S. T.; MILES, P.G. **Edible Mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 345p.

- COOMBS, G.F. Selenium in foods. In: CHICHESTER, C.O., SCHWEIGER, B.S. (Eds). **Advances in Food Research** v. 32. Academic Press: san Diego, 1988. p. 85-113.
- CZAJKA-NARINS, D.M. Minerais. In: MAHAN, K.L.; ARLIN, M.T. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: Roca, 1995. p. 113-146.
- DANIELS, L.A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 54, p. 186-199, 1996.
- DARLINGTON, A.B.; RAUSER, W.E. Cadmium alters the growth of the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: a new growth model accounts for changes in branching. **Can. J. Bot.**, v. 66 p. 225-229, 1988.
- DIEZ, V.A.; ALVAREZ, A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. **Food Chem.**, v. 75, p. 417-422, 2001.
- DYNESEN, J.; NIELSEN, J. Branching is coordinated with mitosis in growing hyphae of *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 40 p. 15-24, 2003.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of selenium, **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 51 n. 1 p. 520-523, 1997.
- FERREIRA, K.S. **Quantificação e Avaliação dos Teores de Minerais em Alimentos e em Dietas Utilizados no Brasil**. 1999. 136f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- FERREIRA, K.S. **A desnutrição mineral na dieta básica brasileira**. 1995. 185f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

- FINLEY, J.W. Does selenium accumulation in meat confer a health benefit to the consumer? **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.**, 1999.
- GABRIEL, J.; KOFRONOVA, O.; RYCHLOVSKY, P.; KRENZELOK, M. Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycete *Daedalea quercina*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 383-390, 1996.
- GASO, M.I.; SEGOVIA, N.; MORTON, O.; SERVANTES, M.L.; GODINEZ, L.; PEÑA, P.; ACOSTA, E. Cs and relationships with major and trace elements in edible mushrooms from Mexico. **Sci. Total Environ.**, v. 262, p. 73-89, 2000.
- GEERING, H.R.; CARY, E.E.; JONES, L.H.P.; ALLAWAY, W.H. Solubility and redox criteria for the possible forms of selenium in soils. **Soil Sci. Soc. Am.**, v. 32 p. 35-47, 1988.
- GILDON, A.; TINKER, P.B. A heavy metal-tolerant strain of a mycorrhizal fungus. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 77, p. 648-649, 1981.
- GIRLING, C.A. Selenium in agriculture and the environment. **Agri. Ecosyst. Environ.**, v. 11, p. 37-65, 1984.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC. National Academy Press. 2000a. 509p.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, DC. National Academy Press. 2000b. 773p.
- JOHL, P.P.; SODHI, H.S.; DHANDA, S.; KAPOOR, S. Mushrooms as medicine – a review. **J. Plant Sci. Res.**, v. 73, p. 11-12, 1995.

- KAHRAMAN, S.S; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on lacase production by white rot fungi. **Bioresour Technol.**, v. 82 p. 215-217, 2002.
- KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. **Food Chem.**, v. 69, n. 3, p. 273-281, 2000.
- KALAC, P.; NIZNASKA, M.; BEVILAQUA, D.; STASKOVA, I. Concentrations of mercury, cooper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushroom in the vicinity of a mercury smelter and a cooper smelter. **Sci. Total Environ.**, v. 201, p. 311-316, 1996.
- KALAC P.; BURDA J.; STASKOVA I. Concentrations of lead, cadmium, mercury and copper in mushrooms in the vicinity of lead smelter. **Sci. Tot. Envir.**, v. 105, p. 109-119, 1991.
- KIRK, T. K. Degradation and conversion of ligninocelluloses. In: Smith, J.E.; Kristiansen, D.R. (Eds), **The filamentous fungi**, v. 4, Fungal Technology. Edward Arnold, London, 1983. p. 266-295.
- KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 41, p. 465-505, 1987.
- KURTZMAN, R.H.J. Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. **MycoSci.**, v. 38, n. 2, p. 247-253, 1997.
- KVESITADZE, E.; ADEISHVILI, E.; GOMARTELI, M.; KVACHADZE, L.; KVESITADZE, G. Cellulase end xylanase activity of fungi in a collection isolated from the southern Caucasus. **Int. Biodeter. Biodeg.**, v. 43, p. 189-196, 1999.

- LEATHAM, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p. 859-867, 1985.
- LEE, I.Y.; JUNG, K.H.; LEE, C.; PARK, Y. H. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 965-968, 1999.
- LEVANDER, O. Considerations in the design of selenium bioavailability studies. **Fed. Proc.**, v. 42, p. 1721-1725, 1983.
- LILLY, W.W.; WALWEBER, G.J.; LUKEFAHR, T.A. Cadmium absorption and its effects on growth and micelial morphology of the basidiomycete fungus, *Schizophyllum commune*. **Microbiol.**, v. 72, p. 227-237, 1992.
- LIMA, P.L.A.; DELMANTO, R.D.; SUGUI, M.M.; EIRA, A.F.; SALVADORI, G.S.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. *Lentinula edodes* (Berk) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*. **Mutat. Res.**, v. 496, n. 1-2, p. 23-32, 2001.
- LONGVAH, T.; DEOSTHALE Y.G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. **Food Chem.**, v. 63, n. 3, p. 331-334, 1998.
- MAHAN, K.L.; ESCOTT-STUMP, S. (Org.). **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002.
- MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chem.**, v. 73, p. 321-325, 2001.
- MARTIN, L.C.T. **Nutrição mineral de bovinos de corte**. São Paulo, Nobel, 1993. 173p.

- MATTILA, P.; SALO-VÄÄNÄNEN, P.; KÖNKÖ, K.; ARO, H.; JALAVA, T. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6419-6422, 2002.
- MATTILA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J.M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.
- MICHELOT, D.; SIOBUD, E.; DORE, J.C.; VIEL, C.; POIRIER, F. Update of metal content profiles in mushrooms—toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation. **Toxicon.**, v. 36, p. 1997-2012, 1998.
- MILES, P.; CHANG, S.T. **Mushrooms biology: Concise basics and current developments**. Singapore: World Scientific, 1997. 194p.
- MIN, Z.; CHUNLI, L.; PING, C. Research note Effects of processing conditions of the green-leafy vegetable juice enriched with selenium on its quality stability. **J. Food Eng.**, v. 62, p. 393-398, 2004.
- MIYAZAKI, K.; WATANABE, C.; MORI, K.; YOSHIDA, K.; OHTSUKA, R. The effects of gestational arsenic exposure and dietary selenium deficiency on selenium and selenoenzymes in maternal and fetal tissues in mice, **Toxicol.**, v. 208, p. 357-365, 2005.
- MORRIS, N. R. Nuclear positioning: the means is at the end. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 54-59, 2003.
- MÜLLER, C.; SPOHR, A.B.; NIELSEN, J. Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 67, n. 4, p. 390-397, 2000.

NEUMANN, C.; HARRIS, D.M.; ROGERS L.M. Contribution of animal source foods in improving diet quality and function in children in the developing world. **Nutr. Res.**, v. 22, p. 193-220, 2002.

NEWLY Recognized signs of selenium deficiency in humans. **Nutr. Rev.**, v. 47, n. 4, p. 117-119, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Recommended dietary allowances (RDA)**. 10.ed. National Academy Press, Washington, D.C., 1989. 283p.

OGRA, Y.; ISHIWATA, K.; ENCINAR, J.R.; LOBIŃSKI, R.; SUZUKI, K.T. Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 379, n. 5-6, p. 861-866, 2004.

OHGA, S. Adaptability of *Lentinus edodes* strains to a sawdust-based cultivating procedure. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 38, p. 301-309, 1992.

PAGMANTIDIS V.; BERMANO, G.; VILLETTE, S.; BROOM, I.; ARTHUR, J.; HESKETH, J. Effects of Se-depletion on glutathione peroxidase and selenoprotein W gene expression in the colon. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 3, p. 792-796, 2005.

PARRISH, D.B. Determination of vitamin D in foods: a review. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 12, n. 1, p. 29-57, 1979.

PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; PICCININ, E. **Cogumelos: cultivo e comercialização (shiitake e cogumelo do sol)**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998, 85p. (coleção agroindústria, v.17).

PIEPPONEN, S.; PELLINEN, M.J.; HATTULA, T. The selenium of mushrooms In: BRATLER, P.; SCHRAMEL, P. **Trace elements**. Analyt. Chem. Med. Biol., vol. 3 Editors: Publisher: Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany, 1990.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. **Shiitake grower's handbook – the art and science of mushroom cultivation**. New York: Kendall/Hunt Publishing Company, 1990, 217p.

REILLY, C. Selenium: A new entrant into the functional food arena (review). **Trends Food Sci. Technol.**, v. 9, p. 114-118, 1998.

ROBINSON, M.F. Selenium in human nutrition in New Zealand. **Nutr. Rev.**, v. 47, p. 99-106, 1989.

ROBINSON, M.F.; THOMSON, C.D. The role of selenium in the diet. **Nut. Abst. Rev.**, v. 53, p. 3-26, 1983.

ROYSE, D. J. **Cultivation of shiitake on synthetic and natural logs**. College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension, The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA, 1997a. 12p.

ROYSE, D. J. Specialty mushrooms and their cultivation. **Hortic. Rev.**, v. 19, p. 59-97, 1997b.

SIEJA, K; TALERCZYK, M. Re: Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy. **Gynecol. Oncol.**, v. 96, p. 559-561, 2005.

SIEJA, K; TALERCZYK, M. Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy. **Gynecol. Oncol.**, v. 96, p. 559-561 2004.

SIMONOFF, M.; SIMONOFF, G. **Le Sélénium et la Vie**, Masson: Paris, 1991.

- SPOLAR, M.R.; SCHAFFER, E.M.; BEELMAN, R.B.; MILNER, J.A. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz(a)anthracene bioactivation in mammary tissue. **Canc. Lett.**, v. 138, p. 145-150, 1999.
- SPOLAR, M.R.; BEELMAN, R.B.; ROYSE, D.J.; SIMONS, S. Selenium enrichment of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Mush. News**, v. 46, n. 10, 1998.
- STOTT, D.E.; KASSIN, G.; JARREL, W.M.; MARTIN, J.P.; HAIDER, K. Stabilization and incorporation into biomass of specific plant carbons during biodegradation in soil. **Plant Soil.**, v. 70, p. 15-26, 1983.
- SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**: studies in ecology. Oxford: Blackwell, 1979. 372 p.
- TAKAMURA, K.; HOSHINO, H. Determination of vitamin D2 in shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatog.**, v. 545, p. 201-204, 1991.
- TANNENBAUM, S.R.; YOUNG, V.R.; ARCHER, M.C. Vitaminas y minerales. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza, Acribia, 1993. p.537-613.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.**, v. 140, p. 19-26, 1994.
- TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicol. Lett.**, v. 137, p. 103-110, 2003.
- TOLONEN, M. **Vitamins and minerals in health and nutrition**. London, Ellis Horwood, 1990. 231p.

- TSUNEDA, A. Shiitake and other edible mushrooms cultivated in Japan: production, biology, and breeding. In: Charalambous, G. **Spices, herbs and edible fungi**. 1994, p. 685-727.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Biores. Technol.**, v. 72, p. 169-183, 2000.
- TURNER, R.J.; FINCH, J.M. Selenium and the immune response. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 50 p. 275-285, 1991.
- UNITED STATES DEPARTMENT of AGRICULTURE (USDA). **Mushrooms. National Agricultural Statistic Service**, Agricultural Statistic Board, Washington, DC, 1999.
- van ELTEREN, J.T.; WORONIECKA, U.D.; KROON, K.J. Accumulation and distribution of selenium and cesium in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* a radiotracer-aided study. **Chemosp.**, v. 36, n. 8, p. 1787-1798, 1998.
- VIÑAS, P.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; MERINO-MEROÑO, B.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of selenium species in infant formulas and dietetic supplements using liquid chromatography–hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Anal. Chim. Act.**, 2005. (no prelo)
- WERNER, A.R., BEELMAN, R.B. Growing high-selenium edible and medicinal button mushrooms (*Agaricus bisporus* (J. Lge) imbach) as ingredients for functional foods or dietary supplements. **Int. J. Med. Mush.**, v. 4, p. 167-171, 2002.
- WERNER, A.R., BEELMAN, R.B. Growing selenium-rich mushrooms by adding controlled amounts of selenium to the compost at spawning. **Mush. News**, v. 49, n. 12, p. 4-11, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Selenium, Environmental Health Criteria 58: A Report of the International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva. 1987.

YANG, G.; WANG, S.; ZHOU, R.; SUN, S. Endemic selenium intoxication of humans in China. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 37, p. 872-881, 1983.

YAROPOLOV, A.I.; SKOROBOGAT'KO, O.V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYEV, S.D. Laccase: properties, catalytic mechanism, applicability. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 49, p. 257-275, 1994.

CAPÍTULO 1

CRESCIMENTO E MORFOLOGIA MICELIAL DE *Lentinula edodes* CULTIVADO EM SUBSTRATOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SELENITO DE SÓDIO

1. INTRODUÇÃO

Íons metálicos são de fundamental importância para microrganismos filamentosos, como oomicetos e fungos, com funções no metabolismo e crescimento (Lundy et al., 2001). Certos metais como potássio (K), sódio (Na), manganês (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), e cobre (Cu) são considerados essenciais pois são necessários para funções metabólicas. Outros elementos, como por exemplo o selênio (Se), são também essenciais para humanos, animais e muitas espécies de microrganismos (Tan et al., 2002).

Os fungos filamentosos são morfologicamente complexos, exibindo diferentes formas estruturais ao longo do seu ciclo de vida, o que é determinado também por diversos fatores. Os fatores que afetam a morfologia e a coloração das estruturas fúngicas incluem a natureza do inóculo, as características químicas e físicas do meio, tais como a temperatura, o pH, as forças mecânicas, o oxigênio e o gás carbônico dissolvido, entre outros (Kossen, 2000; Papagianni, 2004). No ambiente natural, as limitações para o crescimento do fungo são principalmente impostas pelas condições nutricionais (Ramsay et al., 1999; Gadd, 2001).

A colônia do fungo é formada pela ramificação das hifas. Em geral, a taxa de crescimento da colônia não é constante, diminuindo ao longo do crescimento do fungo em razão da exaustão de nutrientes e aglomeração das hifas (Boddy, 1993). Quando o fungo cresce em meio de cultura, a taxa de crescimento é muito dependente da quantidade de nutrientes. Em meio com teor de nutrientes elevado, a produção de hifas e a taxa de crescimento do fungo são maiores e o micélio formado é mais denso, enquanto que, em meio com poucos nutrientes, as colônias desenvolvem-se cobrindo quase toda a superfície do meio com hifas mais distantes e menos densas (Matsuura, 2002). Metais essenciais, como o Cu e o Zn e metais não

essenciais como o Cd, podem exercer toxicidade e serem acumulados pelo fungo quando presentes em concentrações elevadas e sob formas disponíveis (Stijve e Besson, 1976; Gadd, 1992; Gadd, 1993), afetando também o crescimento micelial.

Como o núcleo é uma organela dinâmica que pode se mover no citoplasma e os movimentos nucleares estão relacionados com mitose ou meiose, com divisões nucleares ou com distribuição do núcleo pelo citoplasma, a movimentação dos núcleos pode ser afetada por diversos fatores como a presença de alguns elementos minerais no meio de crescimento (Morris, 2003), sendo portanto, uma variável que se deve avaliar para verificar o efeito de determinados nutrientes no crescimento de fungos. Considerando o efeito do ambiente na morfologia da hifa e da colônia de fungos, este trabalho teve como objetivo, observar o efeito do selênio no crescimento micelial e na morfologia do micélio de isolados de *L. edodes* cultivados em substratos acrescidos de diferentes concentrações de selenito de sódio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa – UFV, em Viçosa – Minas Gerais.

2.1. Crescimento de *L. edodes* em meios de cultura com diferentes concentrações de selênio

Doze isolados de *L. edodes* (Berk.) Pegler pertencentes à coleção do Departamento de Microbiologia da UFV foram utilizados para a avaliação do crescimento em meio semi-sintético e em substrato ligninocelulósico contendo diferentes concentrações de selenito de sódio. Os isolados utilizados foram UFV11, UFV16, UFV53, UFV62, UFV63, UFV73, UFV74, UFV75, UFV78, UFV80, UFV81 e UFV82.

Para reativação das culturas, transferiu-se um disco de ágar batata dextrose (BDA, Merck®) de 8 mm de diâmetro, contendo micélio das bordas das colônias das culturas estoques, para o centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL de BDA. As placas foram incubadas por 15 dias a 25 °C.

Substrato ligninocelulósico à base de serragem de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) foi preparado com 78 % de serragem, 20 % de farelo de arroz, 0,4 % de CaCO₃ e 1,6 % de CaSO₄ de acordo com Bento (2001) e umidificado com água de torneira. O substrato foi autoclavado a 120 °C por 60 minutos e, após resfriamento, adicionou-se selenito de sódio (Na₂SeO₃) nas concentrações de 0,32; 0,64; 0,96 ou 1,28 mmol L⁻¹. O tratamento controle consistiu dos mesmos meios de cultura sem a adição de Se.

Os isolados cultivados em BDA foram transferidos com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro contendo micélio das bordas das colônias para o centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL de BDA (Merck®) ou 20 g de substrato ligninocelulósico suplementados com selenito de sódio. As placas foram incubadas a 25 °C por 12 dias em estufas tipo BOD. A cada três dias mediu-se, com régua, o diâmetro da colônia, em milímetros, em duas posições representativas da margem da área colonizada. Esses dados foram utilizados para a elaboração das

curvas de crescimento. Calculou-se a taxa específica de crescimento pela inclinação da curva de crescimento obtida.

Ao final do período de incubação, determinou-se a massa micelial seca dos isolados cultivados em BDA. Para essa avaliação, todo o conteúdo da placa foi colocado em béquer contendo cerca de 300 mL de água destilada, e levado ao forno microondas até a dissolução completa do ágar. Utilizando-se peneira com malha correspondente a 400 mesh, o material foi separado e levado à estufa a 105 °C com circulação forçada de ar, por 48 horas. Este ensaio foi realizado em triplicata.

2.2. Morfologia micelial

Para a avaliação da morfologia micelial na presença de selênio, três isolados de *L. edodes* foram selecionados, levando em consideração, o crescimento micelial, em diâmetro e em biomassa seca, comparando-se o crescimento na maior concentração de selenito de sódio e no controle. Esses isolados foram cultivados pela técnica de microcultivo sobre lâminas de microscopia contendo 100 µL de meio BDA acrescido de selenito de sódio (Na_2SeO_3) nas concentrações 0,32; 0,64; 0,96 ou 1,28 mmol L⁻¹ e o controle, em BDA sem Se. As lâminas foram mantidas dentro de placas de Petri contendo papel de filtro umedecido em água destilada esterilizada e incubadas em estufa tipo BOD a 25 °C. Após seis dias foram medidos os diâmetros das hifas e as distâncias entre os septos em várias áreas de cada lâmina, fazendo-se seis medidas em cada lâmina, em microscópio de luz PGH Rundfunk-Fernsehen IP20 com micrômetro acoplado a ocular. A medida dos diâmetros das hifas e das distâncias entre os septos foi realizada em triplicata.

Para avaliação da distância entre os núcleos, o micélio cultivado sobre a lâmina foi corado com 10 µL do corante SYBR[®] Green I diluído 1.000 vezes em 10 mol L⁻¹ de KH_2PO_4 contendo 18 % de glicerol de acordo com Meinhardt et al. (2001). Após cinco minutos de contato com a solução, o micélio foi observado sob microscópio Nikon E600 com um sistema Y-FL epi-fluorescente acoplado. O micélio corado foi fotografado onde se puderam observar os núcleos. Em cada lâmina, foram medidas dez distâncias entre os núcleos, próximos entre si, na mesma hifa, com lâmina micrométrica. Esta medida foi realizada em triplicata.

2.3. Análise estatística

Adotou-se o delineamento em fatorial com doze isolados (UFV11, UFV16, UFV53, UFV62, UFV63, UFV73, UFV74, UFV75, UFV78, UFV80, UFV81 e UFV82), 5 níveis de concentração de Se com três repetições para a taxa específica de crescimento e massa seca e com quatro níveis de tempo para as curvas de crescimento em BDA e substrato ligninocelulósico. Os dados obtidos para a elaboração das curvas de crescimento, foram transformados em logaritmo neperiano (Ln) para ajuste dos dados à curva. Para as análises de variância e de regressão utilizou-se o programa estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento de *L. edodes* em meios de cultura com diferentes concentrações de selênio

Todos os isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA e em substrato ligninocelulósico, suplementados com Se, apresentaram crescimento que foi observado pelo aumento no diâmetro da colônia ao longo do tempo (Figuras 1 e 2). O padrão de crescimento micelial observado foi semelhante durante a colonização dos substratos enriquecidos com Se, constatando-se uma redução do crescimento à medida que se aumentou a dose de Se (Figuras 1 e 2). No tratamento controle, apenas os isolados UFV53, UFV73, UFV81 colonizaram completamente os substratos no período avaliado de 12 dias. Os demais isolados colonizaram quase toda a placa, apresentando uma diminuição na colonização com o aumento da dose de selenito de sódio adicionada ao substrato (Figura 2).

Os isolados UFV11 e UFV74 apresentaram maior tolerância ao Se, quando se comparou o diâmetro da colônia em meio BDA com 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio com o tratamento controle (Figura 1). Essa redução no diâmetro da colônia foi menor do que 6 % no último tempo avaliado, enquanto que os isolados mais sensíveis foram UFV62, UFV78 e UFV82 que apresentaram diâmetro da colônia 53 %, 59 % e 52 % menor do que o controle, respectivamente. Nos demais isolados, a redução dessa taxa variou de 30 % a 43 %.

A diminuição no tamanho da colônia e no padrão de ramificação em presença de micronutrientes também foi observada por Gadd et al. (2001) em *Trichoderma viride* e *Rhizopus arrhizus*. Esses autores constataram que o estresse do fungo em razão da toxicidade desses metais depende da disponibilidade de nutrientes e do meio de crescimento, pois, em ambientes com baixos teores de nutrientes, ocorre limitação na expressão dos mecanismos de tolerância à toxicidade. Considerando que as condições nutricionais e ambientais, nesse estudo, foram as mesmas, então, as características genéticas de cada isolado influenciaram o crescimento fúngico, mostrando que apesar de pertencerem à mesma espécie, os isolados apresentam algumas características distintas.

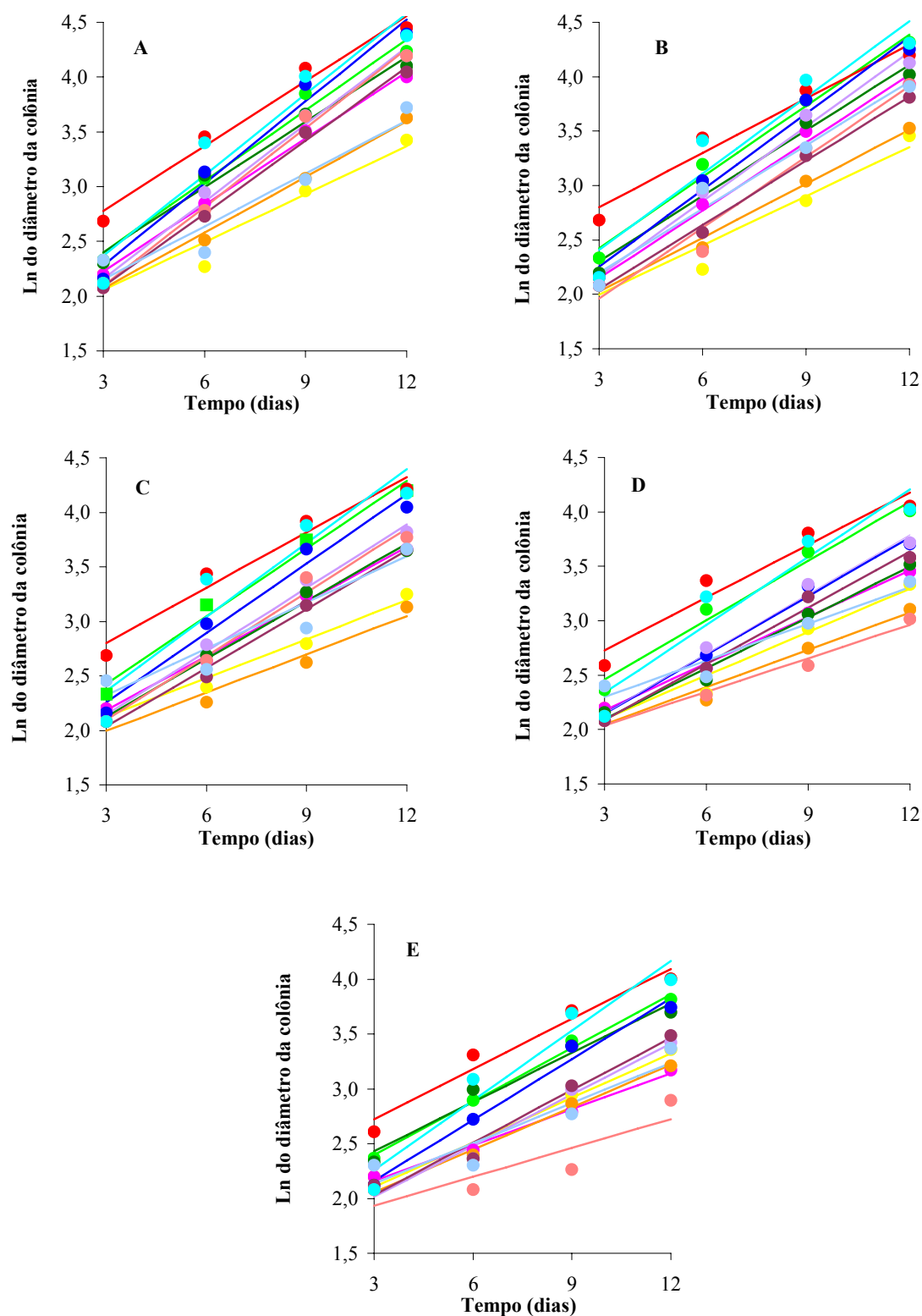


Figura 1 – Curvas de crescimento de 12 isolados do fungo *L. edodes* ● UFV11 ● UFV16 ● UFV53 ● UFV62 ● UFV63 ● UFV73 ● UFV74 ● UFV75 ● UFV78 ● UFV80 ● UFV81 ● UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em BDA acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio, A= 0,32 mmol L⁻¹; B= 0,64 mmol L⁻¹; C= 0,96 mmol L⁻¹; D= 1,28 mmol L⁻¹ e E= controle sem selênio

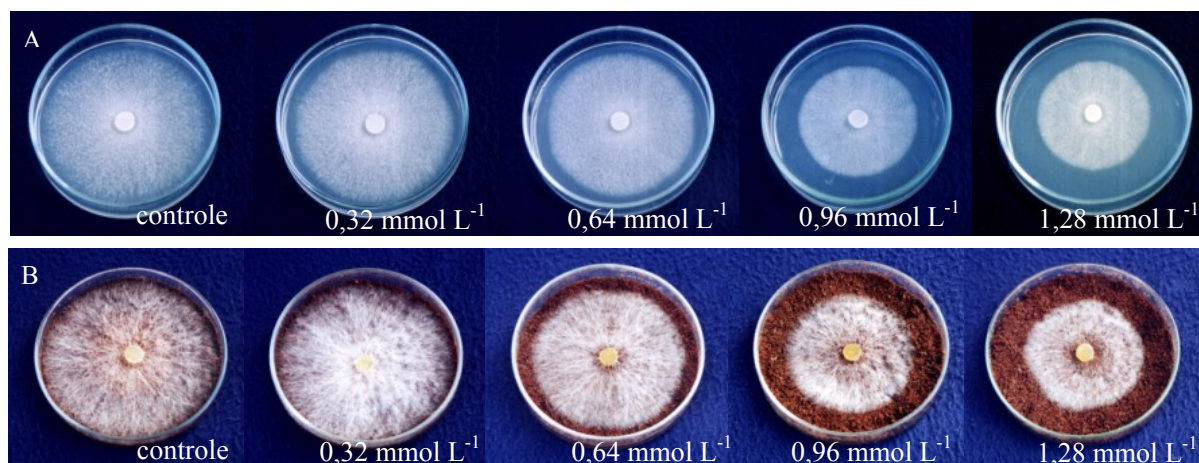


Figura 2 – Aspecto das colônias do isolado UFV53 cultivado, a 25 °C por 12 dias, em BDA (A) ou em substrato ligninocelulósico (B) com concentrações crescentes de selenito de sódio

O diâmetro das colônias dos isolados avaliados em meios livres de Se (controle) e naqueles adicionado de baixa concentração de selenito de sódio (0,32 mmol L⁻¹) aumentou mais rápido, em relação àqueles cultivados em meios suplementados com concentrações maiores de Se, e o micélio tomou toda ou quase toda a superfície do meio no décimo segundo dia de incubação (Figura 2). No entanto, houve uma tendência gradual de declínio da taxa de crescimento das colônias, conforme se aumentou a dose de selenito de sódio no meio, mostrando que doses elevadas de Se afetam negativamente o crescimento micelial desse fungo (Figura 2) e pode ser atribuída à reconhecida toxicidade do Se em doses elevadas (Bennett, 2001; Viñas, et al., 2005). O efeito de toxicidade de outros elementos como o cobalto (Co) e o magnésio (Mg) sob a célula fúngica de *Psathyrella atroumbonata* foi verificado por Jonathan e Fasidi (2001).

A composição do meio de cultura também afetou o crescimento micelial. Quando cultivados em substrato ligninocelulósico, os isolados UFV53, UFV63 e UFV81 foram os que apresentaram maior tolerância ao Se com redução no diâmetro das colônias inferior a 30 % quando se comparou a concentração 1,28 mmol L⁻¹ em relação ao meio sem adição do selenito de sódio (Figura 3). Nesse substrato, o isolado UFV78 foi o mais sensível ao Se e apresentou redução no crescimento maior do que 60 %.

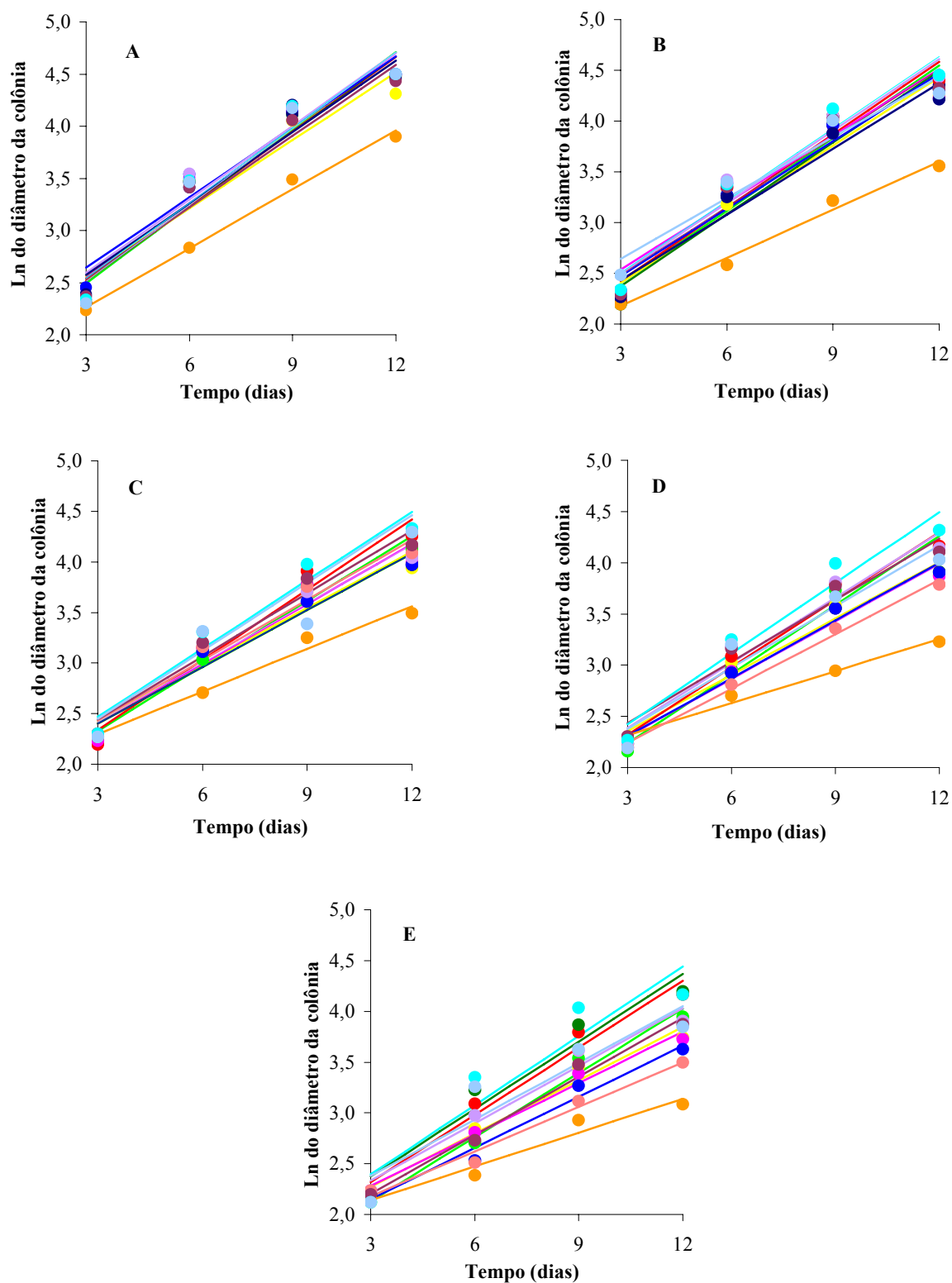


Figura 3 – Curvas de crescimento de 12 isolados do fungo *L. edodes* ● UFV11 ● UFV16 ● UFV53 ● UFV62 ● UFV63 ● UFV73 ● UFV74 ● UFV75 ● UFV78 ● UFV80 ● UFV81 ● UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em substrato ligninocelulósico acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio, A= 0,32 mmol L⁻¹; B= 0,64 mmol L⁻¹; C= 0,96 mmol L⁻¹; D= 1,28 mmol L⁻¹ e E= controle sem selênio

Entretanto, os isolados UFV16 e UFV81 apresentaram redução menor do que 15 % na taxa específica de crescimento ao longo do período de incubação quando se comparou com a maior concentração de selenito de sódio ($1,28 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionada ao BDA em relação ao controle (Figura 4A), demonstrando que esses isolados são menos afetados, nesses substratos, pelos efeitos tóxicos do Se. Por outro lado, nestas mesmas condições, a taxa de crescimento do isolado UFV78 reduziu mais do que 60 %, demonstrando maior sensibilidade à presença desse elemento. Nos demais isolados, a redução na taxa específica de crescimento variou de 22 % a 46 %. A taxa específica de crescimento de todos os isolados avaliados e em ambos os substratos diminuiu à medida que se aumentou a concentração de Se (Figura 4). A taxa de crescimento de *Paxillus involutus* também foi reduzida em 45% quando 1 mmol de Cd/m^3 foi adicionado ao meio de cultura (Darlington e Rauser, 1988). Os metais e seus compostos podem interagir com o fungo de várias maneiras dependendo do metal, da espécie do organismo e das condições ambientais, enquanto que a atividade metabólica do fungo influencia a disponibilidade e a mobilidade do metal (Gadd, 1993; Gadd e Sayer, 2000). Para Valix e Loon (2003), o efeito de metais pesados sobre o crescimento varia com a estirpe do fungo, sendo que o comportamento adaptativo dos fungos a esses metais, refletidos na taxa de crescimento e de morte, pode ser usado para indicar a tolerância ou adaptação do fungo ao aumento da concentração do metal.

A taxa específica de crescimento dos isolados UFV53, UFV63 e UFV81 em substratos ligninocelulósicos reduziu menos do que 8 % ao longo do período de incubação, quando se comparou o resultado obtido na maior concentração de selenito de sódio ($1,28 \text{ mmol L}^{-1}$) (Figura 4B) em relação ao meio controle. Este resultado pode indicar uma maior tolerância desses isolados à presença de doses maiores de Se nesse substrato. Por outro lado, os isolados UFV74 e UFV78 apresentaram redução da taxa específica de crescimento superior a 35 % e portanto, foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do Se. Darlington e Rauser (1988) trabalhando com *P. involutus* cultivado em ágar MMN observaram que existe relação inversa entre a taxa de crescimento (mm/dia) e a concentração de Cd, porém, não foi observada nenhuma relação entre a duração da fase lag e a concentração desse elemento.

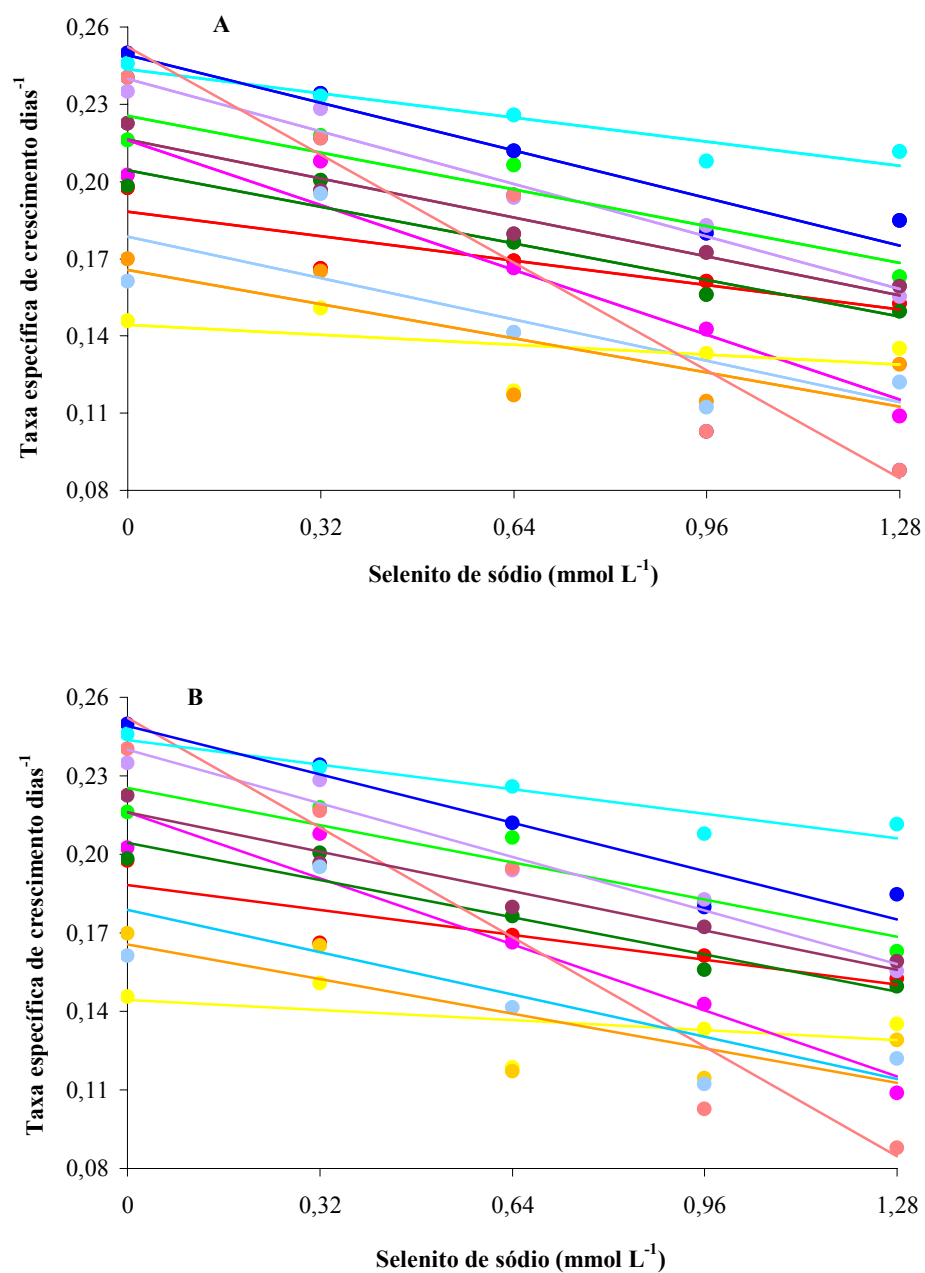


Figura 4 – Taxas específicas de crescimento de 12 isolados do fungo *L. edodes*, UFV11 UFV16 UFV53 UFV62 UFV63 UFV73 UFV74 UFV75 UFV78 UFV80 UFV81 UFV82 cultivados, por 12 dias a 25 °C, em BDA (A) ou substrato ligninocelulósico (B) acrescidos de quatro concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio

A massa seca fúngica da maioria dos isolados cultivados em BDA diminuiu à medida que se aumentou a dose de selenito de sódio (Figura 5). De acordo com Darlington e Rauser (1988), a massa micelial de *P. involutus* foi reduzida quase pela metade na presença de metal, como o Cd, em relação ao meio controle sem Cd.

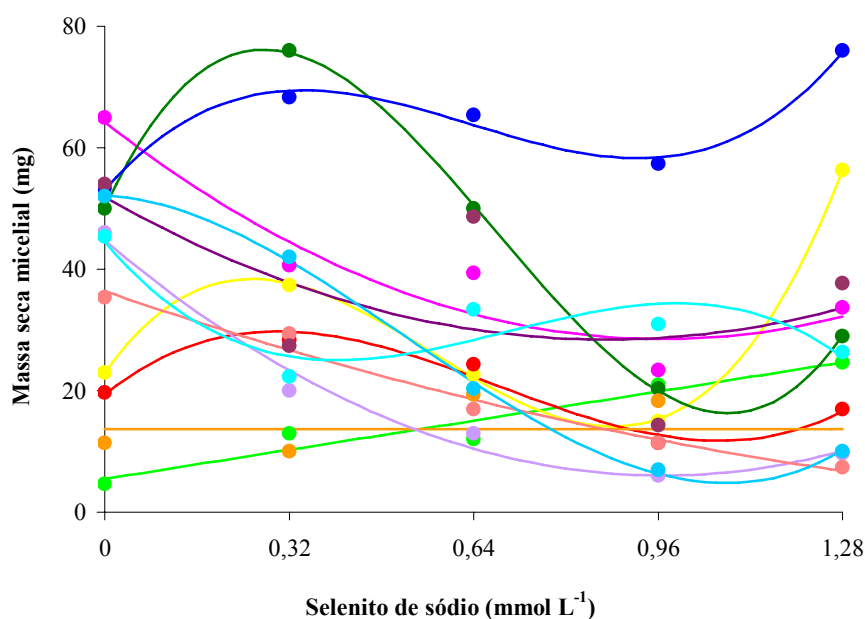


Figura 5 – Massa seca de 12 isolados do fungo *L. edodes* (● UFV11 ● UFV16 ● UFV53 ● UFV62 ● UFV63 ● UFV73 ● UFV74 ● UFV75 ● UFV78 ● UFV80 ● UFV81 ● UFV82) cultivados, por 12 dias a 25 °C, em BDA acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio

A diminuição no diâmetro da colônia à medida que se aumentou a concentração de Se nem sempre significou menor massa micelial ou menor crescimento. Esta afirmação é proveniente da observação dos dados quando se constatou a redução do diâmetro das colônias dos isolados UFV11, UFV16 e UFV73 na presença de 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio, as massas secas obtidas desses isolados foram maiores nessa concentração (Figuras 1 e 5). Este resultado pode ser atribuído ao fato do Se ter promovido um crescimento micelial mais compacto o que não é determinado pela medida do diâmetro da colônia e sim, quando se avalia a massa seca. Os demais isolados mostraram reduções na massa seca à medida que se aumentou a concentração de Se.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gadd et al. (2001) que observaram que o tamanho das colônias de *T. viridae*, em substrato pobre em nutrientes e na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Cd, Cu e Zn reduziu-se a um terço nos tratamentos que foram adicionados esses metais em relação o tratamento controle. No entanto, na presença de metais, as ramificações foram apenas ligeiramente menores, mas orientadas para o interior da colônia. O mesmo aconteceu com a distribuição da biomassa que foi pouco densa e concentrada no interior da colônia. Para os autores, o padrão de distribuição de biomassa observado no *T. viridae* sugere que a presença dos metais altera a alocação de nutrientes dentro do micélio e tem efeito individual e específico sobre o crescimento do fungo. Por sua vez, Chen et al. (2003) observaram uma duplicação da biomassa do fungo *Volvariella volvacea* cultivado na presença de Cu, quando se adicionaram ao meio de crescimento doses elevadas de nitrogênio (N) em relação ao tratamento com baixo teor desse elemento.

Considerando os resultados obtidos, foram selecionados para a continuidade deste trabalho, os isolados UFV11, UFV16 e UFV53 por apresentarem maior tolerância ao Se durante o crescimento nos substratos avaliados (Figuras 1 e 3), pela maior taxa específica de crescimento (Figura 4) e maior produção de massa seca na concentração de $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ Se (Figura 5). Foram consideradas também as informações disponíveis no Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa – UFV, de que o isolado UFV16 apresenta elevada frutificação e, conseqüentemente, alta produção de cogumelos.

Embora tenham apresentado tolerância ao Se nos substratos avaliados, os isolados UFV63 e UFV81 (Figuras 1, 3, 4A e 4B) mostraram redução superior a 40% na massa seca na concentração $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio em relação ao controle (Figura 5). Este resultado justifica a não seleção destes isolados para a continuidade do presente trabalho.

3.2. Morfologia da colônia

A morfologia das colônias dos isolados de *L. edodes* em BDA foi similar, independente da presença de Se. Foram observadas colônias circulares, porém com hifas menos densas à medida que se aumentou a dose de Se (Figura 2). Em substrato ligninocelulósico, dois tipos morfológicos de colônia foram observados. Uma colônia

com aspecto uniforme em todas as concentrações de Se, e outra, exibindo mudanças morfológicas à medida que se aumentou a concentração de Se. O isolado UFV74 apresentou colônia altamente condensada na presença de Se (Figura 6). A composição do meio é um dos fatores que influencia a agregação celular, visto que as colônias mudam de compactas para ramificadas com a diminuição de nutrientes no meio (Papagianni et al., 1999). Segundo Matsuura (2002), quando ocorrem mudanças nas condições ambientais, podem ocorrer mudanças na morfologia da colônia de fungos em razão da aglomeração de células, ou seja, quando ocorre aglomeração da população, a colônia torna-se mais compacta. De acordo com o mesmo autor, a diversidade morfológica depende da estirpe e das condições de cultivo e a taxa de extensão da hifa é enormemente diminuída pelo efeito da aglomeração da hifa. Tal efeito é aparente quando a concentração de nutrientes é alta. As desvantagens do crescimento micelial disperso incluem a redução na eficiência do suprimento de oxigênio bem como um aumento na parede celular (Papagianni, 2004).

O efeito de metais pesados sobre o diâmetro da colônia de fungo também foi observado por Darlington e Rauser (1988) que registraram redução no diâmetro da colônia de *P. involutus* cultivado em ágar Melin-Norkrans modificado (MMN), à medida que se aumentou a concentração de cádmio (Cd).



Figura 6 – Aspecto da colônia do isolado UFV74 de *L. edodes* cultivado, por 12 dias a 25 °C, em substrato ligninocelulósico não adicionado (controle) ou adicionado de 0,32 mmol L⁻¹ de selenito de sódio

3.3. Morfologia micelial

O diâmetro das hifas, distância entre septos e distância entre núcleos (Figura 7) apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre os três isolados (UFV11, UFV16 e UFV53) e entre as concentrações de Se testadas.

A distância entre septos tendeu a diminuir nos tratamentos que receberam $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio em todos os isolados estudados (Figura 8), podendo ser atribuída ao efeito tóxico do Se, em altas doses.

A Figura 7 ilustra a distribuição de núcleos do isolado UFV11 nas quatro concentrações de selenito de sódio e no controle sem Se.

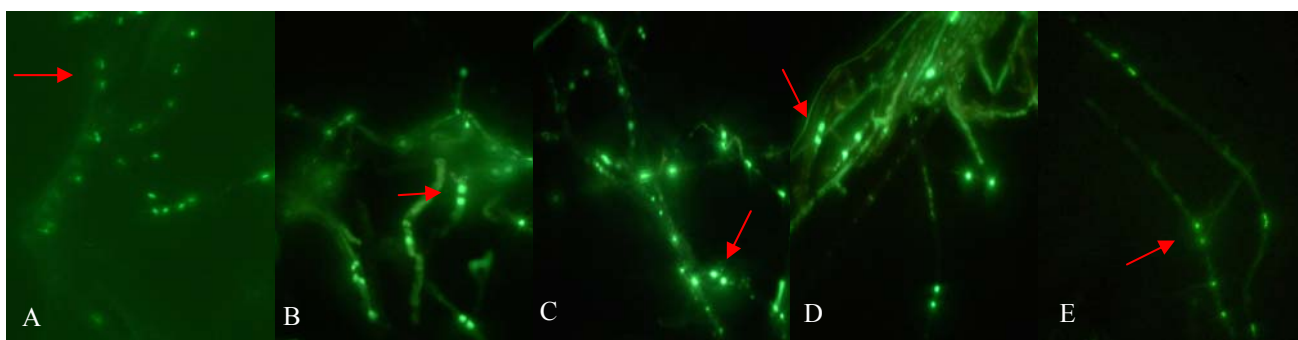


Figura 7 – Distribuição dos pares de núcleos no micélio do isolado UFV11, cultivado por 6 dias a 25°C , em BDA acrescido de quatro concentrações de selenito de sódio, A= $0,32 \text{ mmol L}^{-1}$ (100x); B= $0,64 \text{ mmol L}^{-1}$ (100x); C= $0,96 \text{ mmol L}^{-1}$ (100x); D= $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ (100x) e E= controle sem selênio (100x). As setas exemplificam alguns núcleos onde suas distâncias foram determinadas

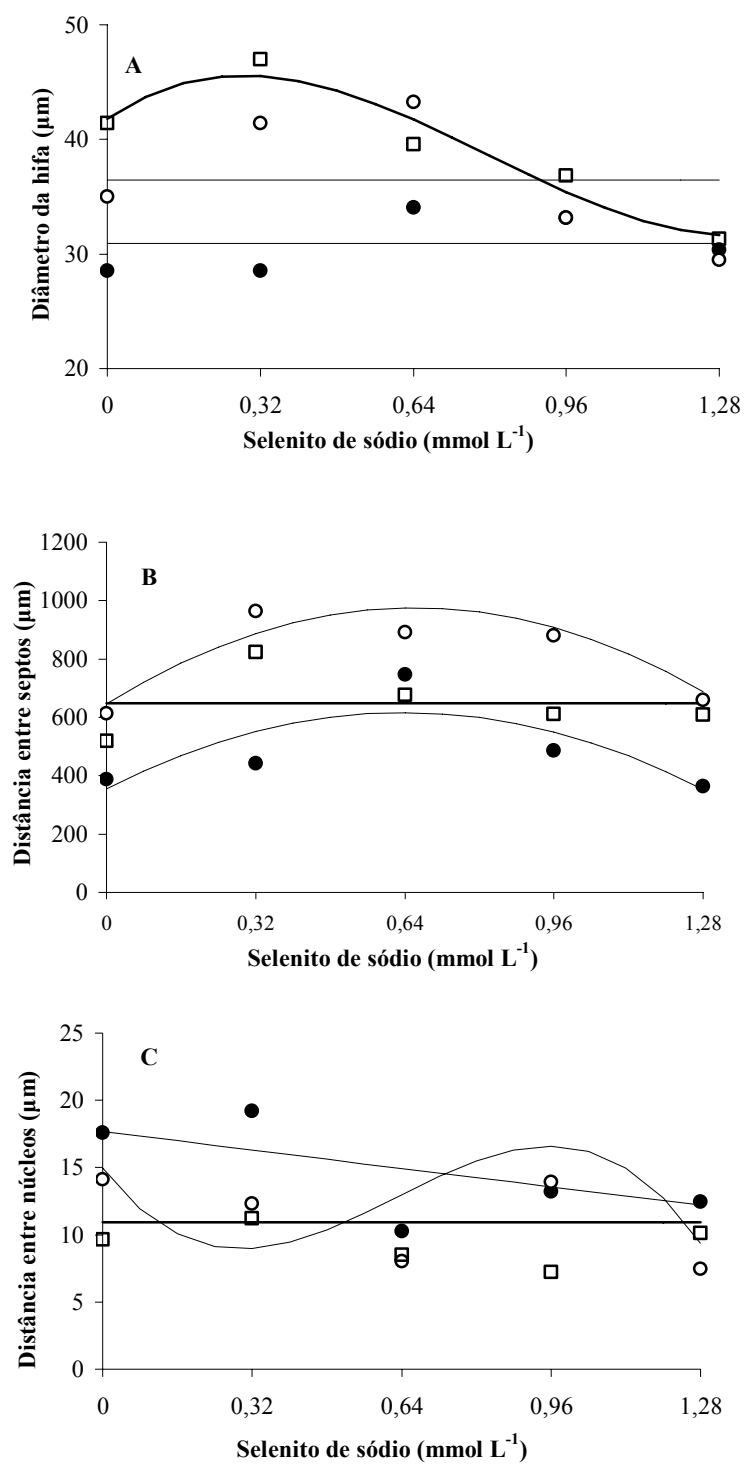


Figura 8 - Diâmetro das hifas (A), distância entre septos (B), distância entre núcleos (C) dos isolados UFV11($\bullet$), UFV16($\circ$) e UFV53($\square$) do fungo *L. edodes* cultivados em BDA com diferentes concentrações de selenito de sódio

O Se influenciou o diâmetro das hifas do isolado UFV53 mas não afetou a distância entre septos e entre núcleos. No entanto, os isolados UFV11 e UFV16 apresentaram comportamento oposto, visto que o Se influenciou a distância entre septos e entre núcleos, mas não modificou o diâmetro das hifas (Figura 8). Segundo Papagianni (2004), a extensão e o comprimento da hifa varia consideravelmente com o fungo e depende do suprimento de nutrientes e da área de superfície dessa hifa, o que aumentará o seu diâmetro e o estreitamento de sua extremidade. Para o autor, existem poucas pesquisas mostrando a relação entre a forma da extremidade da hifa e a taxa de extensão, mas essa aumenta geralmente com o diâmetro da hifa em um único organismo. Zhu e Gooday (1992) encontraram uma relação direta entre a extensão da hifa e o quadrado do diâmetro da hifa em *Botrytis cinerea*, sugerindo que a extensão da hifa é dependente do suprimento de material para a extremidade da hifa. De acordo com os autores, em *Mucor rouxii*, porém, embora a taxa de extensão da hifa tenha aumentado com o diâmetro, nenhuma relação quantitativa precisa, entre esses dois parâmetros, pôde ser identificada.

4. CONCLUSOES

O selenito de sódio afetou o crescimento micelial do fungo *L. edodes*.

O crescimento de alguns isolados é estimulado nas concentrações 0,32 mmol L⁻¹ de selenito de sódio no meio de cultura, enquanto outros são inibidos com as concentrações 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ desse composto no meio.

O aumento da massa seca não está diretamente relacionado com o diâmetro da colônia, pois a extensão da hifa pode aumentar pouco quando o crescimento do fungo ocorre com micélio mais compacto. Este resultado permite concluir que o método usado para determinar o crescimento fúngico pode afetar os resultados. Sugere-se que para determinar esse crescimento deve-se usar mais de um método para que os resultados sejam comparados.

A morfologia da colônia e do micélio foi alterada pela presença de Se com micélio mais compacto em menores concentrações desse elemento e com diminuição, no diâmetro das hifas, nas distâncias entre os septos e distância entre núcleos, na maior dose de Se aplicada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, P.M.; JEPSON, P.D.; LAW, R.J.; JONES, B.R.; KUIKEN, T.; BAKER, J.R.; ROGAN, E.; KIRKWOOD, J.K. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbor porpoises from England and Wales. **Environ. Pollut.**, v. 112, p. 33-40, 2001.
- BODDY, L. Saprotrophic cord-forming fungi: Warfare strategies and other ecological aspects. **Mycol. Res.**, v. 97, p. 641-655, 1993.
- CHEN, S.; MA, D.; GE, W.; BUSWELL, J.A. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 218, p. 143-148, 2003.
- BENTO, K.B.P. **Atividade antimicrobiana e composição mineral do cogumelo shiitake produzido em diferentes substratos**. 2001. 37f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- DARLINGTON, A.B.; RAUSER, W.E. Cadmium alters the growth of the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: a new growth model accounts for changes in branching. **Can. J. Bot.**, v. 66 p. 225-229, 1988.
- GADD, G. M.; RAMSAY, L.; CRAWFORD, J. W.; RITZ, K. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 204, p. 311-316, 2001.
- GADD, G.M.; SAYER, G.M. Fungal transformations of metals and metalloids. In: LOVLEY, D.R. (Ed.) **Environmental Microbe-Metal Interactions**. Washington, DC, American Society Microbiology, 2000. p. 237-256.
- GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytol.**, v. 124, p. 25-60, 1993.

- GADD, G.M. Metals and microorganisms: a problem of definition. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 100, p. 197-204, 1992.
- JONATHAN, S.G.; FASIDI, I. O. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. v. 5 p. 479-483, 2001.
- KOSSEN, N.W.F. The morphology of filamentous fungi. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 70, p. 1-33, 2000.
- LUNDY, S.D.; PAYNE, R.J.; GILES, K.R.; GARRILL, A. Heavy metals have different effects on mycelial morphology of *Achlya bisexualis* as determined by fractal geometry. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 259-263, 2001.
- MATSUURA S. Colony patterning and collective hyphal growth of filamentous fungi, **Physica A**, v. 315, n. 1-2, 125-136, 2002.
- MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.M.; TSAI, S.M. SYBR[®] Green I used to evaluate nuclei number of fungal mycelia. **BioTechniques**, v. 31, p. 42-46, 2001.
- MORRIS, N. R. Nuclear positioning: the means is at the end. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 54-59, 2003.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol. Adv.**, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PAPAGIANNI, M.; NOKES, S.E.; FILER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Proc. Biochem.**, v. 35, p. 397-402, 1999.
- RAMSAY, L.M.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. Stress responses of fungal colonies towards metals. In: GOW, N.A.R.; ROBSON, G.D.; GADD, G.M. (Eds). **The Fungal Colony**, Cambridge University Press, Cambridge, 1999. p.178-200.

- STIJVE, T.; BESSON, R. Mercury, cadmium, lead and selenium contents of mushroom species belonging to genus *Agaricus*, **Chemosp.**, v. 2, p. 151-158, 1976.
- TAN, J.; Zhu, W.; Wang, W.; Li, R. Hou, S. Wang, D.; Yang, L. Selenium in soil and endemic diseases in China. **Sci. Total Environ.**, v. 284, n. 1-3, p. 227-235, 2002.
- VALIX, M.; Loon, L.O. Adaptive tolerance behaviour of fungi in heavy metals. **Minerals Engineering**. v. 16, p. 193-198, 2003.
- VIÑAS, P.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; MERINO-MEROÑO, B.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of selenium species in infant formulas and dietetic supplements using liquid chromatography–hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Anal. Chim. Act. (no prelo)**, 2005.
- ZHU, W.Z.; GOODAY, G.W. Effects of nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*, **Mycol. Res.**, v. 96, p. 371-377, 1992.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADES ENZIMÁTICA E RESPIRATÓRIA DO FUNGO *Lentinula edodes* CULTIVADO EM SUBSTRATO LIGNINOCELULÓSICO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SELENITO DE SÓDIO

1. INTRODUÇÃO

O crescimento e a atividade dos microrganismos pode variar em função de modificações do meio ambiente, a exemplo da presença de metais ou metalóides. Em solos contaminados por metais ocorre diminuição significativa na evolução de CO₂ (Hattori, 1992; Rajapaksha, 2004). Entretanto, Flieûbach et al. (1994) reportaram aumentos na evolução de CO₂ em solos poluídos com metais. Por outro lado, alguns metais e metalóides podem ser considerados micronutrientes pelos microrganismos, ou mesmo para os animais. Entre esses elementos, necessários para a viabilidade celular em pequenas concentrações, está o selênio (Se).

O Se é um metalóide encontrado naturalmente no solo e está presente em várias enzimas, dentre elas a glutathione peroxidase, responsável pela redução de hidroperóxidos livres ou ligados à membrana celular (Wendel, 1981); a deiodinase, envolvida no metabolismo da tireóide (Koehrle, 1999); a tioredoxina redutase que está envolvida na regulação redox de grupos dissulfetos em diversas enzimas e fatores de transcrição (Holmgren, 1977) e a selenoproteína P que é abundante no plasma (Allan et al., 1999). A redução de selenato (Se(VI)) e selenito (Se(IV)) a selênio elementar (Se⁰) pode ser catalisada por numerosos fungos e bactérias (Gharieb et al., 1995; Stolz e Oremland, 1999).

Os fungos têm função importante na decomposição da matéria orgânica como celulose e hemicelulose (Zelles e Alef, 1995). *L. edodes* é um fungo formador de cogumelo que utiliza resíduos ligninocelulósicos, fonte abundante e renovável de energia na terra. Além de converter esses resíduos, que potencialmente poderiam poluir o ambiente, em cogumelos para o consumo humano, o substrato resultante pode ser empregado na alimentação animal (Zhang et al., 1995). O uso da ligninocelulose como fonte de carbono depende da capacidade do fungo em produzir enzimas ligninocelulolíticas e excretá-las ao meio extracelular (Mata e Savoie, 1998;

Villas-Bôas et al., 2002). As principais enzimas ligninocelulolíticas encontradas no substrato colonizado por *L. edodes* incluem lacase, manganês peroxidase, celulase e xilanase (Leatham, 1985; Tokimoto et al., 1987; Ohga, 1992; Buswell, et al., 1995; Cavallazzi, 2004). Além de produção das enzimas hidrolíticas, a capacidade de um isolado converter o substrato ligninocelulósico em cogumelo comestível é outra característica que deve ser observada na seleção de estirpes para produção comercial (Ohga, 1992; Shearer, 1995).

O crescimento de um fungo filamentoso pode ser avaliado de maneira direta com base no crescimento linear, na biomassa fresca, na massa seca ou pela quantidade de alguns constituintes miceliais (Tan e Moore, 1995). Outra alternativa para a determinação do crescimento fúngico é o uso de medidas indiretas, baseadas em atividades metabólicas como, atividade enzimática específica e atividade respiratória representada pelo consumo de O₂ ou liberação de CO₂.

A importância de usar atividade enzimática para monitorar o crescimento vegetativo de *L. edodes* vem sendo considerada. De acordo com Silva et al. (2005), o estudo envolvendo a produção de enzimas que degradam celulose, hemicelulose e lignina permite acompanhar diretamente a colonização do substrato, constatando-se uma correlação entre o crescimento fúngico e a produção de enzima o que pode ser um parâmetro adequado para avaliar o período entre inoculação do substrato e frutificação. Assim, afirmam os autores, a determinação da atividade enzimática, pode substituir as metodologias laboriosas para quantificação do crescimento fúngico em substratos sólidos.

A medida da atividade respiratória ou respirometria constitui-se um procedimento para avaliar a calibração de modelos cinéticos microbianos, o estado da atividade microbiana (Marsili-Libelli e Tabani, 2002), monitorar o desenvolvimento da colônia e avaliar a utilização pelo fungo de substratos específicos (Tan e Moore, 1995). Por se tratar de uma técnica não destrutiva e por permitir avaliações contínuas, os dados da respirometria resultam em curvas de crescimento mais detalhadas que as obtidas pela análise da produção da biomassa (Braga et al., 1999). Os autores afirmam que a resposta da respiração microbiana a exposição a metais tem sido medida pela alteração na liberação de CO₂ pelo microrganismo.

No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito do selenito de sódio sobre as atividades das enzimas ligninocelulósicas, do fungo *L. edodes*, que têm estreita relação com a produção de cogumelos e avaliar também o efeito desta substância na atividade respiratória desse fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa – UFV, em Viçosa – Minas Gerais.

2.1. Atividade enzimática específica

Os isolados UFV11, UFV16 e UFV53 de *L. edodes* foram cultivados em 20 g de substrato à base de serragem de eucalipto, preparado de acordo com Bento (2001) e adicionado de selenito de sódio (Na_2SeO_3) nas concentrações de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L^{-1} . O substrato foi acondicionado em frascos com tampa metálica com um orifício selado com fita crepe para troca gasosa, a 25 °C por 21 dias. Como controle, cultivou-se o *L. edodes* em substrato não adicionado de Na_2SeO_3 . A cada sete dias de incubação foram retiradas amostras do composto miceliado para análises da atividade das enzimas lacase, celulase e xilanase e para a determinação da proteína solúvel. A proteína solúvel foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976) e utilizada para cálculo da atividade específica das enzimas. O experimento foi conduzido em triplicata.

2.1.1. Lacase

A atividade da lacase (Lac, EC 1.10.3.2) foi determinada pela oxidação de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonato) (ABTS) a 37 °C (Buswell et al., 1996), em 1 mL de mistura de reação contendo 0,6 mL de tampão acetato de sódio (0,1 mol L^{-1}), pH 5,0; 0,3 mL de extrato fúngico e 0,1 mL de ABTS (1,0 mol L^{-1}).

O extrato fúngico foi preparado pesando-se 3 g do substrato colonizado pelo fungo, em erlenmeyer e adicionando-se 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} (pH 5,0). Agitou-se em shaker a 100 RPM / 19 °C por 15 min. Após agitação o extrato fúngico foi filtrado com papel de filtro Whatman® nº 01. Após filtração, preparou-se a mistura de reação e fez-se a leitura imediata da absorbância a 420 nm a 37 °C em espectrofotômetro, modelo DU® 640 Beckman, com controle de temperatura. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da

absorbância Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ABTS por minuto ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.1.2. Celulase

A atividade da celulase (Cel, EC 3.2.1.4) foi determinada pelo método do papel de filtro, de acordo com Mandels et al. (1976). O método baseia-se na determinação de glicose liberada a partir do papel de filtro (substrato enzimático) pela ação do caldo enzimático.

O extrato fúngico foi preparado pesando-se 4 g de substrato colonizado pelo fungo, adicionando-se 20 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 4,8 e agitando-se em shaker a 100 rpm por 15 min. Após agitação o extrato fúngico foi filtrado com papel de filtro Whatman® nº 01. Após filtração, transferiram-se 2,5 mL do extrato fúngico, 2,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 4,8 para tubos de ensaio contendo tiras de papel de filtro Whatman® nº 01 (1 cm x 6 cm). Os tubos foram agitados manualmente e incubados a 50°C por 4 horas, em banho-maria. Para o branco, adicionou-se o DNS antes da incubação, para parar a reação enzimática. Após a incubação, transferiu-se 1 mL do extrato fúngico para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de DNS (ácido dinitrosalicílico) previamente preparada. Essa mistura ficou em banho-maria, a 100°C por 5 minutos e após esta etapa, adicionaram-se 8 mL de água destilada para completar o volume para 10 mL.

Os açúcares foram determinados como açúcares redutores totais pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) em espectrofotômetro (modelo DU® 640 Beckman) a 540 nm segundo Miller (1959) e quantificados pela relação obtida com uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 mmol de glicose por minuto a 50°C .

2.1.3. Xilanase

A atividade da xilanase (Xyl, EC 3.2.1.8/EC 3.2.1.32/EC 3.2.1.136) foi determinada pela medida da quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana (Barley et al., 1992).

O extrato fúngico foi preparado pesando-se 4 g de substrato colonizado pelo fungo, adicionando-se 20 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 4,8 e agitando-se em shaker a 100 rpm por 15 min. Após agitação o extrato fúngico foi filtrado em papel de filtro Whatman[®] n° 01. Após filtração, transferiram-se 2,5 mL do extrato fúngico e 2,5 mL da solução de xilana para tubos de ensaio. Os tubos foram homogeneizados agitando-se manualmente e incubados a 50 °C por 30 minutos, em banho-maria. Para o branco, adicionou-se o DNS antes da incubação, para parar a reação enzimática. Após a incubação, transferiu-se 1 mL do extrato fúngico para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de DNS (ácido dinitrosalicílico) previamente preparada. Essa mistura ficou em banho-maria, a 100 °C por 5 minutos e depois desta etapa, adicionou-se 8 mL de água destilada para completar o volume para 10 mL.

Para o preparo da solução de xilana utilizou-se 1 g de xilana dissolvida em 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,3. A solução foi aquecida até a ebulição e, depois de resfriada à temperatura ambiente, o volume foi completado para 100 mL com o mesmo tampão. Os açúcares foram determinados como açúcares redutores totais pelo método do DNS em espectrofotômetro (modelo DU[®] 640 Beckman) a 540 nm de acordo com Miller (1959) e quantificados pela relação obtida com uma curva padrão de xilose. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 mmol de xilose por minuto a 50 °C.

2.2. Atividade respiratória

Para avaliação da atividade respiratória do fungo *L. edodes*, dez gramas do substrato à base de serragem de eucalipto preparado de acordo com Bento (2001), foram acondicionadas em frascos de vidro Gibco[®], adicionadas de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio. O tratamento controle consistiu do mesmo

substrato não adicionado de selenito de sódio. Um disco de ágar de 8 mm de diâmetro contendo micélio retirado das bordas das colônias das culturas estoques, mantidas em BDA, dos isolados UFV11, UFV16 e UFV53, foi usado para a inoculação. Os frascos foram incubados a 25 °C em estufas tipo BOD. No quinto dia de crescimento do fungo, os frascos foram acoplados ao respirômetro de fluxo contínuo (TR – RM8 Respirometer Multiplexer – Sable Systems), onde a taxa de liberação de CO₂ foi medida por meio de detectores de infravermelho e a atividade respiratória determinada a cada sete horas pela produção de CO₂, (Heinemeyer et al., 1989). Os frascos permaneceram acoplados ao aparelho até o décimo segundo dia de crescimento do fungo.

O experimento foi repetido com os mesmos isolados acoplando-se os frascos ao respirômetro no décimo dia de crescimento onde permaneceram até o décimo sétimo dia de crescimento. Os dois experimentos foram realizados com triplicatas.

2.3. Análise estatística

Adotou-se o delineamento em fatorial com três isolados (UFV11, UFV16 e UFV53), cinco níveis de concentração de Se, três níveis de tempo para a atividade enzimática e oito níveis de tempo para a atividade respiratória, em três repetições. Os dados foram analisados pela análise de variância e de regressão, utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade enzimática específica

Os resultados obtidos indicam um efeito ativador ($p < 0,05$) do Se sobre a atividade específica da lacase dos três isolados de *L. edodes* avaliados (Figura 1). Embora não tenham sido encontrados relatos sobre o efeito do Se na atividade dessa enzima em microrganismos, foi observado que metais, como o cobre, podem aumentar a estabilidade da lacase por inibirem uma protease extracelular responsável pela degradação dessa enzima (Palmieri et al., 2001). Chen et al. (2003) também verificaram que a lacase é influenciada, positivamente, por doses elevadas de cobre onde atividade detectável de lacase foi observada em culturas suplementadas com 50 a 300 μM CuSO_4 , com o máximo da atividade da enzima registrado em concentrações de 200 μM e nenhuma atividade dessa enzima foi detectada quando o elemento não foi adicionado. Baldrian e Gabriel (2002) concluíram que o Cu não somente induz a lacase, pela expressão de seus genes, mas também afeta positivamente, a atividade e estabilidade dessa enzima. Outros metais também influenciam a atividade de lacase. Em substrato suplementado com cátions metálicos para o crescimento de *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxas* CH32, foi verificado que a atividade da lacase foi completamente inibida por mercúrio (Hg^{2+}) em concentrações de 0,01 mol L^{-1} e por sais de Fe^{2+} e Ag^{2+} , além de Cu^{2+} (Robles et al., 2002). A atividade da lacase pode também ser aumentada pelo aumento da concentração de nitrogênio em meios de cultura (Buswell et al. 1995). Chen et al. (2003) demonstraram que a atividade de lacase em *V. volvacea* foi afetada tanto pela concentração de nitrogênio como pelo período de incubação. Os autores observaram ainda que a atividade dessa enzima aumentou acentuadamente durante o período de iniciação do corpo de frutificação até a fase de maturação quando a produção de biomassa fúngica tinha alcançado o máximo. Para Hatvani e Mécs (2003), a adição de metais como, cobre, cádmio, zinco, chumbo e mercúrio, resulta em aumento na atividade de lacase.

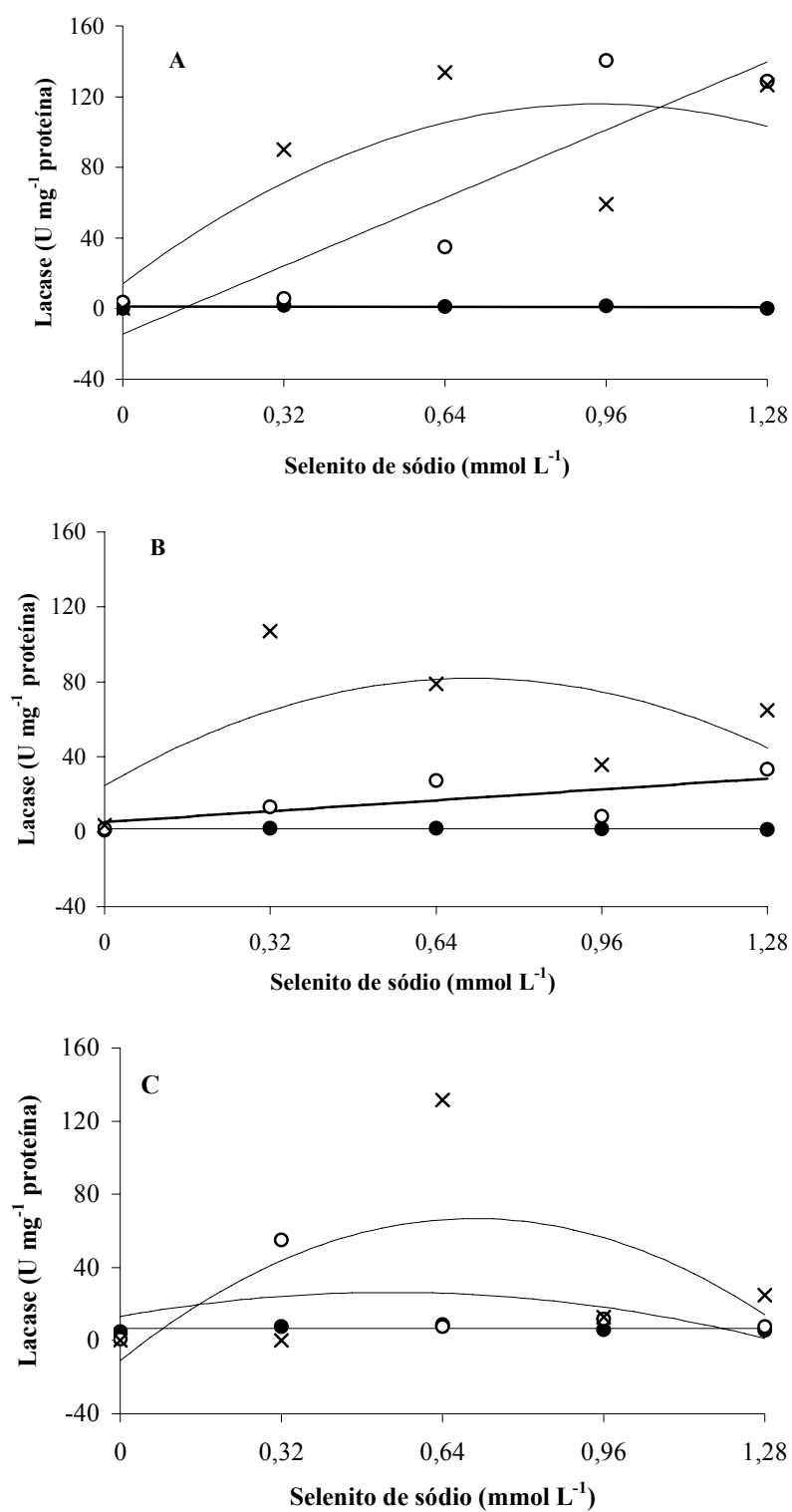


Figura 1 - Atividade enzimática da lacase dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53, do fungo *L. edodes*, cultivados a 25 °C por ● 7 dias; ○ 14 dias e × 21 dias, em diferentes concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio

A indução da enzima lacase é considerada uma resposta protetora a compostos tóxicos produzidos durante a degradação dos componentes da lignina de resíduos ligninocelulósicos que servem como um substrato natural de crescimento do fungo ou como agentes antimicrobianos secretados por microrganismos competidores (Thurston, 1994; Eggert et al., 1996; Collins e Dobson, 1997).

A atividade específica da lacase variou entre os isolados ($p < 0,05$) e atingiu valores maiores no UFV11, na concentração $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio, enquanto que o isolado UFV53 foi o que apresentou menores valores da atividade dessa enzima. Este resultado indica a maior sensibilidade desta enzima do isolado UFV53 à presença de selenito de sódio (Figura 1). Alta atividade específica da enzima lacase, durante o cultivo do fungo *L. edodes* em substratos a base de casca de eucalipto, foi observada por Cavallazzi et al. (2004) que verificaram que a atividade dessa enzima é diferente entre os três isolados avaliados. Entretanto, nesse trabalho, os autores avaliaram a atividade da lacase em cultivos com períodos de incubação superiores há 21 dias e essa atividade decresceu com o tempo. Resultado semelhante foi obtido por Silva et al. (2005) ao considerarem que a atividade de lacase variou significativamente entre nove isolados de *L. edodes*, indicando, para os autores, que a natureza da estirpe influencia principalmente a atividade das enzimas oxidativas. Para Ohga e Royse (2001), a atividade da lacase em *L. edodes*, foi alta durante o crescimento micelial, diminuindo rapidamente no início da frutificação. De acordo com os autores, este comportamento se deve ao fato que, a expressão dos genes da lacase, medida como níveis de mRNA, é máxima na fase de completa colonização do substrato por este fungo e declina a baixos níveis durante a frutificação. Wood (1980) também registrou atividade elevada de lacase durante o crescimento micelial de *Agaricus bisporus*, levando a uma grande degradação de lignina e conseqüentemente, na fase de produção do esporóforo houve maior disponibilização de fonte de carbono necessária para a frutificação.

A atividade específica da celulase foi baixa para os três isolados avaliados e diferiu ($p < 0,05$) com a concentração de selenito de sódio e com o isolado (Figura 2). A baixa atividade da enzima celulase observada neste experimento, pode ter sido em razão do tempo de reação de quatro horas de reação enzimática usado na análise. Entretanto, baixa atividade de celulase em isolados de *L. edodes* foi registrada por Cavallazzi et al. (2004) que verificou que essa atividade também foi influenciada

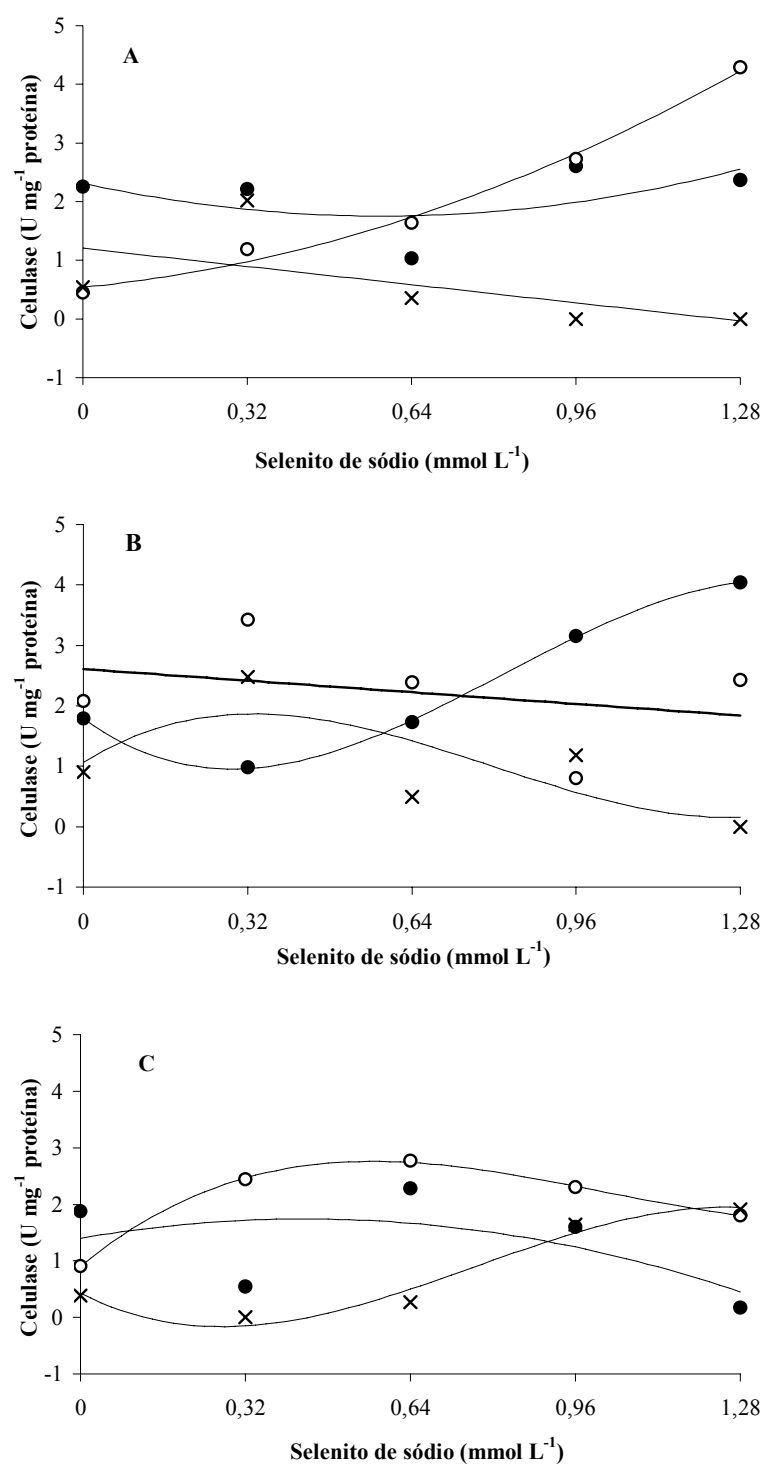


Figura 2 - Atividade enzimática da celulase dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53, do fungo *L edodes*, cultivados a 25 °C por ● 7 dias; ○ 14 dias e X 21 dias, em diferentes concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio

pelo isolado. Atividades baixas de celulase também foram registradas em micélio do fungo *Ceriporiopsis subvermispora* por Ferraz et al. (2003). Em contraste, Silva et al. (2005) encontraram altos valores de celulase, e essa atividade foi bastante uniforme entre os isolados de *L. edodes*, afirmaram os autores.

A atividade da xilanase foi alterada ($p < 0,05$) com a adição de selenito de sódio, com o isolado e com o tempo de cultivo (Figura 3). Em função da variação dos dados da atividade da xilanase do isolado UFV16 no décimo quarto dia de crescimento do fungo, não foi possível fazer o ajuste estatístico adequado dos dados. A atividade da xilanase foi baixa para todos os três isolados de *L. edodes* testados em todos os tratamentos, inclusive no controle (Figura 3). Este resultado está em acordo com Cavallazzi et al. (2004) que observaram, durante o cultivo de um isolado de *L. edodes*, uma baixa atividade de xilanase e esta atividade diminuiu com o tempo de cultivo. De acordo com Silva et al. (2005), a atividade da xilanase foi a mais alta entre as enzimas hidrolíticas estudadas em nove estirpes de *L. edodes*, com valores variando de 12.958,3 a 16.101,8 UI kg⁻¹. De acordo com esses autores, o fungo *L. edodes* é considerado como um produtor moderado de celulase por ele hidrolisar xilana mais eficientemente que carboximetilcelulose. Os autores afirmaram ainda que os resultados indicam que resíduos de eucalipto misturado com farelo de arroz, usado demonstrou ser ideal para a produção de enzima extracelular por *L. edodes*, mas também para cultivo da biomassa micelial. A xilanase foi a principal enzima hidrolítica no fungo *Ceriporiopsis subvermispora* cultivado em serragem de *Eucalyptus grandis* com atividade máxima de 960 UI por cultura no décimo quinto dia de biodegradação (Ferraz et al., 2003).

Os resultados evidenciaram que a atividade das enzimas celulase (Figura 2) e xilanase (Figura 3) foi maior no sétimo e décimo quarto dia de análise, enquanto que a atividade da lacase (Figura 1) foi maior no vigésimo primeiro dia de crescimento do fungo. Como a lacase é uma enzima que degrada a lignina, deveria ser a enzima a agir primeiro na degradação do substrato à base de serragem de eucalipto. Pode-se supor que houve uma hidrólise ácida parcial da lignina durante o tratamento térmico do substrato, pois o pH do mesmo foi 4,5. Segundo Franzidis e Proteus (1981), na hidrólise ácida dos materiais celulósicos a molécula de ácido, sendo pequena, penetra na lignina e rapidamente hidrolisa a hemicelulose e as regiões não cristalinas da celulose. Posteriormente, ocorre o ataque sobre a celulose cristalina numa taxa 100

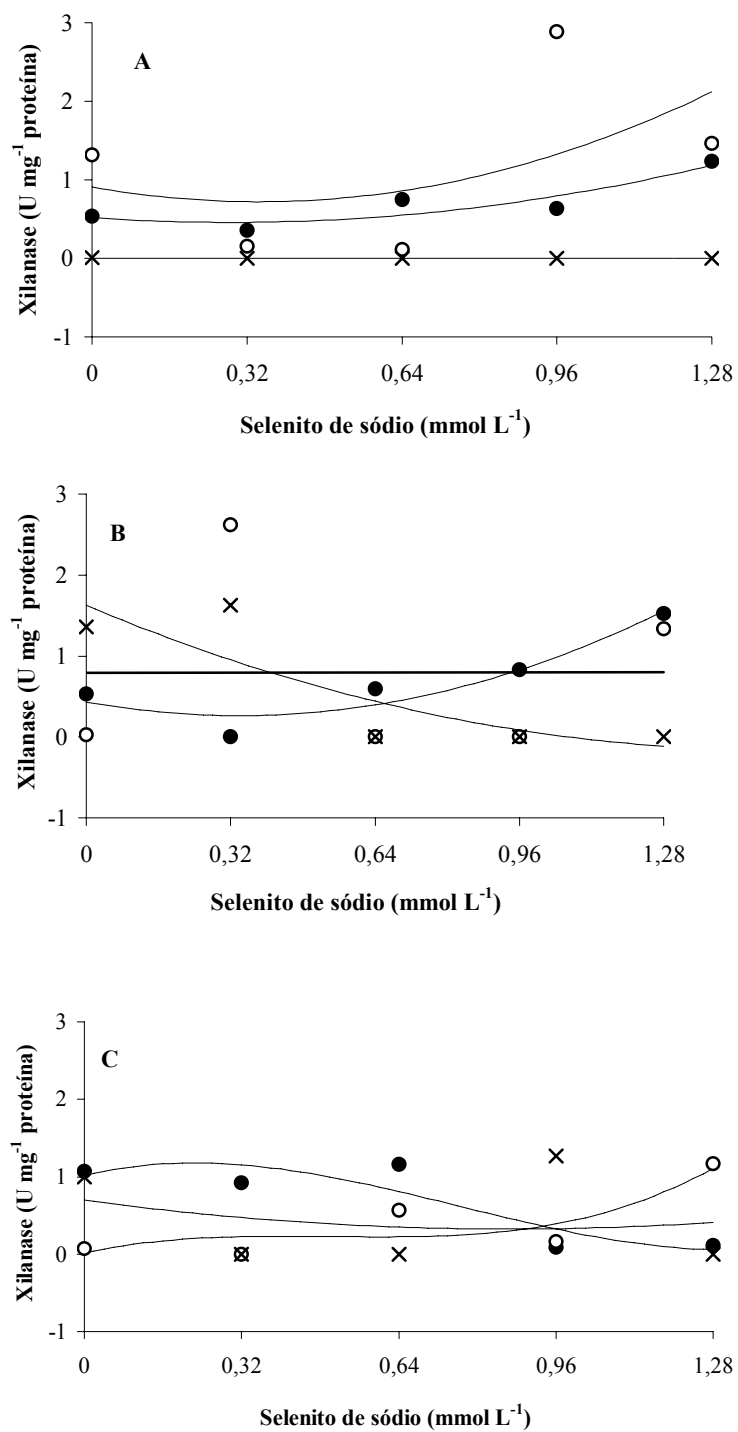


Figura 3 - Atividade enzimática da xilanase dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53, do fungo *L. edodes*, cultivados a 25 °C por ● 7 dias; ○ 14 dias e × 21 dias, em diferentes concentrações de selenito de sódio e controle sem selênio

vezes menor que a taxa inicial de hidrólise. A hemicelulose hidrolisada resulta, principalmente, em pentoses, das quais a mais comum é a xilose. Fengel e Wegener (1989) afirmaram que durante a hidrólise ácida de materiais ligninocelulósicos, os polissacarídeos reagem com a água liberando os seus monômeros, como glicose, xilose, e outros e os ácidos agem como catalisadores, podendo, assim, promover ou intensificar a hidrólise de alguns constituintes. De acordo com Blanchette et al. (1997) a ocorrência da degradação da lignina durante o primeiro estágio de decomposição não erosiva da madeira, quando a baixa permeabilidade da parede celular não permite difusão de enzimas, indica claramente que alguns agentes de baixa massa molecular atuam.

A baixa atividade inicial da lacase verificada nos isolados de *L. edodes* pode ser justificada também pela adição de farelo de arroz ao substrato, que segundo Cavallazzi et al. (2004), é uma fonte de carbono prontamente utilizada pelo fungo para o seu crescimento micelial e as enzimas ligninolíticas, como lacase e manganês peroxidase, que são produzidas para a hidrólise dos polímeros de lignina e dos compostos fenólicos, promovendo uma rápida e eficiente colonização do substrato. Lee et al. (1978) sugeriram que sendo a hemicelulose hidrolisada mais rapidamente que a celulose, quando a reação ocorre em condições que favorecem a hidrólise desta, a maior parte da xilose é decomposta. Isto possibilita a fração hemicelulósica ser hidrolisada seletivamente da biomassa. De acordo com Mata e Saivoie (1998), a atividade das carboidrases usualmente aumenta durante a frutificação visto que a produção do esporóforo é, provavelmente, dependente da capacidade do fungo em metabolizar novas fontes de carbono de polissacarídeos e os melhores rendimentos na produção de cogumelo foram obtidos por meio das estirpes com menores atividades de carboidrases durante a colonização do substrato.

Os três isolados apresentaram baixa atividade da lacase (Figuras 1) no meio sem Se nos três tempos avaliados e a atividade dessa enzima foi aumentando ao longo do tempo nos meios com Se. As atividades da celulase e xilanase (Figuras 2 e 3) diminuíram à medida que se aumentou a dose de Se e ao longo do tempo de avaliação, o que pode ser uma indicação de alta eficiência durante a frutificação. Silva et al. (2005) observaram boa correlação entre o crescimento do isolado de *L. edodes* e a produção de algumas enzimas, entre elas a xilanase e a celulase, o que pode ser um bom parâmetro para avaliar o período entre a inoculação do substrato e a

frutificação, afirmam os autores. De acordo com Cavallazzi et al. (2004), isolados de *L. edodes*, a exemplo do UFV53 que possui alta atividade de manganês peroxidase e baixa atividade de lacase, durante a colonização do substrato, tem potencial para ser utilizado em substrato à base de eucalipto, pois apresenta característica que o torna capaz de degradar os compostos fenólicos presentes nesse substrato.

3.2. Atividade respiratória

A atividade respiratória dos três isolados estudados foi influenciada pela presença de Se no substrato ligninocelulósico, apresentando-se decrescente à medida que se aumentou a dose desse elemento (Figuras 4 e 5). Na primeira etapa de avaliação da respiração, os isolados UFV11 e UFV16 apresentaram redução na taxa respiratória em torno de 30 % quando se adicionou 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio ao substrato. No isolado UFV53, a redução dessa taxa alcançou cerca de 40 %, o que sugere que esse isolado é menos tolerante a adição de Se ao substrato de crescimento do que o UFV11 e UFV16. Neste isolado UFV53, a taxa respiratória foi reduzida não apenas na concentração máxima de 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio utilizada, mas a partir da concentração 0,96 mmol L⁻¹ (Figura 4).

O decréscimo da taxa respiratória dos isolados avaliados, constatado ao longo do tempo de cultivo encontra explicação na literatura científica. Estudos comprovaram que a atividade de microrganismos, principalmente fungos, normalmente decresce após algum tempo de incubação por exaustão de nutrientes e a partir de certo ponto, a respiração micelial acontece às custas de suas reservas endógenas acumuladas durante a fase de crescimento (Hill et al., 1992; Braga et al., 1999; Lin e Brookes, 1999).

Além do efeito da exaustão de nutrientes, a presença de Se no substrato também pode ter contribuído para a redução da taxa respiratória. West e Sparling (1986) verificaram que a produção de CO₂ no solo aumentou significativamente com a adição de glicose acima de 60 mg mL⁻¹ de água. Drobinik (1960) reportou que o aumento logarítmico na evolução de CO₂ em substrato adicionado de glicose, foi atribuído à síntese de enzimas induzidas pela adição dessa substância. O efeito de metais na taxa respiratória de microrganismos foi verificado por Rajapaksha et al. (2004) que observaram que durante a primeira semana após a adição de zinco (Zn) e

cobre (Cu) ao solo, a taxa respiratória de fungos do solo diminuiu em 30 % e permaneceu estável durante os sessenta dias de incubação.

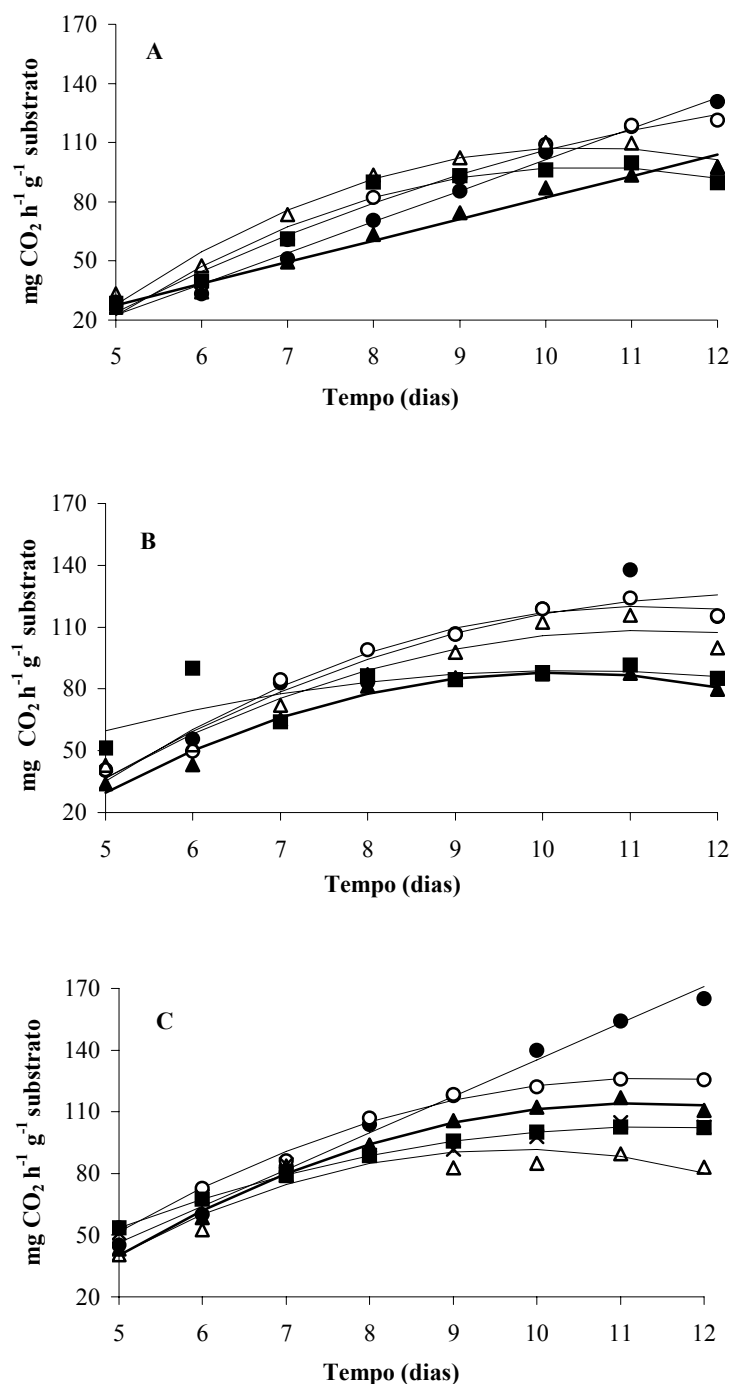


Figura 4 - Atividade respiratória medida do quinto ao décimo segundo dia de crescimento, dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53 do fungo *L. edodes*, cultivados a 25 °C, em substrato ligninocelulósico acrescido de ○ 0,32 mmol L⁻¹; ▲ 0,64 mmol L⁻¹; △ 0,96 mmol L⁻¹; ■ 1,28 mmol L⁻¹ e ● controle sem selênio

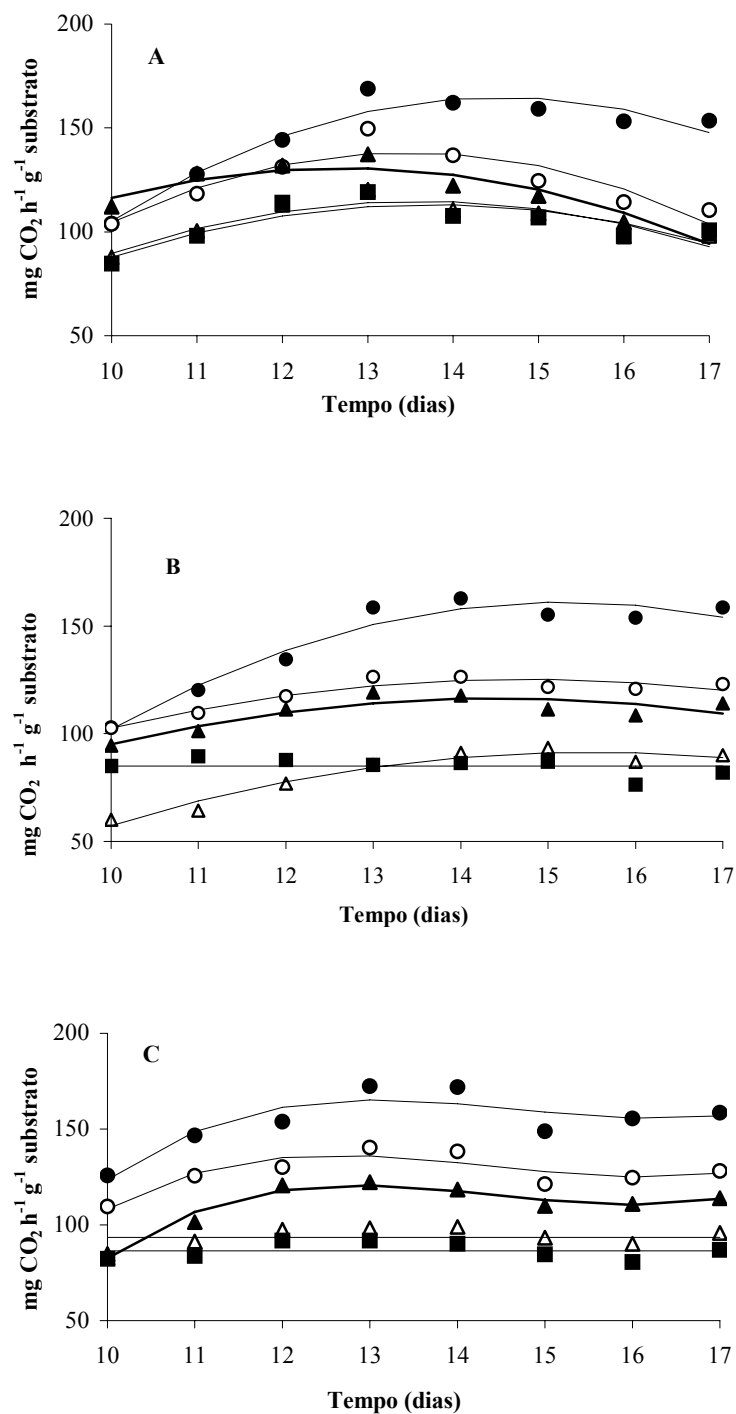


Figura 5 - Atividade respiratória medida do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento, dos isolados (A) UFV11; (B) UFV16 e (C) UFV53 do fungo *L. edodes*, cultivados em substrato ligninocelulósico a 25 °C, acrescido de ○ 0,32 mmol L⁻¹; ▲ 0,64 mmol L⁻¹; △ 0,96 mmol L⁻¹; ■ 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e ● controle sem selênio

A respiração do fungo *L. edodes* diminuiu à medida que se aumentou a concentração de selenito de sódio (Figuras 6 e 7). Observou-se que a taxa respiratória acumulada variou com o isolado, no período correspondente do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento do fungo, sendo que o isolado UFV11 apresentou maior taxa respiratória acumulada e o isolado UFV53 a menor na maior dose de 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio (Figura 7).

Os resultados encontrados nestes experimentos indicam que o Se, em doses elevadas, pode ser tóxico ao fungo, comprometendo seu crescimento e promovendo a redução na taxa respiratória. A influência do Se na taxa respiratória foi observada também em porcos, onde estes apresentaram uma redução de 38,8 % da taxa respiratória após inalação de SeO₂ (Nonavinakere et al., 1999). Porém, quando o Se foi inalado na forma de selenometionina não houve diminuição significativa dessa taxa. Esses autores afirmam, ainda, que a respiração é afetada pela forma inorgânica de Se, como por exemplo, selenito de sódio e não pela forma orgânica desse elemento. Uma provável explicação para o efeito diferenciado entre forma orgânica e inorgânica deste elemento pode ser a solubilidade que influencia a liberação, retenção e absorção do elemento. No entanto, na avaliação de atividade respiratória deve-se ter cuidados na interpretação dos resultados, uma vez que valores de respiração elevados podem ser resultantes de condições favoráveis do meio ou pode ser reflexo de um consumo intenso de carbono oxidável, pela população microbiana, em ambientes que causem estresse aos microrganismos (Tótola e Chaer, 2002). Portanto, a redução na atividade respiratória, observada neste estudo, pode ter sido em razão da redução no tamanho da célula fúngica pelo efeito da presença de selenito de sódio, já que em condições de estresse, a atividade respiratória deveria aumentar.

A redução da taxa respiratória dos isolados UFV11, UFV16 e UFV53 observada com o aumento da concentração de selenito de sódio no substrato (Figuras 4 e 5) nem sempre foi acompanhada pela redução da atividade das enzimas lacase, celulase e xilanase (Figuras 1 a 3) e, pode-se sugerir que as reduções no crescimento e na atividade respiratória de *L. edodes* causadas pela presença de Se levaram a maior atividade metabólica do fungo e, conseqüentemente, maior atividade de suas enzimas extracelulares para o crescimento.

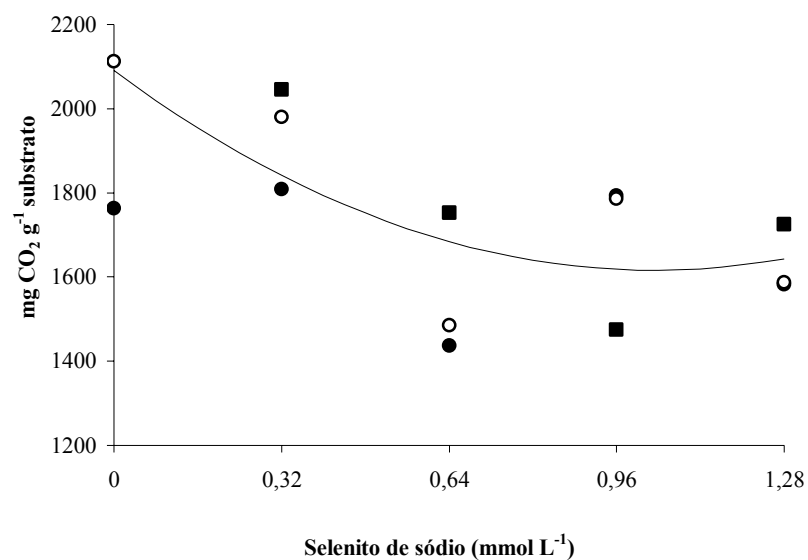


Figura 6 - Atividade respiratória acumulada medida do quinto ao décimo segundo dia de crescimento dos isolados ● UFV11; ○ UFV16 e ■ UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico a 25 °C

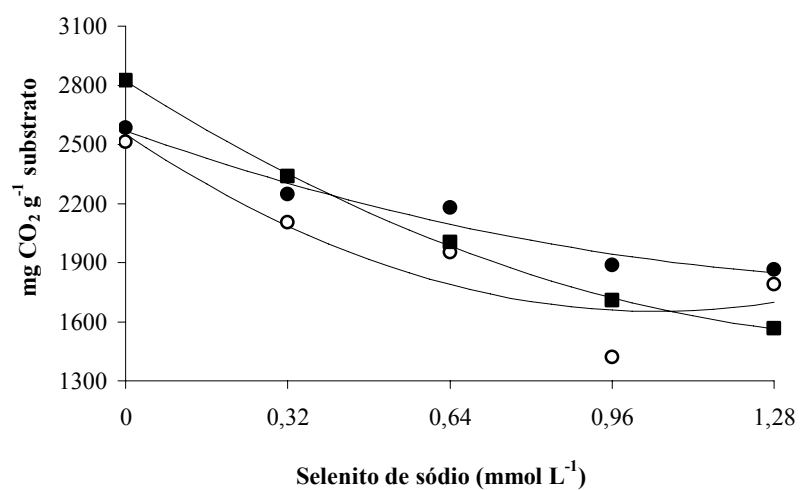


Figura 7 - Atividade respiratória acumulada medida do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento dos isolados ●UFV11; ○UFV16 e ■UFV53 do fungo *L. edodes*, cultivados a 25 °C, em substrato ligninocelulósico

4. CONCLUSÕES

O selenito de sódio afetou, de maneira variável, as atividades da lacase, celulase e xilanase em micélio de *L. edodes* e este efeito foi dependente do isolado, da concentração de selenito de sódio e do tempo de avaliação da atividade.

O aumento da concentração de selenito de sódio adicionado ao substrato reduziu a atividade respiratória. Entretanto, menor atividade respiratória, nem sempre resultou em menor atividade das enzimas avaliadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, B.C.; LACOURCIERE, G.M.; STADTMAN, T.C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 19, p. 1-16, 1999.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 206, p. 69-74, 2002.
- BARLEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for xylanase activity. **J. Biotechnol.**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- BENTO, K.B.P. **Atividade antimicrobiana e composição mineral do cogumelo shiitake produzido em diferentes substratos**. 2001. 37f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- BLANCHETTE, R.A.; KRUEGER, E.W.; HAIGHT, J.E.; AKHTAR, M.; AKIN, D.E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **J. Biotechnol.**, v. 53, p. 203-213, 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, G.U.L.; DESTÉFANO, R.H.R.; MESSIAS, C.L. Oxygen Consumption by *Metarhizium anisopliae* during Germination and Growth on Different Carbon Sources. **J. Invertebr. Pathol.** v. 74, p. 112-119, 1999.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T.; PEDERBY, J.F.; FU, S.Y.; YU, H.S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, p. 537-542, 1996.

- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 128, p. 81-88, 1995.
- CAVALLAZZI, J.R.P.; BRITO, M.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; VILLAS-BÔAS, S.G.; KASUYA, M.C.M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium, **Food Agric. Environ.**, v. 2, n. 1, p. 291-297, 2004.
- CHEN, S.; MA, D.; GE, W.; BUSWELL, J.A. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 218, p. 143-148, 2003.
- COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p.3444-3450, 1997.
- DROBNIK, J. Primary oxidation of organic matter in the soil. I. The form of respiration curves with glucose as the substrate. **Plant Soil**, v. 12, p. 199-211, 1960.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the lacase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 151-1158, 1996.
- FENGEL D.; WEGENER, G. **Wood-Chemistry ultra structure reactions**. New York, De Gruyter, 1989, p. 615.
- FERRAZ, A.; CORDOBA A.M.; MANCHACA A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, p. 59–65, 2003.

FLIEÛBACH, A.; MARTENS, R.; REBER, H.H. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal-contaminated sewage sludge. **Soil Biol. Biochem.**, v. 26, p. 1201-1205, 1994.

FRANZIDIS, J.P.; PROTEUS A. Review of recent research on the development of cellulose In: KLASS, D.L.; EMERT, G.H. (Eds). **Fuels from biomass and waste, Michigan**. Ann. Arbor. Sci. Publishers, 1981. p. 519-531.

GHARIEB, M.M.; WILKINSON, S.C.; GADD, G.M. Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance, **J. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 300-311, 1995.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 55, p. 199-203, 2003.

HATTORI, H. Influence of heavy metals on soil microbial activities. **Soil Sci. Plant Nut.**, v. 38, p. 93-100, 1992 .

HEINEMEYER, O.; INSAM, H.; KAISER, E.A.; WALENZIK G.. Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. **Plant Soil**, v. 116, p. 191-195, 1989.

HILL, E.P.; PLESOFKY-VIG, N.; PAULSON, A.; Brambl, R. Respiration and gene expression in germinating ascospores of *Neurospora tetrasperma*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 90, p. 111-116, 1992.

HOLMGREN, A. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 4600-4606, 1977.

- KOEHRLE, J. The trace element selenium and the thyroid gland. **Biochimie**, v. 81, p. 527-533, 1999.
- LEATHAM, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p. 859-867, 1985.
- LEATHAM, G.F.; STAHMANN, M.A. Studies on the laccase of *Lentinula edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. **J. Gen. Microbiol.**, v. 125, p. 147-157, 1981.
- LEE, Y.Y.; LIN, C.M.; CHAMBERS, R.P. Selective hydrolysis of hard wood hemicellulose by acids. **Biotech. Bioeng. Symp.**, v. 8, p. 75-88, 1978.
- LIN, Q.; BROOKES, P.C. An evaluation of the substrate-induced respiration method. **Soil Biol. Biochem.**, v. 31, p. 1969-1983, 1999.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, v. 6, p. 21-33, 1976.
- MARSILI-LIBELLI, S.; TABANI, F. Accuracy analysis of a respirometer for activated sludge dynamic modeling. **Water Res.**, v. 36, n. 5, p. 1181-1192, 2002.
- MATA, G.; SAVOIE, J. M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw, **W. J. Microbiol. Biotech.**, v. 14, p. 513-519, 1998.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analyt. Chem.**, v. 31, n. 13, p. 426-428, 1959.
- NONAVINAKERE, V. K.; PROCTOR, A.S.; BELL, R.R.; MALLORY, Z.Y.; EARLY II, J.L. An acute intratracheal selenium study: Immediate effects on respiration in guinea pigs. **Toxicol. Lett.**, v. 104, p. 231-237, 1999.

- OHGA, S.; ROYSE, D. J. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust, **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 111-115, 2001.
- OHGA, S. Adaptability of *Lentinus edodes* strains to a sawdust-based cultivating procedure, **Mokuzai Gakkaishi**, v. 38, p. 301-309, 1992.
- PALMIERI, G.; BIANCO, C.; CENNAME, G.; GIARDINA, P.; MARINO, G.; MONTI, M.; SANNIA, G. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2574 -2579, 2001.
- RAJAPAKSHA, R.M.C.P.; TOBOR-KAPON, M.A.; BÅÅTH, E. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 5, p. 2966-2973, 2004.
- ROBLES, A.; LUCAS, R. MARTINEZ-CAÑAMERO, M.; OMAR, N.B. PÉREZ, R. GÁLVEZ, A. Characterization of lacase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. **Enzyme Mic. Technol.**, v. 31, p. 516-522, 2002.
- SHEARER, C.A. Fungal competition. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. S1259-S1264, 1995.
- SILVA, E.M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A.M.F. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains, **Process Biochem.**, v. 40, n. 1, p. 161-164, 2005.
- STOLZ, J.F.; OREMLAND, R.S. Bacterial respiration of arsenic selenium. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 615-627, 1999.
- TAN, Y.H.; MOORE, D. Glucose catabolic pathways in *Lentinula edodes* determined with radiorespirometry and enzymic analysis. **Mycol. Res.**, v. 99, p. 859-866, 1995.

- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.**, v. 140, p. 19-26, 1994.
- TOKIMOTO, K.; FUKUDA, M.; KISHIMOTO, H.; KOSHITANI, H. Activities of enzymes in bed logs of *Lentinula edodes* during fruit body development, **Rept. Tottori Mycol. Inst.**, v. 25, p. 24-35, 1987.
- TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores de qualidade dos solos. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R., (Eds). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS, 2002, vol. 2, p.195-276.
- VILLAS-BÔAS, S.G.; ESPOSITO, E; MITCHELL, D.A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 98, p.1-12, 2002.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 325-333, 1981.
- WEST, A.W.; SPARLING, G.P. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents, **J. Microbiol. Methods** , v. 5, p. 177-189, 1986.
- WOOD, D.A. Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 117, p. 339-345, 1980.
- ZELLES, L.; ALEF, K. Biomarkers. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (ed.) **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, London. 1995, p. 422–439.
- ZHANG, C.K.; GONG, F.; LI, D.S. A note on the utilization of spent mushroom compost in animal feed. **Biores. Technol.**, v. 52, p. 89-91, 1995.

CAPÍTULO 3

ENRIQUECIMENTO DE COGUMELO SHIITAKE

(*Lentinula edodes*) COM SELÊNIO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos formadores de cogumelos são importantes nos ecossistemas porque são eficientes na decomposição de substratos ligninocelulósicos sem a necessidade de pré-tratamentos (Ruegger et al., 2001). Esta característica permite a utilização dos resíduos da produção agrícola para o cultivo de cogumelos.

A produtividade do cogumelo depende do substrato empregado no seu cultivo. A natureza química do substrato usado para o cultivo de *Lentinula edodes*, o shiitake, tem notável influência na produção dos cogumelos (Ohga, 1992; Shearer, 1995). O cogumelo shiitake é cultivado tradicionalmente em toras de madeira, porém, ultimamente têm sido utilizadas toras artificiais à base de serragem de madeira como alternativa para produção em menor tempo e em substratos mais definidos. Este sistema é baseado em um suporte ligninocelulósico suplementado com farelo de cereais como fonte de nutrientes, principalmente o nitrogênio (Cavallazzi, 2004).

O selênio (Se), classificado como um metalóide, é elemento traço essencial ao homem (Wu, 2004). Pelo menos quinze diferentes selenoproteínas e, ou selenoenzimas já foram encontradas (Birringer et al., 2002). Esse elemento tem numerosas funções fisiológicas, mas é melhor reconhecido como cofator para o sistema da enzima glutathione peroxidase, responsável pela remoção de radicais livres reduzindo, assim, os danos oxidativos à célula (Werner e Beelman, 2002). Em razão deste efeito antioxidante, o Se tem sido associado com a cura de várias doenças crônicas degenerativas, inclusive vários tipos de câncer (Clark et al., 1996; Spolar et al., 1999) e a manutenção da fertilidade (Rayman, 2000).

A forma química do Se ingerido é um importante fator que determina sua toxicidade, importância nutricional e fator metabólico (Shiobara et al., 1998). Vários alimentos, cosméticos e suplementos fortificados com Se já estão disponibilizados no mercado (Reilly, 1998). Selenometionina (SeMet), na forma de tabletes

suplementados com vitamina E, tem sido clinicamente aplicada no tratamento de artrite reumatóide em humanos (Aaseth et al., 1998). O enriquecimento de alimentos com Se pode reduzir a incidência de várias doenças e proporcionar maior resistência às infecções em indivíduos de todas as idades (Ferreira, 1999).

Os microrganismos podem incorporar oxiânions de Se inorgânico em seus tecidos por redução assimilatória, como nas selenocisteínas (Stolz e Oremland, 1999). Brady et al. (1996) sugeriram que microrganismos podem transformar metalóide como o Se, por oxidação, redução, metilação e dealquilação. Esses autores afirmaram ainda que os processos de transformação têm significância biogeoquímica, visto que modificam a mobilidade e toxicidade dos metalóides e possuem também um potencial biotecnológico na biorremediação.

Os cogumelos são conhecidos por acumular Se em seu ambiente de crescimento (Reilly, 1996). Em particular, a espécie *L. edodes* (Ogra, 2004) e os corpos de frutificação de muitas espécies de cogumelos contêm metalóides como potássio (K), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) ou Se (Falandysz et al., 2001). Isso sugere que os fungos possuem mecanismos efetivos que os capacitam absorver alguns elementos traços do substrato de crescimento (Lepsova e Mejstrik, 1998). A concentração desses elementos depende da fisiologia da espécie e do ecossistema em que vivem (Lepsova e Mejstrik, 1998).

O enriquecimento de cogumelos, como o *Agaricus bisporus*, com Se, tem sido uma estratégia adotada para fornecimento desse elemento na dieta humana (Spolar et al., 1998; Werner e Beelman, 2001; Werner e Beelman, 2002). Considerando que os solos brasileiros são pobres em Se e, conseqüentemente, a alimentação básica do brasileiro tem deficiência desse elemento (Ferreira, 1995), o enriquecimento do cogumelo shiitake com esse elemento pode ser uma alternativa para o enriquecimento nutricional. Diante do exposto, objetivou-se enriquecer cogumelos shiitake com Se, para que o consumo desses possa suprir parte da ingestão diária recomendada desse elemento ou reduzir a carência de Se em pessoas com deficiência desse elemento ou ainda, ser utilizado no tratamento de muitas doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa – UFV, em Viçosa – Minas Gerais.

2.1. Isolados e inóculo

Foram utilizados os isolados UFV16 e UFV52 de *L. edodes* (Berk.) Pegler pertencentes à coleção do Departamento de Microbiologia da UFV para avaliação do potencial de absorção de Se pelo fungo e, conseqüente enriquecimento dos cogumelos com esse elemento. O isolado UFV52 foi utilizado em substituição aos isolados UFV11 e UFV53 que foram selecionados para continuidade do estudo, porém, não apresentaram frutificação. Além disso, o isolado UFV52 é produzido em escala comercial.

Os isolados foram inoculados utilizando-se três discos de ágar de 8 mm de diâmetro contendo micélio retirado das bordas das colônias das culturas cultivadas em BDA, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL de ágar batata dextrose (BDA) - MERCK®, e incubados a 25 °C por 15 dias, para reativar as culturas.

Após este período, preparou-se substrato à base de serragem de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), contendo 78 % de serragem, 20 % de farelo de arroz, 0,4 % de CaCO₃ e 1,6 % de CaSO₄, umedecido a 65 % com água de torneira e acondicionou-se em frascos com tampa metálica contendo um furo coberto com fita crepe, para troca gasosa. Os frascos com o substrato, foram autoclavados por 60 minutos a 121 °C e, após resfriamento, inocularam-se os isolados do fungo em condições assépticas, com oito discos de ágar de 8 mm de diâmetro contendo micélio retirado das bordas das colônias crescidas em BDA e incubou-se a 25 °C com três horas de luz ao dia, durante 30 dias.

2.2. Enriquecimento de cogumelo shiitake com Se

Para o cultivo do fungo *L. edodes* para a produção de cogumelos foi utilizado o mesmo substrato à base de serragem de eucalipto descrito acima. Cerca de 700 g

do substrato foram acondicionadas em sacos de polipropileno, fechados com papel com o auxílio de dois anéis de PVC concêntricos. Os sacos foram autoclavados por 120 minutos a 121 °C e inoculados com 30 g do inóculo, em condições assépticas. A incubação foi a 25 °C com três horas de luz ao dia por aproximadamente 90 dias. Aos 45 dias de crescimento do fungo, foram feitos 25 cortes de aproximadamente 5 mm, com bisturi, em toda a extensão dos sacos, para troca gasosa. Esse procedimento foi repetido após 15 dias. Quando o substrato tornou-se marrom, os sacos foram removidos e as toras artificiais submetidas a choque frio em água a $15\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ contendo soluções de selenito de sódio (Na_2SeO_3) nas concentrações de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L^{-1} , por 24 horas, para indução da frutificação. No tratamento controle não foi adicionado Se à água do choque. Após o choque, as toras artificiais foram mantidas em uma sala com temperatura de 23 °C e umidade de 85 % até a frutificação dos cogumelos. Os cogumelos foram colhidos aproximadamente, cinco dias após a indução da frutificação, quando rompeu o véu e as lâminas estavam completamente expostas. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3. Análises físico-químicas do substrato ligninocelulósico e da água de umidificação desse substrato

O teor de umidade do substrato ligninocelulósico foi determinado colocando-se amostras em estufa com circulação forçada de ar, a 105 °C por 48 horas. Foram também determinados, o pH em potenciômetro (DM 20 Digimed), a atividade de água - a_w em analisador automático (Aqualab, Decagon, Inc.) e a concentração de Se, por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (EEA-PI) (Optima 3300 Perkin Elmer), após digestão nítrico-perclórica de 0,5 g da amostra desidratada e moída em moinho tipo Wiley modelo EDB-5, de acordo com Bataglia et al. (1983).

A determinação de Se da água utilizada para o preparo do substrato foi feita em 0,5 mL de amostra, utilizando-se o mesmo procedimento para o substrato ligninocelulósico, em EEA-PI (Optima 3300 Perkin Elmer).

2.4. Análises físico-químicas do cogumelo

Logo após a colheita, os cogumelos foram contados e pesados para o cálculo da eficiência biológica, os diâmetros dos píleos e das hastes foram medidos e foi

realizada a determinação da cor. O material foi desidratado para a determinação da umidade, proteínas solúveis, cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), K, Se e massa seca para o cálculo da produtividade. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4.1. Tamanho

O diâmetro do píleo e o diâmetro e comprimento da haste dos cogumelos foram medidos com paquímetro, em duas posições representativas de suas margens.

2.4.2. Cor

A medida da cor superficial dos cogumelos de todos os tratamentos foi determinada pela leitura direta de reflectância das coordenadas L^* , a^* , b^* , empregando a escala Hunter Lab, em equipamento ColorQuest II Sphere (HunterLab, Reston, VA). O sistema Hunter Lab é um sistema de coordenadas retangulares que define a cor em termos de luminosidade (L), vermelho versus verde (a) e amarelo versus azul (b).

2.4.3. Umidade

A umidade dos cogumelos foi determinada em estufa com circulação de ar forçada a 80 °C até peso constante.

2.4.4. Proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis foi determinado pelo método Bradford (Bradford, 1976).

2.4.5. Minerais e selênio

O teor de Ca, Mg, P e do Se foi determinado por EEA-PI (Optima 3300 Perkin Elmer) após digestão nítrico-perclórica (Mattila et al., 2001). O K foi determinado por fotometria de chama no mesmo extrato (Bataglia et al., 1983).

2.5. Produtividade

A produtividade (P) foi calculada, em cada tratamento, a partir da massa seca dos cogumelos e a massa seca do substrato ligninocelulósico, pela seguinte fórmula:

$$P = \text{massa seca dos cogumelos} / \text{massa seca do substrato ligninocelulósico} \times 100$$

2.6. Eficiência biológica

A eficiência biológica (EB) foi calculada, em cada tratamento, a partir da massa dos cogumelos frescos e a massa seca do substrato ligninocelulósico por meio da relação (Chang et al., 1981):

$$EB = \text{massa dos cogumelos frescos} / \text{massa seca do substrato ligninocelulósico} \times 100$$

2.7. Análise estatística

Adotou-se o delineamento em fatorial com 2 isolados (UFV16 e UFV52) e 5 níveis de concentração de Se em três repetições. Os dados foram analisados, estatisticamente, por análises de variância e de regressão, utilizando-se o programa estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois isolados do fungo *L. edodes* avaliados apresentaram padrão de crescimento semelhante durante a colonização do substrato ligninocelulósico e o substrato só foi completamente colonizado pelo fungo no 45º dia de crescimento em todos os tratamentos com Se e no controle.

3.1. Análises físico-químicas do substrato ligninocelulósico e da água de umidificação desse substrato

O teor de umidade do substrato ligninocelulósico, após esterilização em autoclave foi de 41 %, o pH de 4,6 e a atividade de água (a_w) de 0,988. Pela metodologia utilizada não foi possível detectar o Se no substrato ligninocelulósico e nem na água utilizada para umedecer o substrato.

3.2. Análises físico-químicas do cogumelo

Observou-se que o diâmetro do píleo, o comprimento e o diâmetro da haste dos cogumelos não variaram ($p \geq 0,05$) entre os cogumelos dos diferentes tratamentos com Se e nem entre os isolados. O diâmetro médio do píleo dos cogumelos produzidos pelo isolado UFV16 foi de 4,75 cm, sendo o comprimento e o diâmetro médio das hastes de 2,42 cm e 0,82 cm, respectivamente. Os cogumelos produzidos pelo isolado UFV52 apresentaram píleo com diâmetro médio de 4,51 cm e o comprimento e o diâmetro das hastes foram, 2,09 cm e 0,88 cm, respectivamente. Estes dados contrastam com os obtidos com o cogumelo *Pleurotus cornucopiae*, que teve o tamanho do cogumelo alterado conforme a composição do substrato e com o número da colheita, ou seja, se primeira ou segunda (Royse, 2002; Royse et al., 2004).

Foi observado que nos cogumelos produzidos nas toras tratadas com as maiores concentrações de Se ($0,32 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,64 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio), o véu demorou mais para romper do que os submetidos ao choque frio apenas com água ou com água adicionada de $0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,16 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio. Este resultado permite sugerir que o Se em doses mais elevadas retarda a frutificação

de cogumelos. Não houve frutificação de nenhum dos isolados tratados com as concentrações de 0,96 mmol L⁻¹ e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio. Por esta razão, optou-se por continuar os experimentos usando-se concentrações mais baixas desse elemento adicionada na água usada para o choque frio.

Os resultados mostraram que os cogumelos enriquecidos com Se cultivados em toras artificiais apresentaram valores de L, a e b referentes à cor, inferiores ($p < 0,05$) nos tratamentos em que se adicionou selenito de sódio em relação ao controle (Figura 1). Menores valores de L, indicam escurecimento, embora, visualmente nenhuma mudança de cor tenha sido observada. No entanto, essa variável não foi influenciada pelo isolado. Este efeito do selenito de sódio sobre a cor do shiitake difere dos resultados obtidos com o *A. bisporus* enriquecidos com selenito de sódio por Spolar et al. (1998) e Werner e Beelman (2001) que verificaram que os cogumelos não apresentaram diferenças significativas do valor L quando se comparou ao tratamento controle, sem adição de Se.

O teor de umidade dos cogumelos variou de 89 % a 91% em todos os tratamentos avaliados e, um aumento significativo de umidade foi constatado na maior concentração (0,64 mmol L⁻¹) de selenito de sódio ($p < 0,05$) demonstrando um efeito do selênio sobre esta variável. O teor de umidade dos cogumelos não variou entre os isolados ($p \geq 0,05$).

Os resultados de umidade dos cogumelos encontrados no presente estudo foram em torno de 90 % e se assemelham aos apresentados por Manzi et al. (2001), que foram cerca de 92,8 % para o cogumelo *A. bisporus* e 91,34 % para o *Pleurotus ostreatus*. Manzi et al. (2004) encontraram em cogumelos comerciais do gênero *Boletus*, valores de umidade variando de 86,6 % a 87,4 %. Esses autores relataram que o teor de umidade para outros cogumelos varia de 88,2 % a 94,1 %.

O teor de proteínas solúveis não foi afetado pela presença de Se e nem variou com o isolado ($p \geq 0,05$). Os valores de proteínas solúveis de 22,3 mg.g⁻¹ de massa seca encontrados foram próximos ao valor de 22,8 mg relatado por Longvah e Deosthale (1998) para *L. edodes*. Manzi et al. (2001) observaram que os valores de proteínas para os cogumelos *A. bisporus* e *P. ostreatus* variaram de 16,3 mg.g⁻¹ e 16,1 mg.g⁻¹ de massa seca, respectivamente.

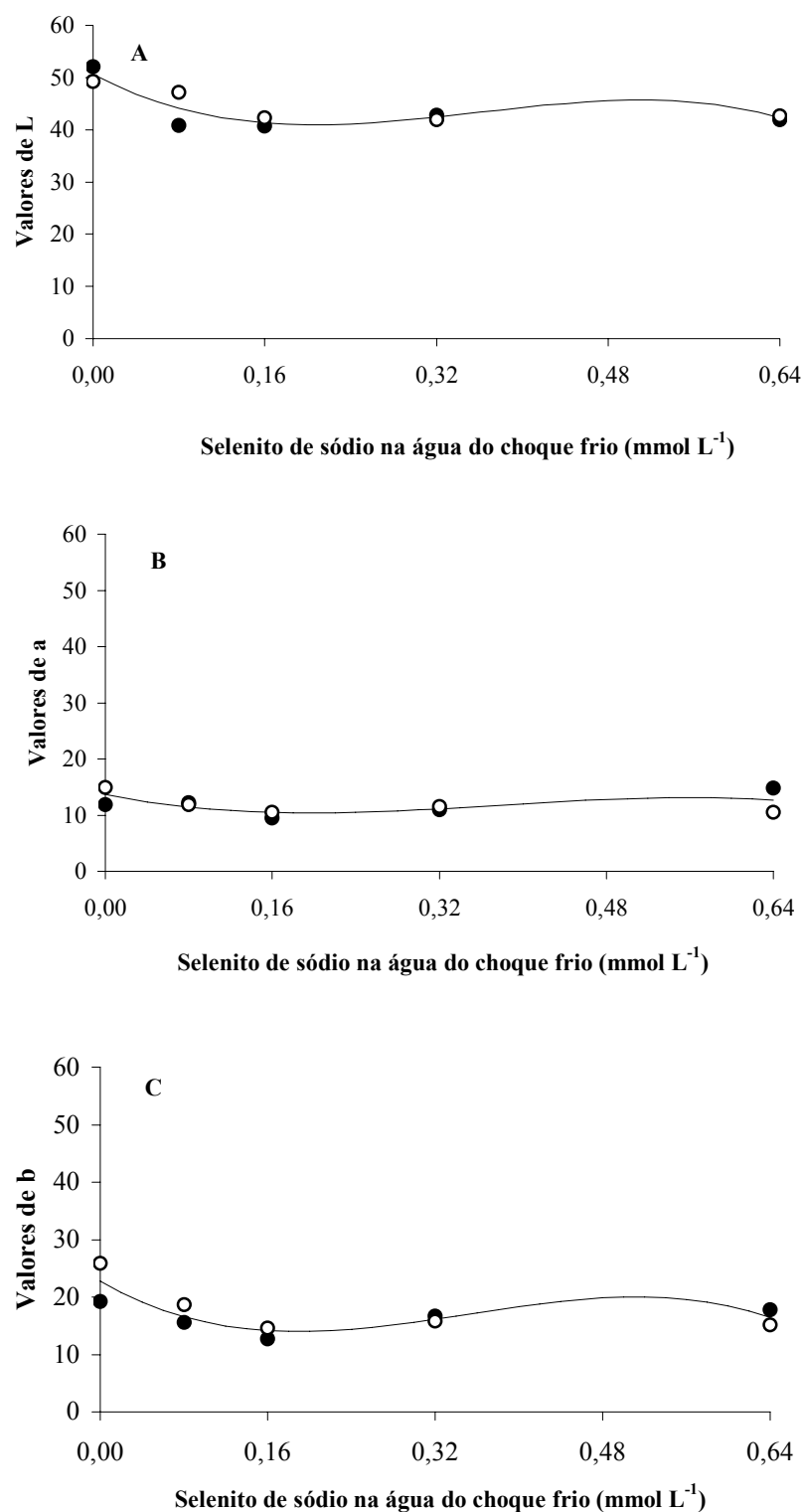


Figura 1 – Valores de L (A), a (B) e b (C) referentes à cor dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados ● UFV16 e ○ UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio

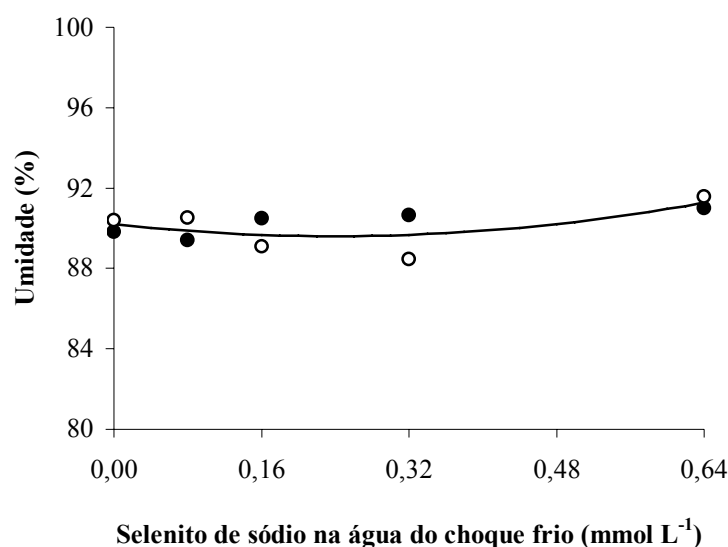


Figura 2 – Teor de umidade dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados ● UFV16 e ○ UFV52, em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio

Dos minerais avaliados, apenas a concentração de Ca não variou entre os isolados e nem com a presença de Se ($p \geq 0,05$) nos tratamentos avaliados, incluindo o controle. Resultados diferentes foram encontrados por Bento (2001) que registrou uma grande variação no conteúdo em Ca entre diferentes estirpes de cogumelos shiitake produzidos em toras artificiais e naturais, com valores entre $3,92 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $958,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Mattila et al. (2001) encontraram valores de Ca de $13 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $25 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de massa seca nas duas estirpes de *A. bisporus*, enquanto que para as espécies *P. ostreatus* e *L. edodes* esses valores de Ca foram de $0,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de massa seca, respectivamente. Por outro lado, Manzi et al. (1999a) observaram teores de Ca de $42,3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa seca e Longvah e Deosthale (1998) de $127 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa seca em espécies de cogumelos *L. edodes*.

Os teores de Mg foram influenciados pela adição de selenito de sódio ($p < 0,05$) porém, não variou entre os isolados ($p \geq 0,05$) e mostraram uma tendência a aumentar conforme se aumentou a dose de Se em ambos os isolados (Figura 3). Os cogumelos dos isolados UFV16 e UFV52, do tratamento controle, apresentaram valores de $142 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $184 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de massa seca, respectivamente. Estes valores foram próximos aos encontrados por Mattila et al. (2001) e Longvah e

Deosthale (1998) que verificaram um teor de 155 mg.100 g⁻¹ e 200 mg.100 g⁻¹ de massa seca, respectivamente, em cogumelos *L. edodes*, e superiores ao valor de 116,5 mg.100 g⁻¹ de massa seca verificado por Manzi et al. (1999b), para a mesma espécie de cogumelo.

O selenito de sódio adicionado ao substrato, influenciou ($p < 0,05$) o conteúdo de P nos isolados estudados, porém o teor desse elemento não variou entre os isolados ($p \geq 0,05$) que apresentaram na dose 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio valores de 1023 mg.100 g⁻¹ e 920 mg.100 g⁻¹ de massa seca para os isolados UFV16 e UFV52, respectivamente (Figura 3). Os valores de P nos cogumelos dos tratamentos controle variaram de 641 a 842 mg/100 g de massa seca, nos isolados estudados. Longvah e Deosthale (1998) observaram teor de P em cogumelos *L. edodes* na faixa de 493 mg/100 g de massa seca, enquanto Bento (2001) encontrou um valor desse elemento em torno de 3822 mg/100 g de massa seca em cogumelos dessa mesma espécie.

O teor de K variou ($p < 0,05$) de 830 mg.100 g⁻¹ a 1940 mg.100 g⁻¹ de massa seca entre os isolados e com a adição de selenito de sódio e tendeu a diminuir à medida que se aumentou a dose de selenito de sódio (Figura 3). Estes resultados indicam que o teor de K em cogumelos shiitake enriquecidos com Se é alto. Resultados semelhantes foram encontrados por Bento (2001) que observaram um teor de K de 979 mg.100 g⁻¹ de massa seca em *L. edodes* cultivados no mesmo substrato sem adição de Se. Por sua vez, Manzi et al. (1999b) e Mattila et al. (2001) verificaram teores de K em *L. edodes* de 2647 mg.100 g⁻¹ e 2270 mg.100 g⁻¹ de massa seca, respectivamente, valores considerados altos pelos autores. Esses resultados também foram semelhantes aos relatados por Aletor e Aladetimi (1989) que afirmaram que a concentração de K em cogumelos shiitake é superior ao encontrado em feijão. Aletor (1995) encontrou o valor de K de 1.600 mg.100 g⁻¹ de massa seca em cogumelos da espécie *Lentinus subnudus*.

Os altos valores de minerais em cogumelos comestíveis indicam o potencial para seu uso como uma fonte alimentar de boa qualidade (Aletor, 1995) e a concentração de minerais, principalmente K, nitrogênio (N), sódio (Na) e ferro (Fe) em alguns cogumelos são altos (Aletor e Aladetimi, 1989). A alta correlação entre pares de elementos indica que eles podem ter uma relação forte e proporcional, onde a presença de um elemento pode facilitar ou dificultar a absorção de outro.

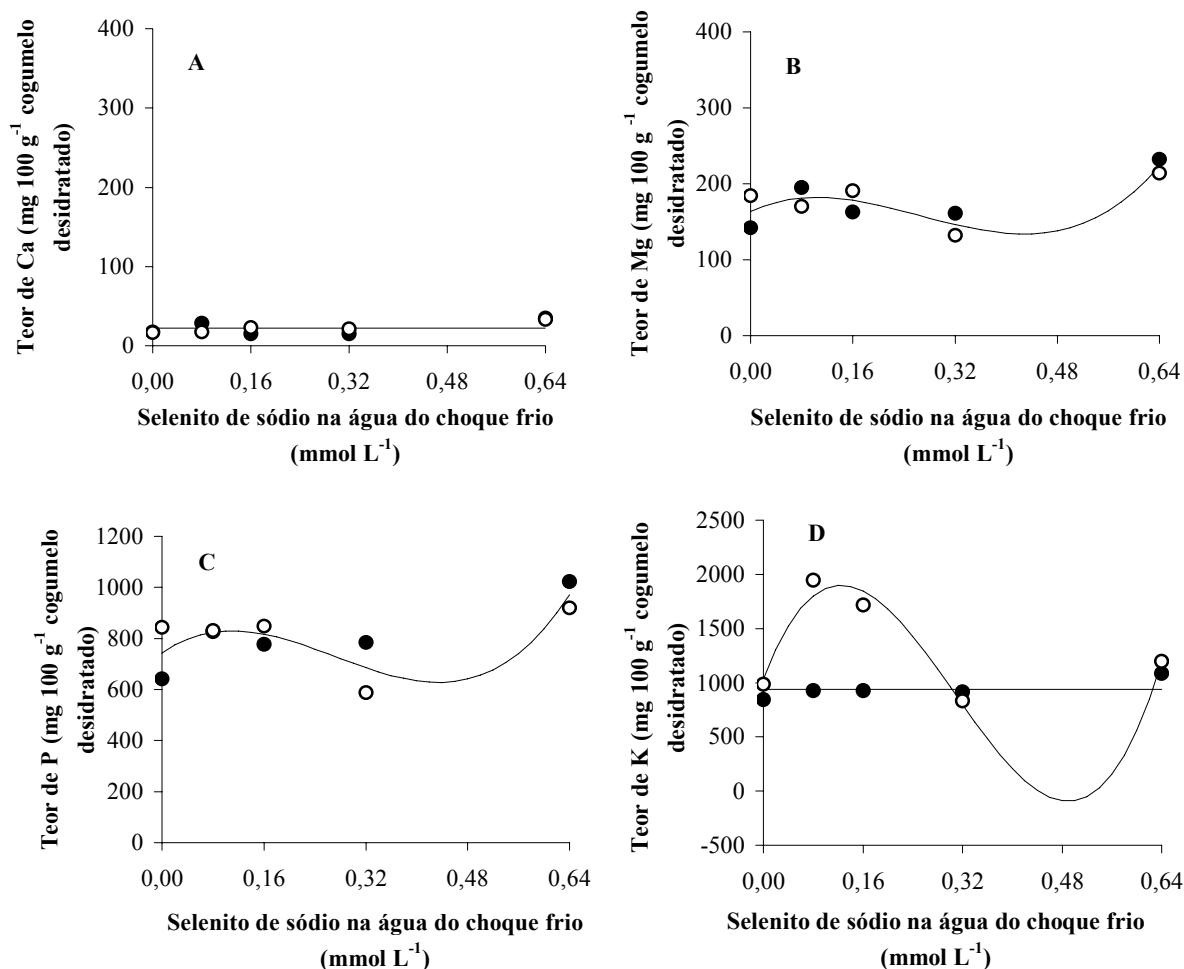


Figura 3 – Teor de Ca (A), Mg (B), P (C) e K (D) dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados ● UFV16 e ○ UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio

Os resultados do experimento revelaram que os valores de Se nos cogumelos enriquecidos com esse elemento aumentaram linearmente com o aumento da dose de selenito de sódio adicionado à água do choque frio e, valores de Se superiores a 17 mg.100 g⁻¹ foram encontrados nos cogumelos tratados com 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio (Figura 4). Os teores de Se nas concentrações 0,08; 0,16 e 0,32 mmol L⁻¹ de selenito de sódio, foram 1,0 mg.100 g⁻¹; 3,0 mg.100 g⁻¹ e 5,0 mg.100 g⁻¹ de massa seca, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Spolar et al. (1998) e Werner e Beelman (2002) que verificaram que a adição de selenito de sódio na água

de irrigação dos cogumelos *A. bisporus* causou um aumento de Se nesses cogumelos e o grau de acúmulo foi diretamente dependente da concentração de selenito de sódio adicionada. Ogra et al. (2004), analisando o cogumelo shiitake enriquecido com Se na forma de selenito de sódio, observaram que o conteúdo de Se dos cogumelos shiitake liofilizados foi $355,7 \mu\text{g Se g}^{-1}$ de cogumelo desidratado. Para Werner e Beelman (2002), a adição de dose elevada de Se ($197,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) apresentou concentrações acima de 1300 mg.kg^{-1} desse elemento nos cogumelo.

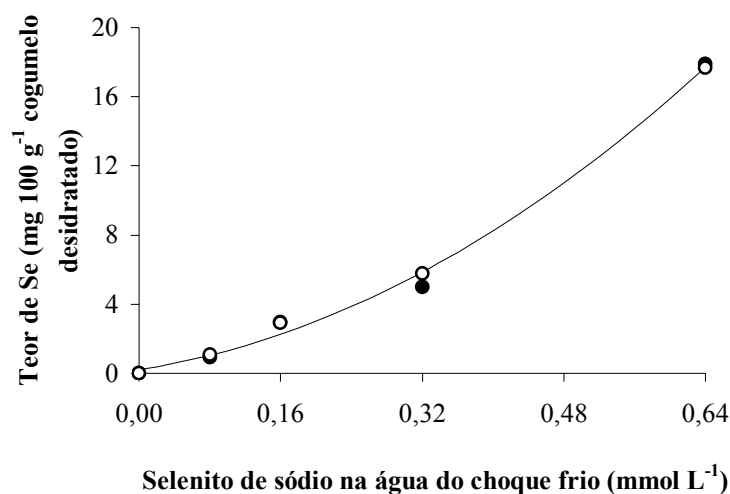


Figura 4 – Teor de selênio dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados ● UFV16 e ○ UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio

Nos cogumelos do tratamento controle, não foi detectada a presença de Se. Esse resultado está em concordância com Spolar et al. (1998) e Werner e Beelman (2002) que enriqueceram cogumelos *A. bisporus* com Se e observaram que o tratamento controle, sem adição de Se, mostrou valores desprezíveis desse elemento. Mattila et al. (2001) encontraram teor de Se no cogumelo shiitake não enriquecido em torno de $3,9 \mu\text{g.100 g}^{-1}$ de cogumelo seco, valores considerados baixos pelos autores. Porém, Werner e Beelman (2001) enriqueceram o cogumelo *A. bisporus* e observaram valores expressivos de Se no controle, provavelmente devido à presença desse elemento no substrato. O substrato utilizado para o cultivo do cogumelo *A. bisporus* é à base de bagaço de cana-de-açúcar, capim ou feno, diferente do substrato

utilizado para o cultivo do cogumelo shiitake. Os teores de Se encontrados nos cogumelos produzidos pelos dois isolados avaliados foram idênticos, significando que não houve influência do isolado ($p \geq 0,05$) na absorção desse elemento (Figura 4). Kalac e Svoboda (2000) encontraram valores de Se em cogumelos comestíveis variando de 1 a 2 mg.100 g⁻¹ de matéria seca, embora outros autores afirmam que os valores de Se em cogumelos variam de 0,1 mg.100 g⁻¹ a 0,5 mg.100 g⁻¹ de matéria seca (Piepponen et al., 1990). Mattila et al. (2001) afirmaram que os valores de Se em cogumelos do gênero *Agaricus* são altos e estão entre 0,32 mg.100 g⁻¹ e 0,14 mg.100 g⁻¹ de massa seca, nas variedades marrom e branca, respectivamente. Porém, o cogumelo *P. ostreatus* apresentou um conteúdo de Se 20 vezes menor do que o *Agaricus* e o *L. edodes* apresentou valores mais inferiores chegando à cerca de 80 vezes menos que o *Agaricus* (Mattila et al., 2001).

Os teores de Se, em torno de 17 mg.100 g⁻¹ de cogumelo desidratado, encontrados nos cogumelos shiitake enriquecidos com a concentração 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio, correspondem a 309 % da RDA (Recommended Dietary Allowances), para uma mulher e um homem adultos. O consumo de 4 g de cogumelos fresco supre as necessidades diárias desse elemento indicando que o cogumelo shiitake enriquecido com Se pode ser considerado uma excelente fonte desse elemento. De fato, Werner e Beelman (2001) afirmaram que para ser excelente fonte de um elemento, o alimento tem que suprir acima de 20 % da RDA. Esses autores encontraram em cogumelos *A. bisporus* cultivados em composto adicionado de 1,8 mg.kg⁻¹ de Se um conteúdo médio de Se de 126 % da RDA com uma variação de 100 % a 145 %, enquanto que o controle apresentou uma concentração natural de Se equivalente a 12,4 % de RDA com uma variação de 10 % a 14,8 %.

Os resultados obtidos demonstram que o fungo *L. edodes* é um bom acumulador de Se e os cogumelos shiitake enriquecidos com esse elemento podem ser usados como alimento com alegação de propriedade funcional ou como alimento com alegação de propriedade de saúde. O cogumelo shiitake pode ser utilizado também para o enriquecimento de minerais, como o fósforo (Queiroz, 2004).

3.3. Produtividade

A produtividade dos cogumelos shiitake enriquecidos com Se variou significativamente ($p < 0,05$) com a adição de selenito de sódio, porém, não foi observada nenhuma diferença quando se comparou os isolados avaliados ($p \geq 0,05$).

Os cogumelos shiitake enriquecidos com Se apresentaram aumento na produtividade até a concentração $0,32 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio, tendo havido diminuição dessa característica na concentração $0,64 \text{ mmol L}^{-1}$ de selenito de sódio. Este resultado pode indicar que, a partir dessa dose o Se é tóxico ao fungo *L. edodes* (Figura 6). Spolar (1997) citado por Spolar et al. (1998) também demonstrou que concentrações elevadas de Se adicionadas ao composto podem diminuir a produção de cogumelos *A. bisporus*. Entretanto, em concentrações baixas de selenito de sódio, os cogumelos *A. bisporus* têm a capacidade de crescer sem efeitos negativos à qualidade e à produtividade (Spolar, 1998; Hartman, 2000).

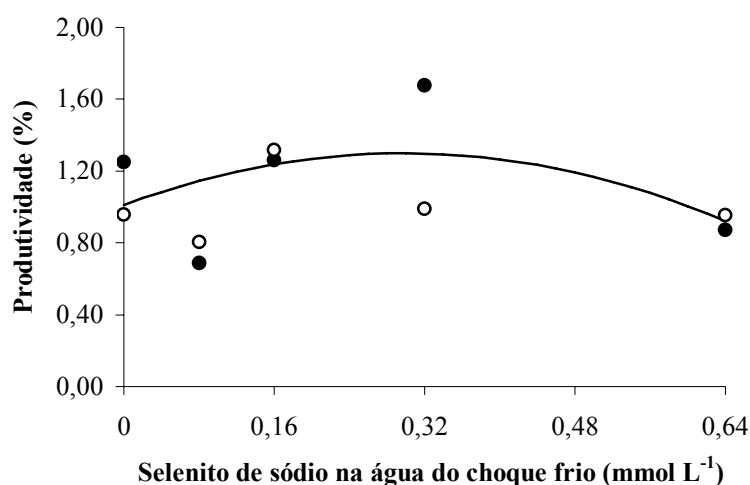


Figura 5 – Produtividade dos cogumelos shiitake produzidos pelos isolados ●UFV16 e ○UFV52 em toras artificiais imersas em diferentes concentrações de selenito de sódio

A produtividade baixa, em torno de 1 %, do cogumelo shiitake obtida neste experimento, inclusive nos substratos não enriquecidos com Se não foi devida ao selênio, já que houve aumento da produtividade nas menores doses de selenito de sódio pesquisadas. Esta baixa produtividade pode estar relacionada ao fato de que se

trabalhou apenas com um fluxo de colheita, tendo sido dado apenas um choque para induzir a frutificação. Geralmente, a produção de shiitake pode ser feita em até quatro colheitas, com boa produtividade. Queiroz et al. (2004) observaram um aumento da produtividade dos cogumelos shiitake após o primeiro e o segundo fluxo de colheita e a maior produtividade foi encontrada no quarto fluxo. Para os autores, o primeiro fluxo de colheita a produtividade dos cogumelos foi desprezível. Os autores afirmaram que a suplementação com fonte de fósforo e nitrogênio tem efeito positivo na produtividade dos cogumelos. Werner e Beelman (2002) avaliando o crescimento de *A. bisporus* em substratos com adição de Se, encontraram que o aumento da concentração de selenito de sódio (30,1; 82,5 e 197,1 mg.kg⁻¹) no substrato de crescimento do fungo, provocou uma diminuição linear na produção dos corpos de frutificação dos cogumelos à medida que se aumentou a dose desse elemento. Esses autores sugerem que a adição de doses altas de Se ao cogumelo podem originar produtos que poderiam ser usados em dietas suplementares ou como um ingrediente para a formulação de alimentos de propriedades nutricêuticas e, para compensar a baixa produtividade pelo efeito tóxico do Se no desenvolvimento de cogumelos, esse produto necessitaria ser comercializado por um preço mais elevado.

3.4. Eficiência biológica

A conversão da percentagem de massa seca para massa fresca de cogumelo é chamada de eficiência biológica (EB). A Tabela 1 apresenta os resultados da eficiência biológica para os isolados estudados. O isolado UFV16 mostrou uma maior EB em doses mais elevadas de Se, enquanto que o isolado UFV52 não apresentou melhorias na EB pelo aumento de doses de Se. Ruegger et al. (2001) encontraram uma EB de 55,66 % ± 20,41 % em cogumelos *Oudemansiella canarri* (Jungh.) cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e suplementado com 50 g de farelo de trigo. Royse (2002) avaliando o cogumelo comercial *Pleurotus cornucopiae*, encontrou EB de 81,7 % na primeira colheita e de 92,2 % na segunda colheita quando utilizou 5 % de inóculo, enquanto que nos tratamentos que receberam apenas 1,25 % de inóculo a EB ficou pouco acima de 50 %. A EB do fungo *P. cornucopiae* formador de cogumelo que cresceu em substrato acrescido de 6 % de suplemento com produto comercial (Campbell's S-41), foi de 61,7 % e 80,6 % na primeira e na

segunda colheita, respectivamente, valores superiores aos tratamentos que não receberam suplemento (Royse et al., 2004) mostrando que a EB é influenciada pela composição do meio de cultivo de fungos formadores de cogumelos.

Tabela 1 – Eficiência Biológica de cogumelos shiitake enriquecidos com Se, produzidos pelos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais imersas em 0,08; 0,16; 0,32; e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem Se

Concentração de selênio	Eficiência Biológica (%)	
	UFV16	UFV52
Controle	12,27	9,97
0,08 mmol L ⁻¹	6,48	13,32
0,16 mmol L ⁻¹	13,25	12,06
0,32 mmol L ⁻¹	17,92	8,58
0,64 mmol L ⁻¹	11,31	11,31

4. CONCLUSÕES

O padrão de crescimento do fungo *L. edodes* foi uniforme nas diferentes concentrações de Se avaliadas. A produção de cogumelos teve influência positiva com a presença de Se, apresentando-se redução na produtividade apenas na dose 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio o que leva a se supor que essa dose tem efeito negativo na produção do cogumelo estudado.

A produtividade foi baixa, porém, não se pode relacionar com a presença de Se, já que o controle apresentou baixos valores de produtividade e essa produtividade aumentou com a dose de Se, sendo verificado efeito negativo apenas na última dose.

Os dois isolados avaliados apresentaram comportamento semelhante em todas as variáveis testadas, com exceção do teor de potássio, que foi diferente para os dois isolados, demonstrando que esses isolados não interferiram nestas características.

O cogumelo shiitake pode ser enriquecido com Se pela adição desse elemento na água utilizada para o choque frio aplicado nas toras artificiais, para indução da formação do corpo de frutificação dos cogumelos.

Os cogumelos shiitake enriquecidos com Se, podem ser considerados excelente fonte desse elemento e podem ser utilizados como alimento com alegação de propriedade funcional ou ainda ser utilizado como alimento com alegação de propriedade de saúde na fórmula de cápsulas ou tabletes já que a forma de Se absorvida pelos cogumelos shiitake é biodisponível ao organismo humano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALETOR, V.A. Compositional studies on edible tropical species of mushroom. **Food Chem.**, v. 54, p. 265-268, 1995.
- ALETOR, V.A.; ALADETIMI, O.O. Compositional evaluation of some cowpea varieties and under-utilized edible legumes in Nigeria. **Die Nahrung**, v. 33, n. 10, p. 999-1007, 1989.
- AASETH, J.; HAUGEN, M.; FORRE, O. Rheumatoid arthritis and metal compounds--perspectives on the role of oxygen radical detoxication. (Rev.) **Analyst**. v. 123, p. 3-6, 1998.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. Métodos de análise química de plantas. Campinas, Instituto Agrônômico, 1983. 48p. (Boletim técnico, 78)
- BENTO, K.B.P. **Atividade antimicrobiana e composição mineral do cogumelo shiitake produzido em diferentes substratos**. 2001. 37f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- BIRINGER, M.; PILAWA, S.; FLOHE, L. Trends in selenium biochemistry. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 693-718, 2002.
- 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. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRADY, J.M.; TOBIN, J.T.; GADD, G.M. Volatilization of selenite in an aqueous medium by a *Penicillium* species. **Mycol. Res.**, v. 100, p. 955-961, 1996.

- CAVALLAZZI, J.R.P.; BRITO, M.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; VILLAS-BÔAS, S.G.; KASUYA, M.C.M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium, **Food, Agric. Environ.**, v. 2, n. 1, p. 291-297, 2004.
- CHANG, S. T.; LAU, O. W.; CHO, K. Y. The cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on wood logs. **Ind. Phytopath.**, v. 35, p. 291-292, 1981.
- CLARK, L.C.; COMBS, G.F.; TURNBULL, B. W.; STATE, E.H.; CHALKER, D.K.; CHOW, J.; DAVIS, L.S.; GLOVER, R.A.; GRAHAM, G.F.; GROSS, E.G.; KRONRAD, A.; LESHER, J.L.; PARK, H.K.; SANDERS, B.B.; SMITH, C.L.; TAYLOR, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 276, p. 1957-1963, 1996.
- FALANDYSZ, J.; SZYMCZYK, K.; ICHIHASHI, H.; BIELAWSKI, L.; GUCIA, M.; FRANKOWSKA, A.; FRANKOWSKA, A.; YAMASAKI, S. ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. **Food Addit. Contam.**, v. 18, p. 503-513, 2001.
- FERREIRA, K.S. **Quantificação e Avaliação dos Teores de Minerais em Alimentos e em Dietas Utilizados no Brasil.** 1999. 136f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- FERREIRA, K.S. **A desnutrição mineral na dieta básica brasileira.** 1995. 185f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.
- HARTMAN S.C.; BEELMAN R.B.; SIMONS, S. Calcium and selenium enrichment during cultivation improves the postharvest quality and shelf life of *Agaricus* mushroom, **Mush. Sci.** v. XV, p. 499-505, 2000.

- KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.*, v. 69, n. 3, p. 273-281, 2000.
- LEPSOVA, A.; MEJSTRIK, V. Accumulation of trace elements in fruiting bodies of macrofungi in the Krusne Hory Mountains, Czechoslovakia, **Sci. Total Environ.**, v. 76, p. 117-128, 1998.
- LONGVAH, T.; DEOSTHALE, Y. G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. **Food Chem.**, v. 63, p. 331-334, 1998.
- MANZI, P.; MARCONI, S.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chem.**, v. 84, n. 2, p. 201-206, 2004.
- MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chem.**, v. 73, p. 321-325, 2001.
- MANZI, P.; AGUZZI, A.; VIVANTI, V.; PACI, M.; PIZZOFERRATO, L. Mushrooms as a source of functional ingredients. In: Euro. Food Chem. X European conference on: functional foods. **A new challenge for the food chemist**, v. 1, p. 86-93, 1999a.
- MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms an inter-species comparative study. **Food Chem.**, v. 66, p. 477-482, 1999b.
- MATTLA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J.M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

- OGRA, Y.; ISHIWATA, K.; ENCINAR, J.R.; LOBIŃSKI, R.; SUZUKI, K.T. Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 379, n. 5-6, p. 861-866, 2004.
- OHGA, S. Adaptability of *Lentinus edodes* strains to a sawdust-based cultivating procedure. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 38, p. 301-309, 1992.
- PIEPPONEN, S.; PELLINEN, M.J.; HATTULA, T. The selenium of mushrooms In: BRATLER, P.; SCHRAMEL, P. (Eds) **Trace elem. Anal.. Chem. Med. Biol.**, vol. 3: Publisher: Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany, 1990.
- QUEIROZ, E.C.; MARINO, R.H.; EIRA, A.F. Mineral supplementation and productivity of the shiitake mushroom on eucalyptus logs. **Sci. agric.**, v. 61, n.3, p. 260-265, 2004.
- RAYMAN, M. F. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 336, p. 233-241, 2000.
- REILLY, C. Selenium: A new entrant into the functional food arena (review). **Trends Food Sci. Technol.**, v. 9, p.114-118, 1998.
- REILLY, C. In: REILLY, C. (Ed.) **Selenium in food and health**. Blackie Academic and Professional, London, 1996, p. 157-162.
- ROYSE, D.J.; RHODES, T.W.; OHGA, S.; SANCHEZ, J.E. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. **Bioresour. Technol.**, v. 91, p. 85-91, 2004.

- ROYSE, D. J. Influence of spawn rate and commercial delayer release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size and time to production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, p. 527-531, 2002.
- RUEGGER, M.J.S.; TORNICICLO, S. M. T; BONONI, V.L.R; CAPELARI, M. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarri* (Jungh.) Höhn. In lignocellulosic substrates. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 32, p. 211-214, 2001.
- SHEARER, C.A. Fungal competition. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. 259-264, 1995.
- SHIOBARA, Y.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, K.T. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 152, p. 309-314, 1998.
- SPOLAR, M. R.; SCHAFFER, E. M.; BEELMAN, R.B.; MILNER, J.A. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz [*a*]anthracene bioactivation in mammary tissue, **Cancer Lett.**, v. 138, p. 145-150, 1999.
- SPOLAR, M. R.; BEELMAN, R.B.; ROYSE, D.J.; SIMONS, S. Selenium enrichment of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Mush. News**, v. 46, p. 26-33, 1998.
- STOLZ, J.F.; OREMLAND, R.S. Bacterial respiration of arsenic and selenium. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 615-627, 1999.
- WERNER, A. R.; BEELMAN, R. B. Growing high-selenium edible and medicinal button Mushrooms (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) as ingredient for functional foods or dietary supplements. **Int. J. Med. Mush.**, v. 4, p. 167-171, 2002.

WERNER, A. R.; BEELMAN, R. B. Growing selenium-rich Mushrooms by adding controlled amounts of selenium to the compost at spawning. **Mush. News**, v. 49, p. 4 -11, 2001.

WU, L. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. **Ecotoxic. Environ. Safety**, v. 57, p. 257-269, 2004.

APÊNDICE

CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Resumo da análise de variância para as curvas de crescimento de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA e substrato ligninocelulósico adicionados de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM	
		BDA	Substrato Ligninocelulósico
Isolados	11	4,4556*	1,5106*
[selênio]	4	2,7978*	4,9967*
Tempo	3	84,6338*	118,7043*
Isolado * [selênio]	44	0,1579*	0,085982*
Isolado * tempo	33	0,3494*	0,1785*
[selênio]*tempo	12	0,42277*	0,2803*
Isolado*[selênio]*tempo	132	0,02870*	0,01680*
Resíduo	480	0,0146830	0,01263*

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 2 – Resumo da análise de regressão para as curvas de crescimento de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Controle													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	6,3044*	2,8667*	5,2688*	5,5322*	5,3074*	8,4180*	3,8913*	7,4526*	7,7976*	6,6813*	8,1660*	3,5085*
Falta de ajustamento	2	0,0621 ^{n.s.}	0,1121 ^{n.s.}	0,0618 ^{n.s.}	0,0113 ^{n.s.}	0,0511 ^{n.s.}	0,1021 ^{n.s.}	0,0121 ^{n.s.}	0,0375 ^{n.s.}	0,0253 ^{n.s.}	0,0118 ^{n.s.}	0,3247	0,1588 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,1429*	1,0303*	1,7955*	1,8516*	1,8032*	2,8741*	1,3052	2,5091*	2,6161*	2,2350*	2,9385*	1,2754*
0,32 mmol L ⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	6,4033*	3,0677*	3,7250*	5,8263*	5,4234*	7,4047*	3,6803*	7,0288*	6,3395*	5,2138*	7,3430*	5,1439*
Falta de ajustamento	2	0,0415 ^{n.s.}	0,1276 ^{n.s.}	0,0724 ^{n.s.}	0,0388 ^{n.s.}	0,0634 ^{n.s.}	0,0666 ^{n.s.}	0,0187 ^{n.s.}	0,0552 ^{n.s.}	0,1009 ^{n.s.}	0,0120 ^{n.s.}	0,3330 ^{n.s.}	0,0804 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,1621*	1,1076*	1,2899*	1,9679*	1,8501*	2,5127*	1,2393*	2,3797*	2,1804*	1,7459*	2,6700*	1,7682*
0,64 mmol L ⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	5,7524*	1,8943*	3,8583*	3,7395*	4,1929*	6,0636*	1,8484*	5,0721*	5,1176*	4,3578*	6,8865*	2,6988*
Falta de ajustamento	2	0,0981 ^{n.s.}	0,0255 ^{n.s.}	0,0774 ^{n.s.}	0,0074 ^{n.s.}	0,0212 ^{n.s.}	0,0733 ^{n.s.}	0,0394 ^{n.s.}	0,0261 ^{n.s.}	0,0393 ^{n.s.}	0,0153 ^{n.s.}	0,4142 ^{n.s.}	0,0866 ^{n.s.}
Tempo	(3)	1,9501*	0,6484*	1,3377*	1,2514*	1,4118*	2,0701*	0,6424*	1,7081*	1,7302*	1,4628*	2,5716*	0,9573*

Continuação do Quadro 2 ...

0,96 mmol L⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	4,4467*	2,3956*	3,5124*	2,7482*	3,2798*	4,3632*	1,7695*	4,5111*	1,4267*	4,0068*	5,8269*	1,6998*
Falta de ajustamento	2	0,0491 ^{n.s.}	0,0593 ^{n.s.}	0,1074 ^{n.s.}	0,0061 ^{n.s.}	0,0258 ^{n.s.}	0,0194 ^{n.s.}	0,0315 ^{n.s.}	0,0323 ^{n.s.}	0,0149 ^{n.s.}	0,0213 ^{n.s.}	0,2522 ^{n.s.}	0,0531 ^{n.s.}
Tempo	(3)	1,5190*	0,8380*	1,2424*	0,9201*	1,1101*	1,4673*	0,6108*	1,5252*	0,4855*	1,3450*	2,1101*	0,6020*
1,28 mmol L⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	3,5873*	2,4693*	3,1405*	1,6010*	3,0142*	4,6054*	2,2434*	3,2578*	1,0381*	3,4182*	6,0414*	2,0115*
Falta de ajustamento	2	0,0107 ^{n.s.}	0,0495 ^{n.s.}	0,0643 ^{n.s.}	0,0072 ^{n.s.}	0,0490 ^{n.s.}	0,0333 ^{n.s.}	0,0060 ^{n.s.}	0,0301 ^{n.s.}	0,1527 ^{n.s.}	0,0481 ^{n.s.}	0,1841 ^{n.s.}	0,1413 ^{n.s.}
Tempo	(3)	1,2029*	0,8561*	1,0897*	0,5384*	1,0374*	1,5573*	0,7518*	1,1060*	0,4478*	1,1714*	2,1365*	0,7647*
Resíduo	480	0,146830											

G.L. - Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo a 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 3 – Equações estimadas para as curvas de crescimento de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Isolados	Controle			0,32 mmol L ⁻¹		
	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)
UFV11	$\hat{Y} = 1,751 + 0,216 * \text{tempo}$	98,068	3,821	$\hat{Y} = 1,772 + 0,218 * \text{Tempo}$	98,720	3,377
UFV16	$\hat{Y} = 1,619 + 0,146 * \text{tempo}$	92,743	5,644	$\hat{Y} = 1,546 + 0,151 * \text{Tempo}$	92,319	7,536
UFV53	$\hat{Y} = 2,188 + 0,197 * \text{tempo}$	97,704	3,088	$\hat{Y} = 2,303 + 0,166 * \text{Tempo}$	96,260	7,311
UFV62	$\hat{Y} = 1,619 + 0,202 * \text{tempo}$	99,703	2,573	$\hat{Y} = 1,525 + 0,208 * \text{Tempo}$	98,687	4,778
UFV63	$\hat{Y} = 1,806 + 0,198 * \text{tempo}$	98,112	3,297	$\hat{Y} = 1,702 + 0,200 * \text{Tempo}$	97,714	5,385
UFV73	$\hat{Y} = 1,530 + 0,249 * \text{tempo}$	97,631	4,477	$\hat{Y} = 1,554 + 0,234 * \text{Tempo}$	98,232	3,642
UFV74	$\hat{Y} = 1,560 + 0,169 * \text{tempo}$	99,382	2,525	$\hat{Y} = 1,530 + 0,165 * \text{Tempo}$	98,992	2,973
UFV75	$\hat{Y} = 1,454 + 0,235 * \text{tempo}$	99,005	2,808	$\hat{Y} = 1,487 + 0,228 * \text{Tempo}$	98,453	3,643
UFV78	$\hat{Y} = 1,372 + 0,240 * \text{tempo}$	99,355	3,786	$\hat{Y} = 1,311 + 0,217 * \text{Tempo}$	96,915	5,286
UFV80	$\hat{Y} = 1,419 + 0,222 * \text{tempo}$	99,649	2,212	$\hat{Y} = 1,458 + 0,197 * \text{Tempo}$	99,543	5,547
UFV81	$\hat{Y} = 1,629 + 0,246 * \text{tempo}$	92,633	7,630	$\hat{Y} = 1,711 + 0,233 * \text{Tempo}$	91,683	7,597
UFV82	$\hat{Y} = 1,669 + 0,161 * \text{tempo}$	91,700	7,988	$\hat{Y} = 1,613 + 0,195 * \text{Tempo}$	96,970	5,272

Continuação do Quadro 3...

Isolados	0,64 mmol L ⁻¹			0,96 mmol L ⁻¹			1,28 mmol L ⁻¹		
	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)
UFV11	$\hat{Y} = 1,810 + 0,206 * \text{Tempo}$	98,324	3,125	$\hat{Y} = 1,916 + 0,181 * \text{Tempo}$	97,838	3,253	$\hat{Y} = 1,905 + 0,163 * \text{Tempo}$	99,404	4,647
UFV16	$\hat{Y} = 1,771 + 0,118 * \text{Tempo}$	97,379	6,613	$\hat{Y} = 1,697 + 0,133 * \text{Tempo}$	95,285	4,696	$\hat{Y} = 1,699 + 0,135 * \text{Tempo}$	96,147	4,534
UFV53	$\hat{Y} = 2,295 + 0,169 * \text{Tempo}$	96,144	3,601	$\hat{Y} = 2,244 + 0,161 * \text{Tempo}$	94,236	4,457	$\hat{Y} = 2,263 + 0,153 * \text{Tempo}$	96,068	3,944
UFV62	$\hat{Y} = 1,685 + 0,166 * \text{Tempo}$	99,608	1,407	$\hat{Y} = 1,750 + 0,143 * \text{Tempo}$	99,559	3,397	$\hat{Y} = 1,833 + 0,109 * \text{Tempo}$	99,112	12,367
UFV63	$\hat{Y} = 1,599 + 0,176 * \text{Tempo}$	98,997	6,589	$\hat{Y} = 1,627 + 0,156 * \text{Tempo}$	98,479	3,575	$\hat{Y} = 1,984 + 0,149 * \text{Tempo}$	96,849	3,384
UFV73	$\hat{Y} = 1,623 + 0,212 * \text{Tempo}$	97,639	3,943	$\hat{Y} = 1,607 + 0,179 * \text{Tempo}$	99,119	3,303	$\hat{Y} = 1,608 + 0,185 * \text{Tempo}$	98,574	3,965
UFV74	$\hat{Y} = 1,645 + 0,117 * \text{Tempo}$	95,910	7,567	$\hat{Y} = 1,701 + 0,114 * \text{Tempo}$	96,562	4,237	$\hat{Y} = 1,671 + 0,129 * \text{Tempo}$	99,465	4,074
UFV75	$\hat{Y} = 1,562 + 0,194 * \text{Tempo}$	98,980	3,405	$\hat{Y} = 1,597 + 0,183 * \text{Tempo}$	98,587	3,056	$\hat{Y} = 1,549 + 0,155 * \text{Tempo}$	98,185	3,675
UFV78	$\hat{Y} = 1,514 + 0,195 * \text{Tempo}$	98,489	6,143	$\hat{Y} = 1,729 + 0,103 * \text{Tempo}$	97,950	11,264	$\hat{Y} = 1,672 + 0,088 * \text{Tempo}$	77,261	10,533
UFV80	$\hat{Y} = 1,496 + 0,179 * \text{Tempo}$	99,305	6,269	$\hat{Y} = 1,569 + 0,172 * \text{Tempo}$	98,948	2,690	$\hat{Y} = 1,555 + 0,159 * \text{Tempo}$	97,266	4,475
UFV81	$\hat{Y} = 1,686 + 0,226 * \text{Tempo}$	89,261	8,569	$\hat{Y} = 1,714 + 0,208 * \text{Tempo}$	92,033	7,0075	$\hat{Y} = 1,625 + 0,212 * \text{Tempo}$	94,256	6,806
UFV82	$\hat{Y} = 1,901 + 0,141 * \text{Tempo}$	93,969	6,953	$\hat{Y} = 1,962 + 0,112 * \text{Tempo}$	94,123	4,121	$\hat{Y} = 1,771 + 0,122 * \text{Tempo}$	87,682	6,257

CV – Coeficiente de variação

Quadro 4 – Resumo da análise de regressão para as curvas de crescimento de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Controle													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	8,1763*	6,3629*	7,6855*	7,6377*	7,7185*	6,8290*	4,7850*	7,4450*	7,0500*	7,0042*	7,8056*	8,0227*
Falta de ajustamento	2	0,2498 ^{n.s.}	0,3001 ^{n.s.}	0,2609 ^{n.s.}	0,2772 ^{n.s.}	0,2371 ^{n.s.}	0,1994 ^{n.s.}	0,0196 ^{n.s.}	0,2858 ^{n.s.}	0,2032 ^{n.s.}	0,1689 ^{n.s.}	0,2619 ^{n.s.}	0,2616 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,8920	2,3211	2,7358	2,7307	2,7309	2,4092	1,6080	2,6721	2,4855	2,4473	2,7764	2,8486
0,32 mmol L ⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	7,6384*	6,8499*	7,7933*	6,0643*	7,4758*	6,6247*	3,3616*	7,4935*	6,2876*	6,8324*	7,5530*	5,3653*
Falta de ajustamento	2	0,2009 ^{n.s.}	0,1755 ^{n.s.}	0,2156 ^{n.s.}	0,2543 ^{n.s.}	0,1976 ^{n.s.}	0,1303 ^{n.s.}	0,0226 ^{n.s.}	0,2087 ^{n.s.}	0,1584 ^{n.s.}	0,2149 ^{n.s.}	0,1914 ^{n.s.}	0,1581 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,6800	2,4003	2,7415	2,1909	2,6237	2,2951	1,1356	2,6370	2,2014	2,4208	2,6452	1,8939
0,64 mmol L ⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	6,1960*	4,6437*	7,2266*	5,2493*	4,7281*	4,7281*	2,6730*	5,1545*	5,3372*	5,8188*	6,8432*	6,7637*
Falta de ajustamento	2	0,0855 ^{n.s.}	0,1602 ^{n.s.}	0,1411 ^{n.s.}	0,1833 ^{n.s.}	0,0902 ^{n.s.}	0,0902 ^{n.s.}	0,0258 ^{n.s.}	0,1180 ^{n.s.}	0,1044 ^{n.s.}	0,1201 ^{n.s.}	0,1589 ^{n.s.}	0,1864 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,1223	1,6547	2,5029	1,8719	1,6362	1,6362	0,9082	1,7968	1,8487	2,0196	2,3870	2,3788

Continuação do Quadro 4 ...

0,96 mmol L ⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	6,8438*	4,5183*	6,5300*	4,7557*	4,8116*	4,77760*	1,4623*	6,0694*	4,2236*	5,4174*	7,1415*	5,3575*
Falta de ajustamento	2	0,0612 ^{n.s.}	0,0949 ^{n.s.}	0,1037 ^{n.s.}	0,0712 ^{n.s.}	0,0461 ^{n.s.}	0,0481 ^{n.s.}	0,0127 ^{n.s.}	0,1412 ^{n.s.}	0,0130 ^{n.s.}	0,1031 ^{n.s.}	0,1628 ^{n.s.}	0,1722 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,3221	1,5694	2,2458	1,6327	1,6346	1,6241	0,4959	2,1173	1,4165	1,8746	2,4890	1,9006
1,28 mmol L ⁻¹													
Fonte de variação	G.L	QM											
		UFV11	UFV16	UFV53	UFV62	UFV63	UFV73	UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	1	5.988*	4.1328*	6,549*	3,8476*	6,6061*	3,8042*	1,6567*	4,7861*	2,9000*	4,9916*	6,9728*	4,6448*
Falta de ajustamento	2	0,0448 ^{n.s.}	0,0524 ^{n.s.}	0,1046 ^{n.s.}	0,0258 ^{n.s.}	0,1841 ^{n.s.}	0,0468 ^{n.s.}	0,0375 ^{n.s.}	0,0813 ^{n.s.}	0,0266 ^{n.s.}	0,0312 ^{n.s.}	0,4582 ^{n.s.}	0,3454 ^{n.s.}
Tempo	(3)	2,0259	1,4126	2,2528	1,2997	2,3248	1,2993	0,5772	1,6495	0,9844	1,6847	2,6297	1,7785
Resíduo	480	0, 01263											

G.L. - Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 5 – Equações estimadas para as curvas de crescimento de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Isolados	Controle			0,32 mmol L ⁻¹		
	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)
UFV11	$\hat{Y} = 1,759 + 0,246 * \text{Tempo}$	94,240	6,257	$\hat{Y} = 1,691 + 0,238 * \text{Tempo}$	95,004	6,006
UFV16	$\hat{Y} = 1,912 + 0,217 * \text{Tempo}$	91,379	7,210	$\hat{Y} = 1,730 + 0,225 * \text{Tempo}$	95,126	6,281
UFV53	$\hat{Y} = 1,804 + 0,239 * \text{Tempo}$	93,641	6,633	$\hat{Y} = 1,704 + 0,240 * \text{Tempo}$	94,756	6,191
UFV62	$\hat{Y} = 1,842 + 0,238 * \text{Tempo}$	93,233	6,693	$\hat{Y} = 1,879 + 0,212 * \text{Tempo}$	92,262	7,789
UFV63	$\hat{Y} = 1,795 + 0,239 * \text{Tempo}$	94,211	6,110	$\hat{Y} = 1,670 + 0,235 * \text{Tempo}$	94,980	6,441
UFV73	$\hat{Y} = 1,969 + 0,225 * \text{Tempo}$	94,483	5,788	$\hat{Y} = 1,808 + 0,222 * \text{Tempo}$	96,215	5,445
UFV74	$\hat{Y} = 1,70 + 0,188 * \text{Tempo}$	99,188	2,464	$\hat{Y} = 1,704 + 0,158 * \text{Tempo}$	98,676	4,498
UFV75	$\hat{Y} = 1,889 + 0,235 * \text{Tempo}$	92,870	6,605	$\hat{Y} = 1,783 + 0,236 * \text{Tempo}$	94,722	6,570
UFV78	$\hat{Y} = 1,889 + 0,229 * \text{Tempo}$	94,550	6,611	$\hat{Y} = 1,786 + 0,216 * \text{Tempo}$	95,204	6,220
UFV80	$\hat{Y} = 1,857 + 0,228 * \text{Tempo}$	95,398	5,370	$\hat{Y} = 1,809 + 0,225 * \text{Tempo}$	94,080	6,473
UFV81	$\hat{Y} = 1,823 + 0,240 * \text{Tempo}$	93,712	6,366	$\hat{Y} = 1,798 + 0,237 * \text{Tempo}$	95,176	5,642
UFV82	$\hat{Y} = 1,78 + 0,244 * \text{Tempo}$	93,878	6,677	$\hat{Y} = 2,046 + 0,199 * \text{Tempo}$	94,433	5,320

Continuação do Quadro 5 ...

Isolados	0,64 mmol L ⁻¹			0,96 mmol L ⁻¹			1,28 mmol L ⁻¹		
	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)
UFV11	$\hat{Y} = 1,686 + 0,214 * \text{Tempo}$	97,314	5,392	$\hat{Y} = 1,561 + 0,225 * \text{Tempo}$	98,244	3,794	$\hat{Y} = 1,498 + 0,211 * \text{Tempo}$	98,527	7,886
UFV16	$\hat{Y} = 1,876 + 0,185 * \text{Tempo}$	93,547	6,805	$\hat{Y} = 1,808 + 0,183 * \text{Tempo}$	95,968	6,256	$\hat{Y} = 1,747 + 0,175 * \text{Tempo}$	97,526	4,380
UFV53	$\hat{Y} = 1,643 + 0,231 * \text{Tempo}$	96,242	5,181	$\hat{Y} = 1,660 + 0,220 * \text{Tempo}$	96,922	5,420	$\hat{Y} = 1,660 + 0,220 * \text{Tempo}$	96,905	6,800
UFV62	$\hat{Y} = 1,809 + 0,197 * \text{Tempo}$	93,473	5,994	$\hat{Y} = 1,733 + 0,188 * \text{Tempo}$	97,094	4,230	$\hat{Y} = 1,774 + 0,169 * \text{Tempo}$	98,676	3,193
UFV63	$\hat{Y} = 1,837 + 0,187 * \text{Tempo}$	96,325	5,533	$\hat{Y} = 1,740 + 0,189 * \text{Tempo}$	98,120	3,433	$\hat{Y} = 1,712 + 0,221 * \text{Tempo}$	94,722	4,477
UFV73	$\hat{Y} = 1,837 + 0,187 * \text{Tempo}$	96,325	5,533	$\hat{Y} = 1,743 + 0,188 * \text{Tempo}$	98,025	3,508	$\hat{Y} = 1,648 + 0,168 * \text{Tempo}$	97,598	4,202
UFV74	$\hat{Y} = 1,874 + 0,141 * \text{Tempo}$	98,109	5,550	$\hat{Y} = 2,005 + 0,104 * \text{Tempo}$	98,293	5,002	$\hat{Y} = 1,808 + 0,111 * \text{Tempo}$	95,668	5,157
UFV75	$\hat{Y} = 1,828 + 0,195 * \text{Tempo}$	95,623	5,012	$\hat{Y} = 1,750 + 0,212 * \text{Tempo}$	95,553	6,273	$\hat{Y} = 1,769 + 0,188 * \text{Tempo}$	96,716	5,355
UFV78	$\hat{Y} = 1,835 + 0,199 * \text{Tempo}$	96,235	7,902	$\hat{Y} = 1,750 + 0,212 * \text{Tempo}$	99,388	3,553	$\hat{Y} = 1,74 + 0,147 * \text{Tempo}$	98,202	3,379
UFV80	$\hat{Y} = 1,820 + 0,208 * \text{Tempo}$	96,037	4,842	$\hat{Y} = 1,832 + 0,200 * \text{Tempo}$	96,333	4,429	$\hat{Y} = 1,626 + 0,192 * \text{Tempo}$	98,767	2,696
UFV81	$\hat{Y} = 1,791 + 0,225 * \text{Tempo}$	95,560	5,583	$\hat{Y} = 1,733 + 0,230 * \text{Tempo}$	95,639	5,758	$\hat{Y} = 1,713 + 0,227 * \text{Tempo}$	88,385	9,900
UFV82	$\hat{Y} = 1,778 + 0,224 * \text{Tempo}$	94,777	6,440	$\hat{Y} = 1,780 + 0,199 * \text{Tempo}$	93,959	6,197	$\hat{Y} = 1,823 + 0,185 * \text{Tempo}$	87,053	9,816

CV – Coeficiente de variação

Quadro 6 – Resumo da análise de variância para a massa seca de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA e substrato ligninocelulósico adicionados de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de Variação	G.L.	QM
Isolados	11	3217,6889*
Dose	4	1795,1250*
Isolados*dose	44	466,0462*
Resíduo	120	27,5667

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 7 – Resumo da análise de regressão para a massa seca de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA e substrato ligninocelulósico adicionados de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM					
		UFV11		UFV16			
Regressão	1	691,2*		1070,7302*			
Falta de ajustamento	3	18,8 ^{n.s.}		1,5428 ^{n.s.}			
[Selênio]	(4)	186,9*		803,4333*			
		UFV53	UFV62	UFV63	UFV73		
Regressão	2	164,1270*	1280,1905*	1874,8492*	317,7778*		
Falta de ajustamento	2	24,6857 ^{n.s.}	134,2762*	1,7191 ^{n.s.}	14,9333 ^{n.s.}		
[Selênio]	(4)	129,2667*	707,2333*	1406,5667*	242,0667*		
		UFV74	UFV75	UFV78	UFV80	UFV81	UFV82
Regressão	3	7,5 ^{n.s.}	1503,857*	833,5906*	523,4*	256,9444*	1578,6984*
Falta de ajustamento	1	86,2556 ^{n.s.}	29,2762 ^{n.s.}	16,5428 ^{n.s.}	1023,0667*	145,8333*	6,1714 ^{n.s.}
[Selênio]	(4)	66,5667 ^{n.s.}	766,5667*	425,0667*	773,2333*	229,1667*	1185,5667*
Resíduo	120	27,5667					

G.L. - Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 8 – Equações estimadas para o teor de massa seca de doze isolados do fungo *L. edodes* cultivados em BDA e substrato ligninocelulósico adicionados de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Isolados	Equação	R ²	CV (%)
UFV 11	$\hat{Y} = 5,467 + 15 * [\text{selênio}]$	92,456	18,749
UFV16	$\hat{Y} = 22,914 + 134,077 * [\text{selênio}] - 338,309 * [\text{selênio}]^2 + 198,364 * [\text{selênio}]^3$	99,952	15,055
UFV 53	$\hat{Y} = 19,324 + 76,587 * [\text{selênio}] - 163,458 * [\text{selênio}]^2 + 79,685 * [\text{selênio}]^3$	95,226	21,668
UFV 62	$\hat{Y} = 64,210 - 73,810 * [\text{selênio}] + 38,132 * [\text{selênio}]^2$	90,507	18,150
UFV 63	$\hat{Y} = 50,090 + 206,014 * [\text{selênio}] - 467,820 * [\text{selênio}]^2 + 229,730 * [\text{selênio}]^3$	99,969	12,234
UFV 73	$\hat{Y} = 53,067 + 108,681 * [\text{selênio}] - 216,471 * [\text{selênio}]^2 + 113,593 * [\text{selênio}]^3$	98,458	15,817
UFV 74	$\hat{Y} = \bar{Y} = 13,733$ (nenhuma equação ajustada)	-	-
UFV 75	$\hat{Y} = 44,743 - 80,060 * [\text{selênio}] + 41,387 * [\text{selênio}]^2$	98,090	18,873
UFV 78	$\hat{Y} = 36,391 - 32,649 * [\text{selênio}] + 7,441 * [\text{selênio}]^2$	98,054	23,452
UFV 80	$\hat{Y} = 51,867 - 53,854 * [\text{selênio}] + 30,925 * [\text{selênio}]^2$	33,845	38,419
UFV 81	$\hat{Y} = 44,5 - 111,372 * [\text{selênio}] + 193,685 * [\text{selênio}]^2 - 92,400 * [\text{selênio}]^3$	84,091	18,327
UFV 82	$\hat{Y} = 52,171 - 5,134 * [\text{selênio}] - 112,769 * [\text{selênio}]^2 + 71,208 * [\text{selênio}]^3$	99,870	12,825

CV – Coeficiente de variação

Quadro 9 – Resumo da análise de variância para o diâmetro das hifas, distância entre septos, distância entre núcleos dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em BDA adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM		
		Diâmetro das hifas	Distância entre septos	Distância entre núcleos
Isolados	2	267,0845*	376799,7170*	60,6671*
[selênio]	4	116,7538*	123897,7056*	32,5336*
Isolados* [selênio]	8	51,5115 ^{n.s.}	28379,3207 ^{n.s.}	47,9668*
Resíduo	30	31,0339	27164,0820	11,8781

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 10 – Resumo da análise de regressão para o diâmetro das hifas, distância entre septos e distância entre núcleos dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em BDA adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Diâmetro das hifas			
Fonte de variação	G.L	QM	
		UFV 11	UFV 16
Regressão	1	20,6073 ^{n.s.}	112,1875 ^{n.s.}
Falta de ajustamento	3	19,5853 ^{n.s.}	95,8990 ^{n.s.}
[selênio]	(4)	19,8408 ^{n.s.}	99,9711 ^{n.s.}
		UFV 53	
Regressão	3	124,4577*	
Falta de ajustamento	1	26,4922 ^{n.s.}	
[selênio]	(4)	99,9649*	
Resíduo	30	31,0339	
Distância entre septos			
Fonte de variação	G.L	QM	
		UFV 11	UFV 16
Regressão	2	90487*	125007*
Falta de ajustamento	2	50970,6734 ^{n.s.}	18800,4128 ^{n.s.}
[selênio]	(4)	70728,9125 ^{n.s.}	71903,9552 ^{n.s.}
		UFV 53	
Regressão	1	311,60609 ^{n.s.}	
Falta de ajustamento	3	505694,1037 ^{n.s.}	
[selênio]	(4)	38023,4793 ^{n.s.}	
Resíduo	30	27164,0820	
Distância entre núcleos			
Fonte de variação	G.L	QM	
		UFV 11	UFV 53
Regressão	1	56,4578*	9,5057 ^{n.s.}
Falta de ajustamento	3	34,4728 ^{n.s.}	20,8291 ^{n.s.}
[selênio]	(4)	39,9690*	17,9982 ^{n.s.}
		UFV 16	
Regressão	3	45,5193*	
Falta de ajustamento	1	145,4419*	
[selênio]	(4)	70,4999*	
Resíduo	30	11,8781	

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 11 – Equações estimadas para o diâmetro das hifas, distâncias entre septos e distância entre núcleos dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em BDA adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Diâmetro das hifas			
Isolados	Equação	R ²	CV (%)
UFV 11	$\hat{Y} = \bar{Y} = 30,939$	-	-
UFV 16	$\hat{Y} = \bar{Y} = 36,464$	-	-
UFV 53	$\hat{Y} = 41,792 + 28,810 * [\text{selênio}] - 61,663 * [\text{selênio}]^2 + 25,760 * [\text{selênio}]^3$	93,375	12,998
Distância entre septos			
Isolados	Equação	R ²	CV (%)
UFV 11	$\hat{Y} = 354,722 + 818,782 * [\text{selênio}] - 641,022 * [\text{selênio}]^2$	63,967	31,223
UFV 16	$\hat{Y} = 645,883 + 966,975 * [\text{selênio}] - 753,426 * [\text{selênio}]^2$	86,927	23,230
UFV 53	$\hat{Y} = \bar{Y} = 647,882$	-	-
Distância entre núcleos			
Isolados	Equação	R ²	CV (%)
UFV 11	$\hat{Y} = 17,681 - 4,287 * [\text{selênio}]$	35,313	34,283
UFV 16	$\hat{Y} = 14,961 - 45,293 * [\text{selênio}] + 99,968 * [\text{selênio}]^2 - 53,127 * [\text{selênio}]^3$	48,425	36,900
UFV 53	$\hat{Y} = \bar{Y} = 10,936$	-	-

CV – Coeficiente de variação

CAPÍTULO 2

Quadro 1 – Resumo da análise de variância da atividade enzimática dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM		
		Lacase	Celulase	Xilanase
Isolados	2	10836,2172*	4,9258*	0,8374*
[selênio]	4	8650,7238*	7,5016*	2,4958*
Tempo	2	33980,7865*	43,8276*	4,8005*
Isolado*[selênio]	8	3128,6861*	12,0367*	13,6870*
Isolado*tempo	4	4274,8476*	5,7388*	6,79298*
[selênio]*tempo	8	6112,3737*	21,3208*	10,4642*
Isolados*[selênio]*tempo	16	2817,6446*	63,2716*	29,4642*
Resíduo	90	58,4499	0,1024	0,02758

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 2 – Resumo da análise de regressão para a atividade enzimática dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato lignocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

1º grau							
Fonte de variação	G.L.	QM					
		UFV 11 7 dias - Lacase	UFV 11 21 dias - Xilanase	UFV 16 7 dias - Lacase	UFV 16 14 dias - Lacase	UFV 16 14 dias - Celulase	UFV 53 7 dias - Lacase
Regressão	1	0,09419 ^{n.s.}	0,0000768 ^{n.s.}	0,1221 ^{n.s.}	1012,0905*	1,1098*	0,2517 ^{n.s.}
Falta de ajustamento	3	3,4296 ^{n.s.}	0,0000256 ^{n.s.}	0,5858 ^{n.s.}	358,7634*	3,1733*	9,9377 ^{n.s.}
[Selênio]	(4)	2,5957 ^{n.s.}	0,0000384 ^{n.s.}	0,1776 ^{n.s.}	522,09552*	2,6574*	7,5162 ^{n.s.}
Resíduo	90	58,4499	0,02758	58,4499	58,4499	0,1024	58,4499
2º grau							
Fonte de variação	G.L.	QM					
		UFV 11 7 dias – Celulase	UFV 11 14 dias - Celulase	UFV 11 7 dias – Xilanase	UFV 16 21 dias – Lacase	UFV 16 7 dias - Xilanase	
Regressão	2	0,65431*	13,3078*	0,5376*	3249,0048*	1,6535*	
Falta de ajustamento	2	1,6066*	0,10999 ^{n.s.}	0,1151*	6251,4708*	0,1795*	
[Selênio]	(4)	1,1304*	1,1304*	0,3263*	6077,8100*	0,9165*	
Resíduo	90	0,1024	0,1024	0,02758	58,4499	0,02758	
Fonte de variação	G.L.	QM					
		UFV 16 21 dias - Xilanase	UFV 53 14 dias - Lacase	UFV 53 21 dias – Lacase	UFV 53 7 dias – Xilanase	UFV 53 21 dias - Xilanase	
Regressão	2	2,9689*	589,9206*	6066,3456*	1,2278*	0,1324*	
Falta de ajustamento	2	1,0982*	2277,4960*	12442,2282*	0,4339*	2,2248*	
[Selênio]	(4)	2,0335*	1433,7083*	9254,2869*	0,8308*	1,1786*	
Resíduo	90	0,02758	58,4499	58,4499	0,02758	0,02758	

Continuação do Quadro 2 ...

3º grau						
Fonte de variação	G.L.	QM				
		UFV 11 14 dias - Xilanase	UFV 11 14 dias - Lacase	UFV 11 21 dias - Celulase	UFV 11 21 dias - Lacase	UFV 16 7 dias - Celulase
Regressão	3	4,1178*	17078*	2,39267*	10395*	6,0679*
Falta de ajustamento	1	3,2079*	2544,1028*	1,2483*	4765,6769*	0,003772 ^{n.s.}
[Selênio]	(4)	3,8903*	13444,7064*	2,1066*	8987,8205*	0,1608 ^{n.s.}
Resíduo	90	0,02758	58,4499	0,1024	58,4499	0,1024
Fonte de variação	G.L.	QM				
		UFV 16 21 dias - Celulase	UFV 53 7 dias - Xilanase	UFV 53 14 dias - Xilanase	UFV 53 14 dias - celulase	UFV 53 21 dias - celulase
Regressão	3	1,8293*	0,8669*	0,7129*	2,1027*	2,9181*
Falta de ajustamento	1	4,9911*	0,7227*	0,6792*	0,005121 ^{n.s.}	0,3016 ^{n.s.}
[Selênio]	(4)	2,6197*	0,8308*	0,7045*	1,5783*	2,2640*
Resíduo	90	0,1024	0,02758	0,02758	0,1024	0,1024

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 3 – Equações estimadas para atividade enzimática dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Xilanase – UFV 11			
Tempo (dias)	Equação	R²	CV (%)
7	$\hat{Y} = 0,518 - 0,421 * [\text{selênio}] + 0,736 * [\text{selênio}]^2$	82,367	27,668
14	$\hat{Y} = 1,441 - 13,008 * [\text{selênio}] + 27,554 * [\text{selênio}]^2 - 13,517 * [\text{selênio}]^3$	79,385	48,363
21	$\hat{Y} = \bar{Y} = 0,0016$	-	-
Xilanase – UFV 16			
Tempo (dias)	Equação	R²	CV (%)
7	$\hat{Y} = 0,432 - 0,991 * [\text{selênio}] + 1,460 * [\text{selênio}]^2$	90,207	37,566
21	$\hat{Y} = 1,625 - 2,343 * [\text{selênio}] + 0,768 * [\text{selênio}]^2$	72,997	80,134
Xilanase – UFV 53			
Tempo (dias)	Equação	R²	CV (%)
7	$\hat{Y} = 1,015 + 1,551 * [\text{selênio}] - 4,061 * [\text{selênio}]^2 + 1,769 * [\text{selênio}]^3$	78,255	48,843
14	$\hat{Y} = 0,0128 + 1,410 * [\text{selênio}] - 2,936 * [\text{selênio}]^2 + 1,956 * [\text{selênio}]^3$	75,896	68,080
21	$\hat{Y} = 0,6985 - 0,8638 * [\text{selênio}] + 0,4995 * [\text{selênio}]^2$	7,967	135,568
Celulase – UFV 11			
Tempo (dias)	Equação	R²	CV (%)
7	$\hat{Y} = 2,314 - 1,922 * [\text{selênio}] + 1,650 * [\text{selênio}]^2$	28,940	27,622
14	$\hat{Y} = 0,540 + 0,855 * [\text{selênio}] + 1,583 * [\text{selênio}]^2$	99,180	24,812
21	$\hat{Y} = 0,615 + 8,382 * [\text{selênio}] - 18,304 * [\text{selênio}]^2 + 8,927 * [\text{selênio}]^3$	85,185	61,190
Celulase – UFV 16			
Tempo (dias)	Equação	R²	CV (%)
7	$\hat{Y} = 1,791 - 6,210 * [\text{selênio}] + 13,037 * [\text{selênio}]^2 - 5,32023 * [\text{selênio}]^3$	99,979	16,361
14	$\hat{Y} = 2,609 - 0,601 * [\text{selênio}]$	10,440	39,210
21	$\hat{Y} = 1,060 + 5,348 * [\text{selênio}] - 10,218 * [\text{selênio}]^2 + 4,287 * [\text{selênio}]^3$	52,370	69,757

Continuação do Quadro 3 ...

Celulase – UFV 53			
Tempo (dias)	Equação	R ²	CV (%)
7	$\hat{Y} = 1,398 + 1,575 * [\text{selênio}] - 1,808 * [\text{selênio}]^2$	32,256	61,375
14	$\hat{Y} = 0,900 + 7,522 * [\text{selênio}] - 9,202 * [\text{selênio}]^2 + 3,027 * [\text{selênio}]^3$	99,919	18,648
21	$\hat{Y} = 0,428 - 4,659 * [\text{selênio}] + 10,342 * [\text{selênio}]^2 - 4,512 * [\text{selênio}]^3$	96,669	25,471
Lacase – UFV 11			
Tempo (dias)	Equação	R ²	CV (%)
7	$\hat{Y} = \bar{Y} = 0,941$	-	-
14	$\hat{Y} = 7,011 - 246,501 * [\text{selênio}] + 739,769 * [\text{selênio}]^2 - 367,857 * [\text{selênio}]^3$	80,332	32,784
21	$\hat{Y} = -4,764 + 636,778 * [\text{selênio}] - 1032,358 * [\text{selênio}]^2 + 478,221 * [\text{selênio}]^3$	86,745	30,001
Lacase – UFV 16			
Tempo (dias)	Equação	R ²	CV (%)
7	$\hat{Y} = \bar{Y} = 1,421$	-	-
14	$\hat{Y} = 5,167 + 18,151 * [\text{selênio}]$	48,463	55,480
21	$\hat{Y} = 24,517 + 161,816 * [\text{selênio}] - 114,070 * [\text{selênio}]^2$	26,728	56,664
Lacase – UFV 53			
Tempo (dias)	Equação	R ²	CV (%)
7	$\hat{Y} = \bar{Y} = 6,604$	-	-
14	$\hat{Y} = 13,189 + 49,02 * [\text{selênio}] - 45,516 * [\text{selênio}]^2$	-	-
21	$\hat{Y} = -10,982 + 221,457 * [\text{selênio}] - 157,701 * [\text{selênio}]^2$	32,776	136,353

CV – Coeficiente de variação

Quadro 4 – Resumo da análise de variância da atividade respiratória dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes*, em dois experimentos, cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de Variação	G.L.	QM	
		Respiração 1 *	Respiração 2 **
Isolados	2	7619,1068***	4368,2083***
[selênio]	4	4189,0473***	39304,9620***
Tempo	7	33111,7252***	4262,2160***
Isolados*[selênio]	14	319,6589***	337,8594***
Isolados*tempo	8	1455,4440***	868,2490***
[selênio]*tempo	28	728,2949***	374,3630***
Isolados*[selênio]*Tempo	56	192,0614 ^{n.s.}	90,5856 ^{n.s.}
Resíduo	240	160,7484	182,7813

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

* Taxa respiratória medida do quinto ao décimo segundo dia de crescimento do fungo

** Taxa respiratória medida do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento do fungo

*** Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

n.s. – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 5 – Resumo da análise de regressão da atividade respiratória do quinto ao décimo segundo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

Fonte de variação	G. L	QM				
		UFV11 – Controle	UFV11– 0,64 mmol L ⁻¹	UFV53 – Controle		
Regressão	1	31353*	1540*	39883*		
Falta de ajustamento	6	38,4784 ^{n.s.}	53,6930 ^{n.s.}	46,8964 ^{n.s.}		
Tempo	(7)	4511,9793*	2194,5407*	5737,7313*		
UFV11						
		Controle	0,32 mmol L ⁻¹	0,64 mmol L ⁻¹	0,96 mmol L ⁻¹	1,28 mmol L ⁻¹
Regressão	2	-	13226*	-	8751,0410*	7850,7534*
Falta de ajustamento	5	-	66,3807 ^{n.s.}	-	70,2654 ^{n.s.}	125,6528 ^{n.s.}
Tempo	(7)	-	3826,2158*	-	2550,4870*	2332,8244*
UFV16						
		Controle	0,32 mmol L ⁻¹	0,64 mmol L ⁻¹	0,96 mmol L ⁻¹	1,28 mmol L ⁻¹
Regressão	2	10810*	10252*	4549,1803*	7265,5037*	1149,8893*
Falta de ajustamento	5	307,9209 ^{n.s.}	116,9815 ^{n.s.}	50,5496 ^{n.s.}	140,9112 ^{n.s.}	415,5234*
Tempo	(7)	3308,6599*	3012,6613*	1335,8726*	2176,5091*	625,3422*
UFV53						
		Controle	0,32 mmol L ⁻¹	0,64 mmol L ⁻¹	0,96 mmol L ⁻¹	1,28 mmol L ⁻¹
Regressão	2	-	7871,8021*	7751,5013*	3316,3634*	3419,3996*
Falta de ajustamento	5	-	22,2806 ^{n.s.}	23,6924 ^{n.s.}	198,5845 ^{n.s.}	35,0022 ^{n.s.}
Tempo	(7)	-	2265,0011*	2231,6378*	1089,3785*	1001,9729*
Resíduo	240	160,7484				

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 6 - Equações estimadas para a atividade respiratória do quinto ao décimo segundo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato lignocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

[Selênio]	UFV11			UFV16		
	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)
Controle	$\hat{Y} = -56,425 + 15,774 * \text{Tempo}$	99,269	15,741	$\hat{Y} = -124,782 + 40,484 * \text{Tempo} - 1,635 * \text{Tempo}^2$	93,351	18,059
0,32 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -109,453 + 31,844 * \text{Tempo} - 1,029 * \text{Tempo}^2$	98,762	17,334	$\hat{Y} = -157,084 + 49,462 * \text{Tempo} - 2,205 * \text{Tempo}^2$	97,228	13,334
0,64 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -27,139 + 10,925 * \text{Tempo}$	97,905	17,527	$\hat{Y} = -137,166 + 44,241 * \text{Tempo} - 2,173 * \text{Tempo}^2$	97,297	15,348
0,96 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -186,716 + 56,433 * \text{Tempo} - 2,704 * \text{Tempo}^2$	98,032	14,393	$\hat{Y} = -123,949 + 41,361 * \text{Tempo} - 1,840 * \text{Tempo}^2$	95,376	13,059
1,28 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -178,723 + 52,781 * \text{Tempo} - 2,519 * \text{Tempo}^2$	96,156	16,124	$\hat{Y} = -20,740 + 21,251 * \text{Tempo} - 1,030 * \text{Tempo}^2$	52,538	21,552
UFV53						
	Equação	R ²		CV (%)		
Controle	$\hat{Y} = -42,594 + 17,791 * \text{Tempo}$	99,300		3,555		
0,32 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -109,063 + 41,164 * \text{Tempo} - 1,799 * \text{Tempo}^2$	99,300		9,745		
0,64 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -124,896 + 42,456 * \text{Tempo} - 1,884 * \text{Tempo}^2$	99,242		6,735		
0,96 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -124,318 + 44,386 * \text{Tempo} - 2,279 * \text{Tempo}^2$	86,979		22,446		
1,28 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -52,676 + 27,174 * \text{Tempo} - 1,188 * \text{Tempo}^2$	97,505		12,952		

CV – Coeficiente de variação

Quadro 7 - Resumo da análise de regressão atividade respiratória do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

Fonte de variação		G.L	QM			
UFV11						
		Controle	0,32 mmol L ⁻¹	0,64 mmol L ⁻¹	0,96 mmol L ⁻¹	1,28 mmol L ⁻¹
Regressão	2	4410,8042*	1948,0852*	1610,1582*	930,1537*	869,1104*
Falta de ajustamento	5	133,3049 ^{n.s.}	173,2028 ^{n.s.}	95,2515 ^{n.s.}	83,1600 ^{n.s.}	131,9851 ^{n.s.}
Tempo	(7)	1355,4475*	680,3121*	528,0820*	325,1582 ^{n.s.}	342,5923 ^{n.s.}
UFV16						
		Controle	0,32 mmol L ⁻¹	0,64 mmol L ⁻¹	0,96 mmol L ⁻¹	1,28 mmol L ⁻¹
Regressão	2	4705,0602*	656,0439*	562,0301*	1594,0525*	93,0242 ^{n.s.}
Falta de ajustamento	5	120,6694 ^{n.s.}	31,5780 ^{n.s.}	64,3302 ^{n.s.}	34,6839 ^{n.s.}	33,5152 ^{n.s.}
Tempo	(7)	1430,4954*	209,9968 ^{n.s.}	260,5302 ^{n.s.}	480,2178*	50,5178 ^{n.s.}
UFV53						
		Controle	0,32 mmol L ⁻¹	0,64 mmol L ⁻¹	0,96 mmol L ⁻¹	1,28 mmol L ⁻¹
Regressão	3	1251,8868*	531,7047*	1018,3085*	187,8326 ^{n.s.}	89,4928*
Falta de ajustamento	4	223,3897 ^{n.s.}	95,0404 ^{n.s.}	38,7969 ^{n.s.}	13,6362 ^{n.s.}	33,4809 ^{n.s.}
Tempo	(7)	664,1742*	282,1822 ^{n.s.}	458,5876*	88,2918 ^{n.s.}	57,4860 ^{n.s.}
Resíduo	240	182,7813				

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 8 - Equações estimadas para a atividade respiratória do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento de três isolados do fungo *L. edodes* (UFV11, UFV16 e UFV53) cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

[Selênio]	UFV11			UFV16		
	Equação	R ²	CV (%)	Equação	R ²	CV (%)
Controle	$\hat{Y} = -443,370 + 83,537 * \text{Tempo} - 2,868 * \text{Tempo}^2$	92,975	3,844	$\hat{Y} = -346,988 + 66,927 * \text{Tempo} - 2,203 * \text{Tempo}^2$	93,975	12,908
0,32 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -367,100 + 74,960 * \text{Tempo} - 2,780 * \text{Tempo}^2$	81,815	6,199	$\hat{Y} = -94,391 + 29,800 * \text{Tempo} - 1,011 * \text{Tempo}^2$	89,259	11,599
0,64 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = 188,414 + 50,242 * \text{Tempo} - 1,977 * \text{Tempo}^2$	87,116	6,878	$\hat{Y} = -110,442 + 31,419 * \text{Tempo} - 1,088 * \text{Tempo}^2$	77,751	8,234
0,96 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -239,164 + 51,967 * \text{Tempo} - 1,908 * \text{Tempo}^2$	81,732	18,659	$\hat{Y} = -180,652 + 35,162 * \text{Tempo} - 1,136 * \text{Tempo}^2$	94,841	15,296
1,28 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -226,920 + 49,418 * \text{Tempo} - 1,795 * \text{Tempo}^2$	72,482	9,324	$\hat{Y} = \bar{Y} = 84,843$	-	-
UFV53						
	Equação	R ²		CV (%)		
Controle	$\hat{Y} = -1543,855 + 356,890 * \text{Tempo} - 24,597 * \text{Tempo}^2 + 0,559 * \text{Tempo}^3$	80,780		5,258		
0,32 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -1325,320 + 312,880 * \text{Tempo} - 22,055 * \text{Tempo}^2 + 0,510 * \text{Tempo}^3$	80,754		7,995		
0,64 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = -1675,009 + 381,455 * \text{Tempo} - 26,740 * \text{Tempo}^2 + 0,617 * \text{Tempo}^3$	95,166		7,394		
0,96 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = \bar{Y} = 93,474$	-		-		
1,28 mmol L ⁻¹	$\hat{Y} = \bar{Y} = 86,423$	-		-		

CV – Coeficiente de variação

Quadro 9 – Resumo da análise de variância da atividade respiratória acumulada dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

Fonte de Variação	G.L.	QM	
		ACUMULADA 1*	ACUMULADA 2**
Isolados	2	128734,1040 ^{n.s.}	149529,0630***
[selênio]	4	418301,9000***	1392929,691***
Isolados*[selênio]	8	86969,4420 ^{n.s.}	63292,409 ^{n.s.}
Resíduo	30	64386,4870	38030,8980

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

*Taxa respiratória acumulada medida no quinto ao décimo segundo dia de crescimento do fungo

**Taxa respiratória acumulada medida no décimo ao décimo sétimo dia de crescimento do fungo

*** Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

n.s – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 10 – Resumo da análise de regressão da atividade respiratória acumulada do quinto ao décimo segundo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM
Regressão	2	692841*
Falta de ajustamento	2	143762,412 ^{n.s.}
Dose	(4)	418301,900
Resíduo	40	72120,459

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 11 – Resumo da análise de regressão da atividade respiratória acumulada do décimo ao décimo sétimo dia de crescimento dos isolados UFV11; UFV16 e UFV53 do fungo *L. edodes* cultivados em substrato ligninocelulósico adicionado de 0,32; 0,64; 0,96 e 1,28 mmol L⁻¹ de selenito de sódio de e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM		
		UFV11	UFV16	UFV53
Regressão	2	503098*	831788*	1539974*
Falta de ajustamento	2	21032,2941 ^{n.s.}	142114,057*	1021,4440 ^{n.s.}
Dose	(4)	262065,3200*	486951,230*	770497,960*
Resíduo	30	38030,898		

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

CAPÍTULO 3

Quadro 1 – Resumo da análise de variância para o diâmetro do píleo, diâmetro e comprimento da haste dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM		
		Diâmetro do píleo	Comprimento da haste	Diâmetro da haste
Isolados	1	0,4330 ^{n.s.}	0,7683 ^{n.s.}	0,0289 ^{n.s.}
[selênio]	4	1,5209 ^{n.s.}	0,6208 ^{n.s.}	0,0141 ^{n.s.}
Isolados*[selênio]	4	2,2175 ^{n.s.}	0,9991 ^{n.s.}	0,0641 ^{n.s.}
Resíduo	20	3,7709	0,5308	0,0621

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 2 – Resumo da análise de variância para os valores de L, a e b referente à cor dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM		
		L	a	b
Isolados	1	7,8643 ^{n.s.}	0,00012 ^{n.s.}	20,2541 ^{n.s.}
[selênio]	4	83,9323*	10,6046*	64,2710*
Isolados*[selênio]	4	17,8355*	10,9463*	19,1230*
Resíduo	20	4,5744	2,0107	5,3327

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 3 – Resumo da análise de regressão para os valores de L, a e b referente à cor dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L	QM		
		L	a	B
Regressão	3	111,8220*	12,8090*	84,3003*
Falta de ajustamento	1	0,2634 ^{n.s.}	3,9913 ^{n.s.}	40,1831 ^{n.s.}
[selênio]	(4)	83,9323*	10,6046*	64,2710*
Resíduo	20	4,5744	2,0107	5,3327

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 4 – Equações estimadas para os valores de L, a e b referente à cor dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Variáveis Da cor	Equação	R ²	CV (%)
Valor L	$\hat{Y} = 50,590 - 107,833*[\text{selênio}] + 366,148*[\text{selênio}]^2 - 340,459*[\text{selênio}]^3$	99,922	5,808
Valor a	$\hat{Y} = 22,734 - 105,257*[\text{selênio}] + 379,378*[\text{selênio}]^2 - 359,663*[\text{selênio}]^3$	98,373	16,424
Valor b	$\hat{Y} = 13,631 - 37,0159*[\text{selênio}] + 126,852*[\text{selênio}]^2 - 111,429*[\text{selênio}]^3$	90,591	15,493

CV – Coeficiente de variação

Quadro 5 – Resumo da análise de variância para a concentração de proteína dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM
		Proteína
Isolados	1	0,0441 ^{n.s.}
[selênio]	4	27,6868 ^{n.s.}
Isolados*[selênio]	4	14,3480 ^{n.s.}
Resíduo	20	28,5974

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 6 – Resumo da análise de variância dos minerais e do selênio dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM				
		Ca	Mg	P	K	Se
Isolados	1	0,7489 ^{n.s.}	1,9253 ^{n.s.}	191,4203 ^{n.s.}	1169014,644*	0,1414 ^{n.s.}
[selênio]	4	285,9259 ^{n.s.}	4881,6328*	69418,9272*	365853,701*	311,9023*
Isolados*[selênio]	4	79,7966 ^{n.s.}	1617,0759 ^{n.s.}	35395,3480*	342949,154 ^{n.s.}	0,2280 ^{n.s.}
Resíduo	20	106,0488	1503,0827	6509,2522	125967,708	4,5583

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 7 – Resumo da análise de regressão da concentração de minerais e do selênio dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L	QM		
		K - UFV 16		
Regressão	1	77,299 ^{n.s.}		
Falta de ajustamento	3	5010,1436 ^{n.s.}		
[selênio]	(4)	23082,3204 ^{n.s.}		
Resíduo	20	125967,708		
		Se		
Regressão	2	621,6455*		
Falta de ajustamento	2	2,1592 ^{n.s.}		
[selênio]	(4)	311,9023*		
Resíduo	20	4,5583		
		Mg	P	K - UFV52
Regressão	3	6498,6157*	92479*	873485*
Falta de ajustamento	1	30,6839 ^{n.s.}	237,2982 ^{n.s.}	122426,981 ^{n.s.}
[selênio]	(4)	4881,6328*	69418,9272*	685720,534*
Resíduo	20	1503,0827	6509,2522	125967,708

G.L. – Graus de liberdade

QM: Quadrado médio.

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 8 – Equações estimadas para os minerais e para o selênio dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Elemento	Equação	R ²	CV (%)
Ca	$\hat{Y} = \bar{Y} = 22,285$	-	-
Mg	$\hat{Y} = 163,897 + 378,835 * [\text{selênio}] - 2262,649 * [\text{selênio}]^2 + 2836,68 * [\text{selênio}]^3$	99,844	21,000
P	$\hat{Y} = 743,674 + 1698,158 * [\text{selênio}] - 9649,294 * [\text{selênio}]^2 + 11801 * [\text{selênio}]^3$	99,914	12,658
K - UFV16	$\hat{Y} = \bar{Y} = 940,369$	-	-
K - UFV52	$\hat{Y} = 1033,310 + 15102 * [\text{selênio}] - 75783 * [\text{selênio}]^2 + 82174 * [\text{selênio}]^3$	95,537	36,279
Se	$\hat{Y} = 0,215 + 7,938 * [\text{selênio}] + 30,285 * [\text{selênio}]^2$	99,654	34,917

CV – Coeficiente de variação

Quadro 9 – Resumo da análise de variância para o teor de umidade e a produtividade dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L.	QM	
		Umidade	Produtividade
Isolados	1	0,5133 ^{n.s.}	0,02144 ^{n.s.}
[selênio]	4	2,7500*	0,20764*
Isolados*[selênio]	4	3,1139*	0,3308*
Resíduo	20	0,7257	0,007299

G.L. – Graus de liberdade

QM - Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 10 – Resumo da análise de regressão para o teor de umidade e produtividade dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Fonte de variação	G.L	QM	
		Umidade	Produtividade
Regressão	2	5,3671*	0,2895*
Falta de ajuste	2	0,13292 ^{n.s.}	0,1258*
[selênio]	(4)	2,74999*	0,2076*
Resíduo	20	0,7257	0,007299

G.L. – Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

n.s. - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 11 – Equações estimadas para o teor de umidade e produtividade dos cogumelos shiitake produzidos a partir dos isolados UFV16 e UFV52 em toras artificiais adicionadas de 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mmol L⁻¹ de selenito de sódio e controle sem selênio

Variável	Equação	R ²	CV (%)
Umidade	$\hat{Y} = 90,203 - 4,951 * [\text{selênio}] + 10,350 * [\text{selênio}]^2$	97,583	1,125
Produtividade	$\hat{Y} = 1,012 + 1,923 * [\text{selênio}] - 3,223 * [\text{selênio}]^2$	69,717	22,630

CV – Coeficiente de variação