

MARIA ELIZABETH VÁSCONEZ VÉLEZ

**COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS PELO CRESCIMENTO MICELIAL
DE *Pleurotus djamor* EM SORO DE LEITE ENRIQUECIDO COM SELÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V331c Váscenez Vélez, Maria Elizabeth, 1986-
2017 Compostos bioativos produzidos pelo crescimento micelial
de *Pleurotus djamor* em soro de leite enriquecido com selênio /
Maria Elizabeth Váscenez Vélez. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 61f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Compostos bioativos. 2. Cogumelos comestíveis. 3. Leite
- Microbiologia. 4. b-glucanos. 5. ergosterol. 6. b-galactosidase.
7. Selênio. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Mestrado em Microbiologia Agrícola. II. Título.

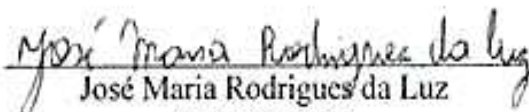
CDD 22 ed. 664.07

MARIA ELIZABETH VÁSCONEZ VÉLEZ

COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS PELO CRESCIMENTO MICELIAL
DE *Pleurotus djamor* EM SORO DE LEITE ENRIQUECIDO COM SELÊNIO

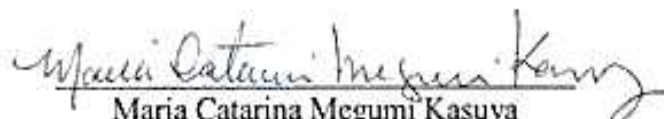
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de novembro de 2017.


José Maria Rodrigues da Luz
(Coorientador)


Marliane de Cássia Soares da Silva
(Coorientadora)


Wilton Soares Cardoso


Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus por cuidar sempre de mim e por me levar no caminho certo com pessoas de corações benévolos.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realizar meu mestrado.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG pelo financiamento para desenvolver o projeto de mestrado.

À minha orientadora Maria Catarina Megumi Kasuya por ter me aceitado no seu laboratório, pelo carinho, por fazer um ótimo ambiente de trabalho e pelos ensinamentos, sobretudo aqueles humanitários, que são para a vida.

À minha coorientadora Marliane da Cássia Soares da Silva pelos ensinamentos, pelas sugestões, pela ajuda, pela amizade e por toda a compreensão.

Ao meu coorientador José Maria Rodrigues da Luz pelo tempo, pela dedicação, pela amizade, pelas conversas e por todos os ensinamentos.

Meu muito obrigada a vocês três por terem me apoiado e ajudado tanto, mesmo sabendo que o tempo era curto.

Ao professor Wilton Soares Cardoso por aceitar fazer parte da banca da defesa.

Aos professores que colaboraram com a minha formação acadêmica nestes dois anos.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela sua colaboração e disponibilidade.

Ao meu esposo Eduardo e minha filha Camila pelo suporte incondicional e por não me deixar perder nunca a fé e a esperança.

Aos meus pais pelo amor, por me apoiarem, por incentivarem meus estudos e por acreditarem em mim.

A toda minha família, vovó, meus irmãos, cunhadas e minha família política por sempre me dar força e me manter em seus pensamentos e orações.

A todos e cada um dos amigos que fazem parte do Laboratório de Associações Micorrízicas, pelo companheirismo, pela ótima convivência, por

fazer um ambiente familiar, pelo cafezinho, pelas palavras, em especial à Camila, Nayron, Nicolly e Leandro pela ajuda, pela boa vontade em ajudar sempre e por aquele tudo vai dar certo, relaxa, esquenta não, não está fácil para ninguém viu!?

À turma Padrão Genética Molecular pelas risadas, pela amizade, pelo carinho e pelos bons momentos vividos.

Aos amigos equatorianos e estrangeiros, sem distinção, pelo carinho, pelos conselhos e pelas confraternizações.

A todos aqueles que fizeram de Viçosa meu lar com seus conselhos, companhia e pela ajuda direta ou indireta durante meu trabalho meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

Maria Elizabeth Vásconez Vélez, filha de Nicolás Vásconez e Mirian Vélez, nasceu no dia 30 de janeiro de 1986 em Guayaquil, no Equador.

Em 2010 formou-se na Escola Politécnica do Exército em Quito, em Engenharia em Biotecnologia.

Em fevereiro de 2016, foi aceita como aluna não-vinculada pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e em agosto, iniciou o curso a nível de Mestrado no mesmo programa, da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa da dissertação em 27 de novembro de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	5
Capítulo 1: Produção de compostos bioativos a partir do crescimento micelial em soro de leite reconstituído acrescido de selênio	8
Resumo	8
1. Introdução	9
2. Material e métodos	11
2.1 Reativação da cultura e produção de inóculos	11
2.2 Crescimento micelial em soro de leite sem ou com adição de formas inorgânicas de selênio	11
2.3 Obtenção das frações sólida e líquida do soro de leite após o crescimento micelial	12
2.3.1 Análises realizadas na fração sólida	12
2.3.1.1 Massa seca	12
2.3.1.2 Determinação do ergosterol	13
2.3.1.3 Extração e quantificação dos β -glucanos	13
2.3.1.4 Teor de minerais, nitrogênio e enxofre	15
2.3.1.5 Determinação da capacidade antioxidante	15
2.3.2 Análises realizadas na fração líquida	15
2.3.2.1 Obtenção do extrato proteico bruto	15
2.3.2.2 Determinação da atividade da enzima β -galactosidase	16
2.3.2.3 Quantificação de proteínas solúveis	16
2.3.3 Análises realizadas nas frações sólida e líquida	16
2.3.3.1 Perfil de açúcares	16
2.4 Análises estatísticas	17
3. Resultados e discussão	18
3.1 Determinação da massa seca	18
3.2 Determinação do ergosterol	19
3.3 Extração e quantificação dos β -glucanos	21
3.4 Teor de minerais, nitrogênio e enxofre	22
3.5 Atividade da enzima β -galactosidase	24
3.6 Quantificação de proteínas solúveis	25
3.7 Determinação da capacidade antioxidante	27
3.7 Perfil de açúcares	28
4. Conclusões	33
5. Referências	34
Capítulo 2: Caracterização da enzima β -galactosidase de <i>Pleurotus djamor</i> crescido em soro de leite acrescido de selênio	39
Resumo	39
1. Introdução	41
2. Material e métodos	44

2.1 Determinação do teor de proteína.....	44
2.2 Quantificação de açúcares redutores.....	44
2.3 pH e determinação da faixa de pH ótimo	45
2.4 Temperatura de incubação e determinação da faixa de temperatura ótima	45
2.5 Estabilidade da enzima	45
2.6 Concentração do substrato enzimático e determinação de parâmetros cinéticos	46
2.7 Análises estatísticas	46
3. Resultados e discussão	47
3.1 pH e determinação da faixa de pH ótimo	47
3.2 Temperatura de incubação e faixa ótima da atividade enzimática	48
3.3 Estabilidade da enzima	49
3.4 Concentração do substrato enzimático e determinação de parâmetros cinéticos	51
4. Conclusões.....	56
5. Referências	57
CONCLUSÕES GERAIS	61

RESUMO

VÉLEZ, Maria Elizabeth Vásconez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2017. **Compostos bioativos produzidos pelo crescimento micelial de *Pleurotus djamor* em soro de leite enriquecido com selênio**. Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: José Maria Rodrigues da Luz e Marliane de Cássia Soares da Silva.

Os cogumelos e os micélios são reconhecidos como alimentos funcionais contendo compostos bioativos como, por exemplo, os β -glucanos, os compostos fenólicos e o ergosterol (Pro-vitamina D). Esses compostos apresentam propriedades imunomoduladoras, anticancerígenas e antioxidantes. Além disso, os fungos produtores de cogumelos comestíveis, tem a capacidade de bioacumular elementos traços presentes no substrato, a exemplo, de selênio que intensifica as propriedades nutricionais e bioativas da biomassa microbiana. O soro de leite é um produto secundário da indústria de laticínios e, se descartado diretamente, tem um alto potencial poluente. Esse soro pode ser aproveitado através de uma fermentação micelial, produzindo compostos bioativos e enzimas de interesse industrial como, por exemplo, a β -galactosidase (β -gal). Assim, neste estudo foi avaliada a produção de compostos bioativos e de proteínas microbianas e a caracterização da β -gal, após 25 dias de crescimento micelial de *Pleurotus djamor* PLO13, em meio líquido contendo soro de leite reconstituído sem ou com a adição de selênio. O selenito incrementou o teor de β -glucanos, ergosterol, proteínas e da capacidade antioxidante que justifica sua adição no cultivo desse fungo para propósitos nutricional e medicinal. Independente da adição de selênio, *P. djamor* foi capaz de degradar a lactose com maior taxa de degradação na presença do selenato. A atividade de β -gal apresentou estabilidade em meio ácido, neutro ou básico. O selenato e o selenito tiveram, respectivamente, efeito estimulador e o inibidor da atividade da β -gal em diferentes valores de pH, temperatura e tempo de reação. Em adição, o selênio diminui a afinidade da enzima pelo substrato, entretanto, aumentou a velocidade máxima de conversão da lactose em produto. Portanto, a adição de Se foi positiva para produção e atividade de β -gal de *P. djamor* PLO13. Os valores da constante de Michaelis-Menten (K_M) foram menores para lactose pura que para esse dissacarídeo presente no soro de leite. Assim, além da produção de compostos bioativos a síntese de β -

gal utilizando o soro de leite pode ser uma outra alternativa promissora para valorização desse produto secundário.

ABSTRACT

VÉLEZ, Maria Elizabeth Vásconez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2017. **Bioactive compounds produced by mycelial growth of *Pleurotus djamor* in whey powder enriched with selenium.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: José Maria Rodrigues da Luz and Marliane de Cássia Soares da Silva.

Mushrooms and mycelia are recognized as functional foods containing beneficial bioactive compounds, such as β -glucans, phenolic compounds and ergosterol (Pro-vitamin D). These compounds have immunomodulatory, anticancer and antioxidant properties. Furthermore, fungi that produce edible mushrooms have the ability to bioaccumulate trace elements present in the substrate, for example, selenium that enhances the nutritional and bioactive properties of the biomass. Whey powder is a by-product of the Dairy Industry and, if discarded directly, has a high polluting potential. This by-product can be used to mycelial fermentation, producing bioactive compounds and enzymes of industrial interest, such as β -galactosidase (β -gal). Thus, in this study bioactive compounds and microbial proteins production and characterization of β -gal were evaluated after 25 days of *Pleurotus djamor* PLO13 mycelial growth, in liquid medium containing reconstituted whey powder, without or with the addition of selenium. Selenite increased the level of β -glucans, ergosterol, proteins and the antioxidant activity that justifies its addition fungus growth for nutritional and medicinal purposes. Regardless of the addition of selenium, the *P. djamor* was able to degrade the lactose with higher rate of degradation in the presence of selenate. The β -gal enzymatic activity showed stability in acidic, neutral or basic medium. Selenate and selenite had, respectively, stimulatory and inhibitor effect on β -gal activity in different values of pH, temperature and reaction time. In addition, the selenium decreases the affinity of the enzyme for the substrate, but increased the maximum rate of conversion of lactose. Therefore, the addition of Se was positive for the β -gal production and activity. The values of the Michaelis-Menten constant (K_M) were lower for pure lactose than for that disaccharide present in whey powder. Thus, the production of bioactive compounds and β -gal in whey powder may be promising alternative for the valorization of this by-product.

INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos são de interesse para processos biotecnológicos como obtenção de ácidos orgânicos, antibióticos, enzimas, alimentos fermentados e também suas estruturas de reprodução sexuada, como, por exemplos, os cogumelos são consumidos diretamente na alimentação humana e animal (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016). *Pleurotus* spp são exemplos de cogumelos comestíveis que podem ser produzidos utilizando resíduos agroindustriais. Ele é um dos cogumelos mais cultivados e consumidos pelo homem por serem considerados GRAS (*generally recognized as safe*). Além disso, esse fungo apresenta características como tempos curtos de produção, facilidade de cultivo e alto valor nutritivo que justifica sua produção e comercialização (SHAO et al., 2010; CARVALHO et al., 2014; GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016)

Os cogumelos e micélios são reconhecidos como alimentos funcionais contendo compostos bioativos que quando são consumidos, tem demonstrado efeitos como, melhoramento no estado de saúde de cardíacos, diminuição do risco de incidência de câncer, modulam o funcionamento do sistema imune e ajudam no balanço dos níveis de açúcar sanguíneo (WASSER, 2002; PUTTARAJU et al., 2006; WASSER, 2011; RATHORE et al., 2017). Um desses compostos bioativos são os polissacarídeos β -glucanos, os quais são componentes estruturais das paredes celulares de cogumelos, micélios e leveduras, com efeitos imunomoduladores e antitumorais (KAVANAGH, 2011). Além deles, existem também os compostos fenólicos e ergosterol. Os primeiros têm propriedades antioxidantes e poder redutor. A suplementação de antioxidantes pode proteger o corpo humano de radicais livres e dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS) e assim, retardar o envelhecimento e o progresso de algumas doenças crônicas (GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016). O ergosterol está presente na membrana plasmática e é encontrado quase que exclusivamente em fungos (NIEMENMAA et al., 2008). Soma-se a isto, o fato de ser nutricionalmente importante porque é o precursor da vitamina D (ergocalciferol), reconhecida por regular os níveis de cálcio e de fósforo (SHAO et al., 2010; CARVALHO et al., 2014). Esses cogumelos/micélio são considerados como uma fonte alimentar por apresentarem alto conteúdo de proteína, hidratos de carbono, fibra, vitaminas e

minerais (MANZI et al., 1999). Entretanto, algumas espécies têm a capacidade de bioacumular elementos traços presentes no substrato, como o selênio (KALÁČ, 2016). Dessa forma, os cogumelos podem ter um maior valor nutricional quando elementos essenciais, como, ferro, selênio e zinco são adicionados ao substrato de crescimento (SHASHIREKHA et al., 2005; Da SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2012).

Adicionalmente, o selênio tem sido reconhecido por melhorar, a eficiência biológica, o incremento da síntese e da atividade de algumas enzimas de *Pleurotus ostreatus* e por proteger as células fúngicas de danos contra a peroxidação de lipídeos provocada em condições de estresse (SERAFÍN-MUÑOZ et al., 2007; Da SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2013). O selênio é reconhecido como um micronutriente essencial para humanos e animais sendo importante para as funções biológicas mediadas pelas selenoproteínas (RAYMAN, 2012). Além disso, tem muitas funções fisiológicas, e é mais reconhecido como antioxidante, reduzindo o dano oxidativo nas células (WERNER; BEELMAN, 2001). Os efeitos benéficos de selênio incluem ação antioxidante e anticancerígena, prevenção de doenças cardiovasculares, desintoxicação de metais pesados, melhoramento em funções cerebrais, melhoramento na reprodução e da resposta do sistema imunológico (THIRY et al., 2012).

A maioria dos estudos que relatam as propriedades medicinais dos fungos, são realizados com os corpos de frutificação. Por outro lado, o crescimento micelial está tornando-se uma alternativa, devido ao menor tempo de incubação, condições de cultura mais favoráveis e maiores rendimentos de biomassa (CARDOSO et al., 2017). O crescimento micelial de fungos filamentosos em meio líquido produz *pellets* e apresenta várias vantagens como, a facilidade de obtenção de biomassa, a baixa viscosidade do meio de cultura e um alto rendimento na produção (HILLE et al., 2009; ZHANG; ZHANG, 2016).

Um dos resíduos industriais usados para produzir *Pleurotus* sp. pode ser o soro de leite. No Brasil, no estado de Minas Gerais, a produção leiteira e o processamento de leite e derivados são consideradas como atividades importantes. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de queijos no Brasil com Inspeção Federal foi de 896 mil toneladas no ano de 2010 (IBGE, 2010). O soro de leite contém, aproximadamente, 55% dos

nutrientes do leite, proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e uma quantidade mínima de gordura. Esse soro pode ter aplicações diversas, que vão do seu uso como ingrediente alimentício à produção de medicamentos. Assim, o descarte desse soro é um desperdício nutricional (ALVES et al., 2014). Por outro lado, o soro apresenta um elevado conteúdo de substâncias orgânicas com uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (PRAZERES et al., 2012).

O aproveitamento desse subproduto como substrato para a fermentação micelial pode resultar na produção de um suplemento nutricional contendo compostos bioativos, e enzimas microbianas de interesse industrial, como por exemplo, a β -galactosidase. Essa enzima conhecida popularmente como lactase, promove a hidrólise da lactose em glicose e galactose e catalisa a transgalactosilação (JUERS et al., 2012). A utilização dessa enzima em produtos alimentícios reduz ou elimina a lactose que é um potente agente alergênico para pessoas intolerantes à lactose. Essa intolerância é ocasionada pela ausência ou baixos níveis de atividade de β -galactosidase no aparelho digestivo (ROSSETTO et al., 2013). Além disso, os produtos da hidrólise da lactose são mais solúveis e menos propensos a cristalização. Assim, a β -galactosidase é importante para minimizar os efeitos da cristalização da lactose em produtos lácteos como doce de leite e leite condensado (GROSOVÁ et al., 2008).

Na natureza, a β -galactosidase pode ser encontrada em amêndoas, pêssego e no sistema digestivo de animais, e é produzida por microorganismos, a exemplo de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SANTIAGO et al., 2004). Essas fontes microbianas são de especial interesse biotecnológico por possuírem altas taxas de multiplicação, produção e facilidade de manipulação. Em nível industrial a β -galactosidase é obtida a partir do crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* (KOSSEVA et al., 2009).

Assim, os objetivos deste estudo foram divididos em dois capítulos. No capítulo 1, foi avaliar a produção de compostos bioativos como β -glucanos, ergosterol e proteínas, além da quantificação da capacidade antioxidante e da atividade aparente da β -galactosidase produzidos por *Pleurotus djamor* PLO13, em crescimento micelial, utilizando soro de leite reconstituído, sem ou com a adição de formas inorgânica de selênio. No capítulo 2, o objetivo foi determinar

os parâmetros cinéticos de uma β -galactosidase produzida por *P. djamor* PLO13 nas mesmas condições de cultivos do capítulo 1.

Referências

- ALVES, M. P. et al. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- CARDOSO, R. V. C. et al. Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. *Food Funct.*, v. 6, p. 1–12, 2017.
- CARVALHO, L. M. et al. Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Talanta*, v. 118, p. 292–303, 2014.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 2016.
- Da SILVA, M. C. S. et al. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chemistry*, v. 131, n. 2, p. 558–563, 2012.
- GONZÁLEZ-PALMA, I. et al. Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. JUL, p. 1–9, 12 jul. 2016.
- GROSOVÁ, Z. et al. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.
- HILLE, A. et al. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 6, p. 1202–1213, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Tabela 1 – Produção e vendas dos produtos e/ou serviços industriais, segundo as classes de atividades e a descrição dos produtos – Brasil – 2010. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2010/defaulttabpdf.shtm>>. Acesso em: 8 dez. 2017.
- JUERS, D. et al. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*, v. 21, n. 12, p. 1792–1807, 2012.
- KALÁČ, P. *Edible mushrooms: Chemical composition and Nutritional Value*. 1^o ed. Londres: Academic Press, 2016.
- KAVANAGH, K. *Fungi. Biology and Applications*. In: *Fungi: Biology and Applications*. 2. ed. Maynooth: Willey-Blackwell, 2011. p. 376.
- KOSSEVA, M. R., et al. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.
- MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry*, v. 65, n. 4, p. 477–482, 1999.
- NIEMENMAA, O. et al. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *International*

- Biodeterioration and Biodegradation, v. 62, n. 2, p. 125–134, 2008.
- NUNES, R. et al. Selenium Bioaccumulation in Shiitake Mushrooms: A Nutritional Alternative Source of this Element. *Journal of Food Science*, v. 77, n. 9, p. 983–986, 2012.
- NUNES, R. et al. Regulation of Respiratory and Ligninolytic Enzyme Activity of *Lentinula edodes* by Selenium. *Advances in microbiology*, v. 3, n. December, p. 31–36, 2013.
- PRAZERES, A. R. et al. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 110, p. 48–68, 2012.
- PUTTARAJU, N. G. et al. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 26, p. 9764–9772, 2006.
- RATHORE, H. et al. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition*, v. 5, n. 2, p. 35–46, 2017.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. *The Lancet*, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.
- ROSSETTO, B. et al. Determinação da Atividade da Enzima B-galactosidase por Lactose do Soro de Queijo. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, n. 2, p. 28–32, 2013.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004.
- SERAFÍN-MUÑOZ, A. H. et al. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. *Mycological Research*, v. 3, n. 5, p. 626–632, 2007.
- SHAO, S. et al. Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58, n. 22, p. 11616–11625, 2010.
- SHASHIREKHA, M. et al. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chemistry*, v. 92, n. 2, p. 255–259, 2005.
- THIRY, C. et al. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry*, v. 130, n. 4, p. 767–784, 2012.
- WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, n. 3, p. 258–274, 2002.
- WASSER, S. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 5, p. 1323–1332, 2011.
- WERNER, A.; BEELMAN, R. Growing selenium-enriched mushrooms as ingredients for functional foods or dietary supplements. *International journal*

of medicinal mushrooms, v. 3, p. 247, 2001.

ZHANG, J.; ZHANG, J. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 6, p. 1066–1077, 2016.

Capítulo 1: Produção de compostos bioativos a partir do crescimento micelial em soro de leite reconstituído acrescido de selênio

Resumo

Os cogumelos e micélios são reconhecidos como alimentos funcionais contendo compostos bioativos como, os β -glucanos, os compostos fenólicos e o ergosterol, com propriedades imunomoduladoras, anticancerígenas e antioxidantes. Algumas espécies de fungos conseguem bioacumular elementos traços presentes no substrato. Assim, os cogumelos adquirem maior valor nutricional quando elementos essenciais como, selênio, ferro, e zinco são adicionados ao substrato de crescimento. Além do selênio ser um micronutriente essencial, tem sido reconhecido por afetar positivamente na eficiência biológica, no incremento da síntese e atividade de algumas enzimas de *Pleurotus* sp. e por proteger as células fúngicas de danos contra a peroxidação de lipídeos provocada em condições de estresse. O aproveitamento do soro de leite, como um meio líquido para a fermentação micelial, é uma alternativa para aproveitar esse subproduto da Indústria de Laticínios, e produzir um suplemento nutricional com compostos bioativos de interesse medicinal. Assim, neste estudo foi testada a produção de compostos bioativos, capacidade antioxidante, proteínas, β -galactosidase e açúcares, após 25 dias de crescimento micelial de *P. djamor* PLO13 em meio líquido sem ou com selênio. O selenito de sódio incrementou o teor de ergosterol, de β -glucanos e da atividade antioxidante. O micélio obtido degradou toda a lactose após 25 dias de crescimento, porém o extrato proteico bruto ainda continha lactose. Os resultados das análises realizadas mostram que o micélio pode ser considerado como um suplemento alimentício por apresentar β -glucanos, ergosterol, compostos antioxidantes, proteínas e minerais.

1. Introdução

Os fungos são de interesse biotecnológico, pois podem produzir ácidos orgânicos, antibióticos, enzimas e alimentos fermentados. Além disso, os cogumelos podem ser consumidos diretamente (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016). As espécies de *Pleurotus* spp. são opções de cogumelos comestíveis que crescem naturalmente em resíduos agroindustriais (SHUKLA; JAITLEY, 2011). Os cogumelos e os micélios são reconhecidos como alimentos funcionais contendo compostos bioativos, que melhoram o estado de saúde de cardíacos, diminui o risco de incidência de câncer, modulam o funcionamento do sistema imune e ajudam no balanço dos níveis de açúcar sanguíneo (PUTTARAJU et al., 2006; WASSER, 2011; RATHORE et al., 2017). Um desses compostos são os polissacarídeos beta-glucanos, os quais são componentes estruturais das paredes celulares de cogumelos, micélio e leveduras, com efeitos imunomoduladores e antitumorais (KAVANAGH, 2011). Além desses polissacarídeos, existem nos fungos compostos fenólicos e ergosterol. Os primeiros têm propriedades antioxidantes e poder redutor, os quais podem proteger o corpo humano de radicais livres e dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS) e, assim, retardar o envelhecimento e o progresso de algumas doenças crônicas (GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016). O ergosterol está presente na membrana citoplasmática e é encontrado quase que exclusivamente em fungos (NIEMENMAA et al., 2008), e é o precursor da vitamina D (ergocalciferol), reconhecida por regular os níveis de cálcio e de fósforo (SHAO et al., 2010; CARVALHO et al., 2014).

Algumas espécies de fungos têm a capacidade de bioacumular elementos traços presentes no substrato (KALÁČ, 2016). Dessa forma, os cogumelos podem ter um maior valor nutricional quando elementos essenciais, como, selênio, ferro e zinco são adicionados ao substrato de crescimento (SHASHIREKHA et al., 2005). O selênio é reconhecido como um micronutriente essencial para humanos e animais sendo importante para as funções biológicas mediadas pelas selenoproteínas. Os cogumelos enriquecidos com esse mineral podem ser considerados como uma fonte de selênio orgânico para os humanos, com elevada biodisponibilidade (Da SILVA et al., 2010; Da SILVA et al., 2012). Os efeitos benéficos de selênio incluem ação antioxidante e anticancerígena, prevenção de

doenças cardiovasculares, desintoxicação de metais pesados, melhora as funções cerebrais, a reprodução e a resposta do sistema imunológico (THIRY et al., 2012). O selênio tem sido reconhecido por afetar positivamente a eficiência biológica, no aumentar a síntese e atividade de algumas enzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus* e por proteger as células fúngicas de danos contra a peroxidação de lipídeos provocada em condições de estresse (SERAFÍN-MUÑOZ et al., 2007; Da SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2013).

A maioria dos estudos que relatam as propriedades medicinais dos fungos, são realizadas com os corpos de frutificação. Por outro lado, o crescimento micelial está se tornando uma alternativa, principalmente devido ao menor tempo de incubação, condições de cultura mais favoráveis e maiores rendimentos de biomassa (CARDOSO et al., 2017). O crescimento micelial em meio líquido produz *pellets* e apresenta vantagens como, a facilidade de obtenção de biomassa, a baixa viscosidade do meio de cultura e um alto rendimento na produção (HILLE et al., 2009; ZHANG; ZHANG, 2016).

Um substrato que pode ser utilizado para o crescimento micelial é o soro do leite. No Brasil, no estado de Minas Gerais, são consideradas como atividades importantes à produção leiteira e ao processamento de leite e derivados. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de queijos no Brasil com Inspeção Federal foi de 896 mil toneladas no ano de 2010 (IBGE, 2010). Devido ao elevado conteúdo de substâncias orgânicas presentes no soro de leite, associado principalmente à presença de lactose e proteínas, o seu poder poluente é considerado alto, com uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (PRAZERES et al., 2012). O soro de leite representa de 80 a 90% do volume total do leite utilizado durante a produção de queijos e contém, aproximadamente, 55% dos nutrientes do leite: proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e uma quantidade mínima de gordura. Portanto seu descarte é considerado como um desperdício nutricional e financeiro (ALVES et al., 2014).

O aproveitamento desse subproduto como substrato para a fermentação micelial pode resultar na produção de um suplemento nutricional contendo compostos bioativos, minerais e enzimas microbianas de interesse industrial, dentre elas a β -galactosidase. Essa enzima, conhecida popularmente como lactase promove a hidrólise da lactose em glicose e galactose e catalisa a

transgalactosilação (JUERS et al., 2012). As duas principais aplicações industriais dessa enzima são remover a lactose do leite e produzir galacto-oligosacarrídeos (GOS), mediante a transgalactosilação (HSU et al., 2005).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de compostos bioativos, como β -glucanos e ergosterol, bem como determinar a capacidade antioxidante e atividade da β -galactosidase, quando *Pleurotus djamor* PLO13, foi crescido em soro de leite reconstituído, sem ou com a adição de formas inorgânicas de selênio.

2. Material e métodos

2.1 Reativação da cultura e produção de inóculos

Neste estudo foi utilizado o isolado PLO13 de *Pleurotus djamor* que pertence à Micoteca do Laboratório de Associações Micorrízicas/Departamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO/ Universidade Federal de Viçosa - UFV. O isolado é mantido em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a 4 °C.

Para reativação da cultura um fragmento de micélio do isolado foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo 20 mL de BDA e incubadas a 25 °C por 20 dias. Esses novos micélios foram utilizados como inóculo no meio cultura líquido contendo soro de leite.

2.2 Crescimento micelial em soro de leite sem ou com adição de formas inorgânicas de selênio

O soro de leite em pó foi adquirido de laticínios do estado de Minas Gerais (CECOTI *food services*).

O meio de cultura foi preparado em uma proporção 1:9 (massa/volume) de soro de leite em pó e água potável. Para isso, 15 gramas do soro de leite em pó foram colocados em Erlenmeyer (250 mL) juntamente com 135 mL de água. Essa mistura foi esterilizada por calor úmido a 121 °C por 20 minutos em autoclave comercial. Após o resfriamento, quatro discos de ágar (1 cm de diâmetro) contendo o micélio de *P. djamor* foram inoculados em 21 frascos. Três frascos foram utilizados como controle negativo do crescimento micelial e não foram inoculados.

Para o preparo do meio de cultura enriquecido com selênio foi preparada uma solução de selenito de sódio e outra de selenato de sódio, ambas a 1 g L^{-1} . Essas soluções foram filtradas em membrana ($2 \mu\text{m}$) antes da adição no meio de cultura. Em sete Erlenmeyer contendo meio de cultura líquido e o inóculo de PLO13 foram adicionados 1,80 mL da solução de selenito de sódio para uma concentração final de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de selênio. Esse mesmo procedimento foi realizado com a solução de selenato de sódio. Além dos três frascos controle sem inoculação do fungo, em sete frascos inoculados com micélio não foram adicionadas nenhuma forma química de selênio.

Em seguida, os 21 frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm, a 25-28 °C, durante 25 dias.

A concentração de selênio adicionada no soro de leite foi baseada no estudo de enriquecimento de cogumelo *Pleurotus ostreatus* com esse elemento (Da SILVA et al., 2012). Nesse estudo foi observado que a concentração de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de selênio não provoca inibição do crescimento micelial em placa de Petri com meio de cultura BDA e em substrato contendo resíduos agroindustriais.

2.3 Obtenção das frações sólida e líquida do soro de leite após o crescimento micelial

Após o período de incubação, o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrados em funil com papel de filtro. A parte sólida foi recolhida e submetida a quatro lavagens em água deionizada para eliminação do soro de leite na superfície do micélio.

O volume obtido da parte líquida foi mensurado em proveta analítica e 14 mL de cada amostra foram adicionados em tubos plásticos de 15 mL de capacidade. Esses tubos foram mantidos a 4 °C até a realização das análises.

2.3.1 Análises realizadas na fração sólida

2.3.1.1 Massa seca

Após as lavagens, os micélios foram adicionados em cadinhos de porcelana com massa conhecida. Esses cadinhos foram transferidos para estufa a 60 °C. A massa dos cadinhos com o micélio foi determinada em balança analítica após atingir massa constante. A massa seca foi determinada pela diferença entre as

massas dos cadinhos antes da secagem e após a massa constante. Essa massa seca foi utilizada para determinação dos teores de ergosterol, β -glucanos e minerais.

2.3.1.2 Determinação do ergosterol

O crescimento micelial foi monitorado pelo teor de ergosterol que foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme descrito por Richardson e Logendra (1997). Esse composto também foi utilizado como referência para determinar a capacidade de *P. djamor* de produzir e acumular pró-vitamina D em meio de cultura contendo soro de leite.

Para extração e quantificação desse lipídio da membrana do fungo um grama da massa seca micelial foi triturado com 2 g de areia lavada por 10 min em cadinhos de porcelana, previamente lavados com três enxágues sequenciais com solução de etanol (95 % v/v) e deixados na estufa a 70 °C por 12 horas.

As amostras trituradas foram transferidas para tubos de centrifuga contendo 0,15 g de polivinilpirrolidona e 3 mL de solução de etanol. Esses tubos foram centrifugados por 20 min a 5000 g. O sobrenadante recolhido foi armazenado no escuro a 4 °C. Para quantificação, 20 μ L do sobrenadante foi injetado na coluna RP-C18 (Kinetex C18 250x4,6mm, 5 μ m Phenomenex Califórnia, USA) do aparelho de HPLC. As amostras foram eluídas com um fluxo de 1 mL min⁻¹ de metanol puro e a detecção foi feita a 280 nm. O tempo de retenção e o tempo de corrida do ergosterol foram respectivamente de 3 e 15 min.

Para a curva padrão foi preparada uma solução de 1% de ergosterol diluído em etanol (95 % v/v).

2.3.1.3 Extração e quantificação dos β -glucanos

Os β -glucanos foram determinados pelo método enzimático descrito por Park e colaboradores (2003) com modificações. Para isso, um grama da massa seca foi triturado em cadinhos de porcelana durante 10 min e transferido para Erlenmeyer (125 mL de capacidade) contendo 10 mL de tampão fosfato (80 mol L⁻¹ e pH 6,0).

Em seguida, as amostras foram submetidas a uma série de hidrólises enzimática, térmica e por solventes químicos. Primeiramente, foram adicionados

150 µL de α-amilase termostável nos frascos e os mesmos foram incubados por 30 min a 100 ± 5 °C em banho-maria. Após o resfriamento, foram adicionados em cada frasco 150 µL de protease bacteriana e incubou-se novamente por 30 min a 60 °C. No fim desse período de incubação, o pH foi ajustado a 7,5 e prosseguiu-se com a adição de 450 µL de amiloglicosidase. Essa mistura foi incubada por 30 min a 60 °C e, em seguida, o pH foi ajustado a $4 \pm 0,5$.

Para a solubilização dos β-glucanos, foram adicionados aos frascos 5 mL de álcool etílico (95 % v/v) e as amostras foram incubadas por 60 min a 60 °C. Depois, foram adicionados nos frascos 15 mL da solução de álcool etílico e acetona (80% v/v). Após esta etapa, o sobrenadante foi evaporado durante 60 min a 100 °C em banho-maria. Para evaporar o excedente da solução de etanol/acetona, os frascos ficaram abertos na capela de exaustão por 60 min. Em seguida, adicionou-se 2 mL de solução de ácido sulfúrico (95 % v/v). Essa mistura foi incubada a 100 ± 5 °C por 2 h e mantida em repouso a 25 °C por 12 h.

Os β-glucanos foram ressuspensos em 10 mL de água destilada. Essa suspensão foi incubada por 2 h em banho-maria a 100 ± 5 °C. Por fim, as amostras foram filtradas em papel de filtro.

A determinação dos teores de β-glucanos foi realizada pela quantificação de açúcares redutores pelo método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fenol conforme descrito por Miller (1959). Para isso, em um tubo de ensaio, contendo 0,5 mL da solução de DNS-fenol, foram adicionados 0,5 mL das amostras da extração de β-glucanos. Essa mistura foi incubada por 5 min a 100 ± 5 °C. Após resfriamento, o volume dos tubos foi completado para 3 mL com água deionizada. A determinação da absorvância foi realizada no espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60) a 540 nm.

Para estimativa dos teores de açúcares redutores, uma curva padrão foi preparada a partir de uma solução de glicose (0,1% m/v).

O cálculo dos β- glucanos foi realizado a partir da equação, descrita por Park e colaboradores 2003.

$$\beta\text{- glucanos (mg/100 g)} = (\text{glicose (mg)} \times 0,9) \times 100$$

2.3.1.4 Teor de minerais, nitrogênio e enxofre

O teor de minerais presente na massa seca micelial de *P. djamor* PLO 13 foi realizado no Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda. Conforme metodologia padrões descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (1990). O nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl. Os outros minerais analisados foram determinados após a digestão nitroperclórica. A concentração de cálcio, cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco foi detectada por espectrometria de absorção atômica (Varian Mod, Spect. A 20). A quantificação de fósforo, enxofre e potássio também foi realizada, respectivamente, em espectrofotômetro (CELM Mod. E225 D) a 725 nm, 420 nm e fotometria com emissão de chama (Micronal Mod. B 462).

2.3.1.5 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi realizada por método colorimétrico a 517 nm com 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) (GONZÁLEZ-PALMA et al., 2016). Para isso, 250 mg da massa seca foi triturada com 5 mL de metanol 80%. Após centrifugação a 4000 rpm por 20 min, 1 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL de DPPH e 1 mL de metanol 80% e foram incubados no escuro, por 15 min. A curva padrão foi feita com DPPH 0,06 mmol L⁻¹, butil-hidroxitolueno (BHT, 1 g L⁻¹) e metanol 80%. O cálculo da capacidade oxidante foi realizado a partir da equação descrita por (KULISIC et al., 2004).

Capacidade antioxidante % = $(Abs(t_0) - Abs(t_f) / Abs(t_f))$, sendo:

Abs (t₀) = Absorvância inicial do DPPH

Abs (t_f) = Absorvância da amostra contendo DPPH após 15 min incubação

2.3.2 Análises realizadas na fração líquida

2.3.2.1 Obtenção do extrato proteico bruto

O extrato proteico bruto (EPB) foi obtido como descrito no item 2.3 após a filtração para a obtenção das frações líquida e sólida. O EPB foi constituído de 14 mL do permeado de cada amostra. Esse extrato foi utilizado para determinação da

atividade da β -galactosidase, quantificação de proteínas solúveis, atividade antioxidante e perfil de açúcares por HPLC (INPI - UFV, 2016).

2.3.2.2 Determinação da atividade da enzima β -galactosidase

A atividade da β -galactosidase foi determinada pelo método colorimétrico a 420 nm utilizando como substrato enzimático 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (SHLOUL et al., 2017). Para isso, 0,1 mL do EPB foi adicionado em tubos de ensaio juntamente com 0,4 mL de ONPG e 0,5 mL de tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH=4,0). Essa mistura foi incubada a 37 °C por 15 min. Posteriormente, o volume do tubo foi completado para 2 mL com uma solução de carbonato de sódio ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$).

2.3.2.3 Quantificação de proteínas solúveis

A quantificação de proteínas solúveis foi realizada por método colorimétrico a 595 nm (BRADFORD, 1976). Para isso, 50 μL de EPB foram adicionados a tubos de ensaio contendo 500 μL do reagente de Bradford e 1450 μL de água destilada. A curva padrão foi construída com soro albumina bovino 0,1 % m/v (em concentrações de 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1 g L^{-1}).

2.3.3 Análises realizadas nas frações sólida e líquida

2.3.3.1 Perfil de açúcares

Para o perfil de açúcares foi utilizado o EPB e o filtrado obtido na extração dos β -glucanos (item 2.3.1.3). De cada amostra foram utilizados 0,6 mL com 0,4 mL de água ultrapura filtrada. A identificação e quantificação de carboidratos foi realizada por HPLC utilizando uma coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H, $9\mu\text{m} \times 7.8 \text{ mm}$, Bio-Rad, Munich, Germany), fluxo de isocrático de uma solução de ácido sulfúrico (5 mmol L^{-1}) e detector de índice de refração. Como padrões foram utilizadas solução de 1% (m/v) de frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, N-acetil glicosamina e sacarose em concentrações de 0,001;

0,003; 0,005; 0,007 g L⁻¹. O volume de injeção na coluna foi de 20 µL para as amostras e padrões.

2.4 Análises estatísticas

O experimento foi realizado com sete repetições por tratamento que foram caracterizados pela ausência (controle) e presença de selênio na forma de selenito ou selenato de sódio. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sigma Plot 12 (versão gratuita).

3. Resultados e discussão

3.1 Determinação da massa seca

P. djamor foi capaz de crescer e produzir biomassa em meio de cultura líquido contendo soro de leite independente da adição de selênio (Figura 1). Nessa fermentação foi observado a formação de *pellets* que foram depositados no fundo do frasco. Esses *pellets* foram utilizados na quantificação da biomassa seca que teve influência da concentração e da forma de selênio adicionado ao substrato.

A biomassa seca produzida por *P. djamor* cultivado com selenato de sódio foi maior que aquela produzida em selenito e não apresentou diferenças ($p < 0,05$) do controle (Figura 1). Além disso, observou-se uma redução de 1/3 da massa seca do micélio para o tratamento com selenito comparado com o controle. Isso mostra que a forma de selênio tem efeito distinto durante o crescimento do fungo conforme, como observado por Nunes (2005) e Da Silva e colaboradores (2012).

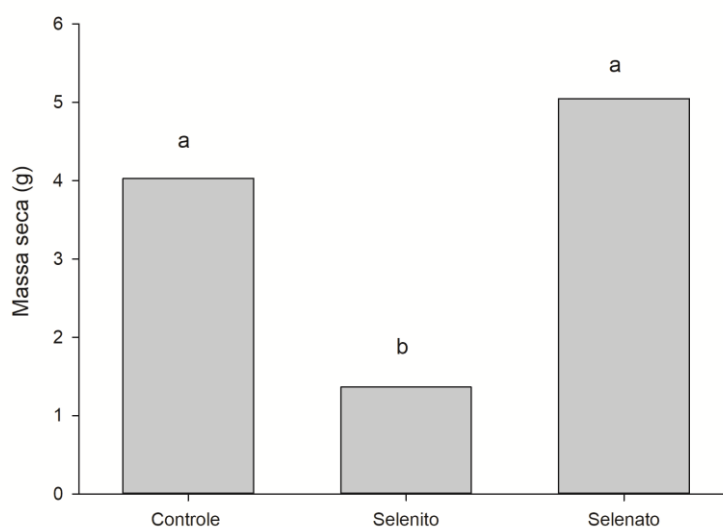


Figura 1. Massa seca de *Pleurotus djamor* PLO13 obtida após 25 dias de crescimento micelial em meio soro de leite sem ou com a adição de 12,5 mg L⁻¹ de selênio na forma de selenito e selenato de sódio. As barras seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2 Determinação do ergosterol

A determinação de ergosterol mostrou que *P. djamor* PLO13 crescido em soro de leite produziu biomassa, mas dependendo da forma de selênio, esse mineral afetou de forma distinta as quantidades de ergosterol (Figura 2). Na forma de selenito, esse elemento não influenciou no teor desse composto quando comparado com soro sem adição do mesmo ($p < 0,05$). Entretanto, houve uma redução de 1/3 na concentração de ergosterol na forma de selenato. Esse resultado mostra que o selenato teve efeito inibitório na produção de ergosterol e na biomassa. O ergosterol é um dos componentes da membrana celular de fungos e a determinação de seu conteúdo pode ser utilizada para avaliar a biomassa fúngica (Da LUZ, 2009).

Da Luz e colaboradores (2013) observaram em cogumelos de *Pleurotus ostreatus* PLO6 cultivado em resíduos de pinhão-manso, valor de ergosterol similar ($60,1 \mu\text{g g}^{-1}$) ao obtido no soro de leite sem ou com a adição de Se na forma de selenito. Niemenmaa e colaboradores (2008), obtiveram, em cultivo do fungo da podridão branca *Phlebia radiata* em meio líquido, crescidos por 21 dias, conteúdo de ergosterol cerca de 10 vezes maior que o teor desse composto observado neste estudo em *P. djamor* (Figura 2). Além disso, outros autores têm mostrado que o conteúdo desse lipídio varia com o tempo de incubação, fases de crescimento, composição do meio, estado físico do meio de cultivo, condições de crescimento e espécies fúngicas (GAO et al., 1993; BARAJAS-ACEVES et al., 2002; NIEMENMAA et al., 2008).

O selenito aumentou a concentração de ergosterol em relação ao selenato (Figura 2), mas feito distinto foi observado na atividade de β -galactosidase (Figura 4). Provavelmente cada forma de Se tem ação diferente em cada organismo e condições de cultivo, incluindo variação na fonte de carbono (MADIGAN et al., 2015). O selenito de sódio provocou uma redução na extensão da hifa e um aumento no diâmetro das colônias (NUNES, 2005). Segundo esses autores o aumento do diâmetro foi mais rápido nos fungos cultivados em baixa concentração de selenito. Entretanto, Da Silva e colaboradores (2013) mostraram o efeito tóxico de selenito em concentração superior a $24,5 \text{ mg L}^{-1}$ na produção de biomassa de *Pleurotus* sp. Assim, dependendo da forma e da concentração, o selênio exerce um efeito distinto sobre o crescimento fúngico, neste estudo esse

efeito foi positivo na forma de selenito e negativo para selenato considerando a produção de ergosterol por *P. djamor* em soro de leite. Além disso, Serafín-Muñoz e colaboradores (2007) estudando a capacidade protetiva do selênio contra danos oxidativo causados por cádmio e prata em *P. ostreatus* observaram que o dióxido de selênio reduz a incorporação desse metal pesado pelo fungo e o trióxido de selênio não tem nenhum efeito benéfico.

Em vegetais, as formas de selênio também exercem efeito distinto. Segundo Molnár e colaboradores (2018) o acúmulo de selênio em mostarda exerceu efeitos tóxicos no crescimento da planta e, dependendo da concentração o selenato pode diminuir a massa seca. Em contraste, a suplementação de selenato de sódio em plantas de canola durante a fase vegetativa e reprodutiva do crescimento em condições de estufa mostrou que a adição de selênio resultou em um aumento significativo da produção de matéria seca das partes vegetativas (HAJIBOLAND et al., 2012). Também observaram maior taxa de fotossíntese, carboidratos e teor de proteína nas folhas em plantas tratadas com Se, em comparação com o controle. Sugerindo um efeito benéfico dessa forma de selenio sobre o rendimento de sementes de canola (HAJIBOLAND et al., 2012).

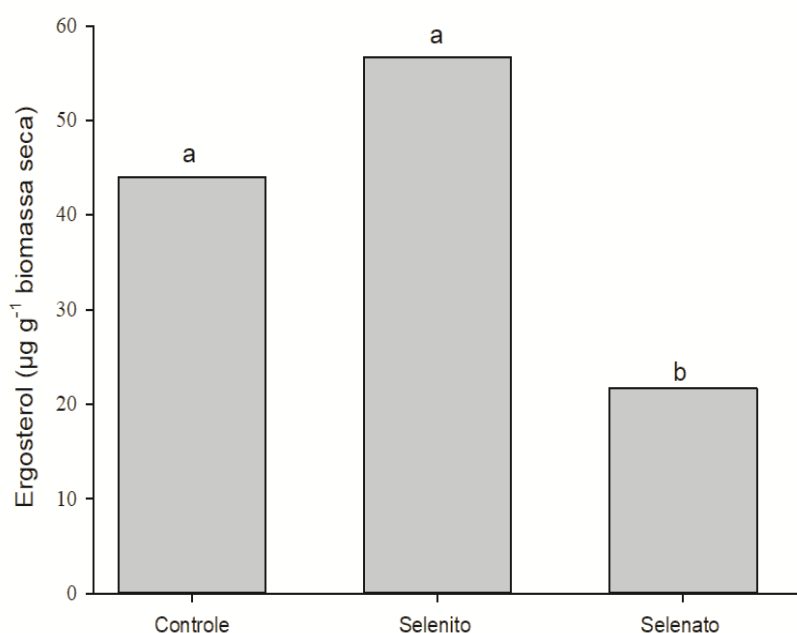


Figura 2. Teor de ergosterol em micélio de *Pleurotus djamor* PLO13, crescido em soro de leite sem (controle) e com adição de 12,5 mg L⁻¹ de selênio na forma de selenito ou selenato. As barras seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.3 Extração e quantificação dos β -glucanos

A produção de β -glucanos foi observada nos micélios de *P. djamor* PLO13 cultivado em soro de leite sem ou com selênio (Figura 3). O selenito e o selenato provocaram, respectivamente, um incremento de 2 vezes e uma redução de cerca da metade na quantidade desse polissacarídeo da parede fúngica comparado com o controle (Figura 3). Esse resultado confirma o efeito distinto de formas de Se sobre o crescimento fúngico.

Independente da presença de Se foi observada uma correlação positiva de Pearson ($r = 0,9247$) entre o teor de β -glucanos e ergosterol/biomassa. Esse efeito linear positivo entre esses compostos era esperado, uma vez que o ergosterol é um dos componentes da membrana celular e esses açúcares compõem a parede celular de fungos. Assim, ambos podem ser monitorados para quantificação do crescimento fúngico.

Os teores de β -glucanos, no soro de leite puro e no soro de leite com selenito foram, respectivamente, menores e similares ao conteúdo desse composto observado em cápsulas comerciais contendo micélio e cogumelo de *P. ostreatus* e *P. eryngii* (MCCLEARY; DRAGA, 2016). Assim, a produção β -glucanos em soro de leite com adição de selenito de sódio apresenta concentração similar aos valores observados em produtos comerciais, o que é um potencial uso desse soro e da adição do selênio nos substratos de cultivo para produção desse composto bioativo. Além disso, o cultivo micelial em meio líquido para obter β -glucanos é de maior interesse que o cultivo sólido, devido ao menor tempo de obtenção desse polissacarídeo em relação a produção de corpos de frutificação (ELISASHVILI et al., 2004). Segundo esses autores, a produção β -glucanos em cultivo sólido demora de 2 a 3 meses, enquanto, a produção micelial desse composto em soro de leite com *P. djamor* leva cerca de 25 dias (Figura 1).

O conteúdo de β -glucano em *P. djamor* obtido por Sari e colaboradores (2017) foi de $21,7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de biomassa, coincidindo com valor observado no controle ($22,57 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, Figura 3). O valor de β -glucano obtido com o selenito de sódio foi duas vezes maior que com o controle. Assim, pode representar uma alternativa para incrementar a biomassa micelial, por consequente, a produção de β -glucanos que são de interesse nutricional e medicinal.

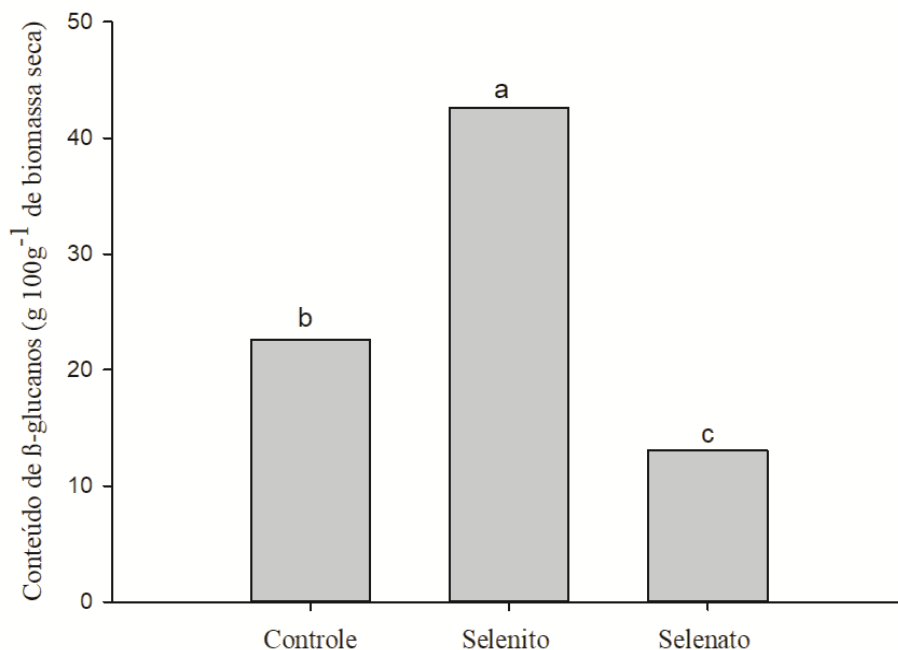


Figura 3. Conteúdo de β -glucanos em micélio de *Pleurotus djamor* PLO13, crescido em soro de leite sem (controle) e com adição de 12,5 mg L⁻¹ de selênio na forma de selenito ou selenato. Barras seguida da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.4 Teor de minerais, nitrogênio e enxofre

Os teores de elementos encontram-se dentro da faixa com aqueles observados no micélio de *P. ostreatus* (Tabela 1) (WU; HANSEN; 2009).

O micélio absorveu alguns desses elementos, uma vez que foi observado uma redução na concentração dos mesmos antes e após o desenvolvimento do fungo no soro de leite. Kalač (2016) mostrou que fungos produtores de cogumelos são capazes de bioacumular elementos traços presente no substrato de crescimento. Nunes e colaboradores (2012) mostraram que o conteúdo o selênio aumentava no cogumelo Shiitake, conforme as concentrações presentes na água de choque, mas em altas concentrações ele provoca a inibição do crescimento fúngico. O lítio, adicionado no substrato de cultivo de *Pleurotus ostreatus* também foi acumulado no cogumelo (ASSUNÇÃO et al., 2012). Assim, a absorção e o acúmulo de minerais no micélio de *P. djamor* (Tabela 1) corrobora com os resultados desses autores.

Os elementos analisados são importantes para a alimentação humana devido a suas funções fisiológicas e para o metabolismo microbiano. Alguns dos minerais encontrados presentes no micélio de *P. djamor* PLO13 tem funções importantes, como por exemplo o cálcio é requerido para a formação dos ossos, funcionamento do sistema nervoso. O zinco é cofator de enzimas envolvidas na síntese de proteína, replicação do material genético e tem também função importante no desenvolvimento fetal. O ferro é necessário para a formação de hemoglobina nos glóbulos vermelhos do sangue para o transporte do oxigênio dos pulmões para as células do corpo (GHARIBZAHEDI et al., 2017). Os íons enxofre, fósforo e potássio além de estimular o desenvolvimento de *Pleurotus* spp. também são muito importantes para o metabolismo de animais. Além disso, para um melhor desenvolvimento micelial, os cátions de elementos traço como cálcio, zinco, manganês, ferro, cobre e molibdênio são adicionados no substrato de cultivo (CHANG; MILES, 2004).

Tabela 1. Composição de minerais no meio soro de leite sem inoculação do isolado PLO 13 de *Pleurotus djamor* e no micélio desse fungo crescidos em soro de leite sem selênio (controle) ou com adição de 12,5 mg L⁻¹ de selênio na forma de selenito de sódio ou selenato de sódio.

Minerais	Meio soro de leite	Micélio			Valores observados para micélio de <i>Pleurotus</i> sp*
		Controle	Selenito de sódio	Selenato de sódio	
----- g Kg ⁻¹ -----					
P	6,1	6,6	7,2	14,3	13,4 - 31,07
K	8,4	13,2	14,4	12	9,2 - 17,77
Ca	14,8	27,5	17,5	23,4	2,86 - 56,94
Mg	0,8	0,8	1	1,4	1,09 - 1,33
Zn	0,005	0,006	0,005	0,007	0,022 - 0,039
Fe	0,461	0,014	0,024	0,030	0,037 - 0,31
Mn	0,003	0	0	0	-
Cu	0,003	0,001	0,001	0,001	-
N	74	28	29	25	-
S	4,9	2,5	3,2	2,6	-

* (WU; HANSEN, 2009)

Portanto, o micélio de *P. djamor* PLO13 consegue absorver elementos como, por exemplo, cálcio, ferro, magnésio, potássio e zinco do soro de leite utilizado como substrato de cultivo. Esse resultado é importante para utilização desse soro miceliado na nutrição humana e pode ser uma alternativa promissora

para o reaproveitamento desse resíduo da Industrial de laticínios.

3.5 Atividade da enzima β -galactosidase

A β -galactosidase de *P. djamor* não teve diferença ($p < 0,05$) na atividade específica quando cultivado em soro de leite puro ou com adição de selenato de sódio (Figura 4). Esse resultado mostra que o selenato não influencia a atividade específica nas condições de cultivo analisadas e utilizando como substrato enzimático o ONPG. Entretanto, o selenito atuou como inibidor da atividade enzimática dessa enzima em diferentes condições de pH, temperatura, concentração de açúcares e tempo de reação (Veja o capítulo 2). Na atividade de fenoxidase e peroxidase também foi observado um efeito inibidor de selenito (NOWAK et al., 2004). Além disso, Nunes e colaboradores (2013) observaram que o selenito de sódio não inibiu a atividade das enzimas hidrolíticas, mas estimulou a atividade de lacase no crescimento de *Lentinula edodes* em serragem de eucalipto. Portanto, as formas inorgânicas de selênio têm diferentes efeitos sobre a atividade das enzimas e esses efeitos dependem da enzima e do substrato enzimático.

A atividade específica de β -galactosidase de *P. djamor* foi menor que a atividade dessa enzima produzida por *Aspergillus* spp. utilizando soro de leite (KAUR et al., 2015, ROSSETTO et al., 2013). Entretanto, no estudo de Kaur e colaboradores (2015) a atividade dessa enzima foi variável em função do tipo de método físico de extração e do tempo de incubação. A menor atividade da β -galactosidase de *P. djamor* e dessa enzima comercial pode ser explicada pelo grau de pureza. Nossa atividade foi medida no extrato bruto, enquanto a β -galactosidase comercial passa por uma série de etapas de purificação e concentração. Além disso, a atividade da β -galactosidase comercial pode ser alterada em função da variação de pH e da temperatura (ROSSETTO et al., 2013). Assim, além da origem da enzima, as mudanças nos parâmetros cinéticos, por exemplo, pH, temperatura e concentração e tipo de substrato, afetam a atividade da β -galactosidase.

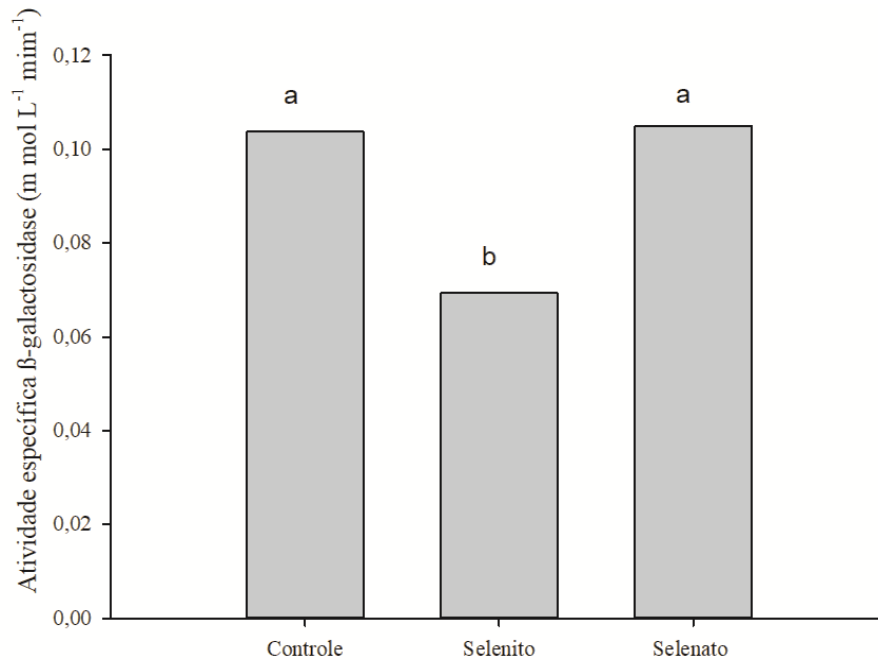


Figura 4. Atividade específica da β-galactosidase produzida pelo crescimento micelial de *Pleurotus djamor* PLO13 em soro de leite, sem (controle) ou com adição de 12,5 mg L⁻¹ de selênio na forma de selenito ou selenato de sódio. Essa atividade foi realizada em pH 4, 37 °C e utilizando o ONPG como substrato enzimático. As barras seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.6 Quantificação de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis foi menor no soro de leite após inoculação de *P. djamor* que nesse resíduo antes do crescimento micelial (Figura 5). Esse resultado é importante pois mostra a capacidade desse fungo em degradar as proteínas presentes no soro de leite e produzir proteínas microbianas, contendo aminoácidos essenciais.

O interesse pelo cultivo em meio líquido de fungos comestíveis e medicinais deve-se aos componentes celulares como, metabólitos secundários, polissacarídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros que estão presentes nos corpos de frutificação, micélio e meio líquido obtido após o crescimento micelial (WASSER, 2010). Além disso, Yadav e colaboradores (2014) testaram o cultivo de *Kluyveromyces marxianus* utilizando soro de leite, com variação na concentração inicial do inóculo. Esses autores obtiveram teores de proteínas entre 3800-4000 mg L⁻¹ e uma redução da demanda química de oxigênio (DQO) e da lactose em função da concentração inicial de inóculo. Isso é

interessante para considerar a fermentação de micro-organismos no soro de leite, como alternativa de tratamento ambiental, reduzindo a DQO. Esses autores também mostraram mediante eletroforese (SDS-PAGE), que as proteínas do soro de leite fermentadas são diferentes das proteínas iniciais.

O soro de leite utilizado para o crescimento de *P. djamor* apresenta teores de proteínas solúveis cerca de 2,29 mg L⁻¹. Na composição química típica do soro de leite apresenta lactose, lipídeos, minerais e proteínas variando de 6-10 g L⁻¹ (PANESAR; KENNEDY, 2012). Entretanto, o baixo teor de proteína solúvel na fração líquida (Figura 5) pode ser devido à retenção dessa biomolécula na fração sólida (Tabela 1). Nota-se alta concentração de nitrogênio obtidos na fração retida no filtro. Além disso, esses resultados mostram a degradação micelial de proteínas animais e a conversão das mesmas em proteínas microbianas (Figura 5). As proteínas microbianas apresentam todos os aminoácidos essenciais para humanos, tem maior disponibilidade que as animais e não contém teores de colesterol.

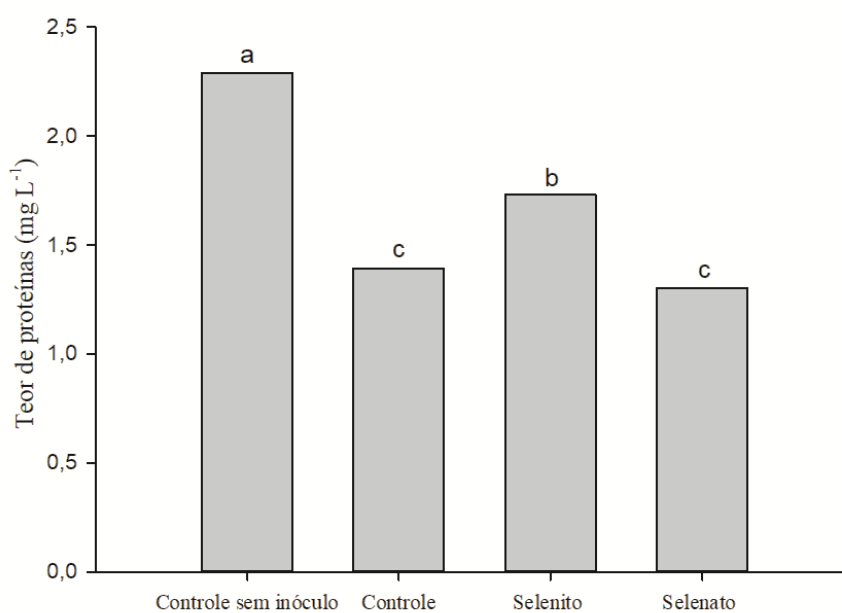


Figura 5. Quantificação do teor de proteínas solúveis no EPB, no meio soro de leite (controle sem inóculo) e no micélio de *Pleurotus djamor* PLO13 cultivado em soro de leite sem (controle) ou com diferentes formas de selênio (selenito ou selenato). Barras seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O micélio apresentou teor de proteína sem ou com a presença de selênio, mas ainda falta uma caracterização desse conteúdo proteico e dependendo da

aplicação, produzi-las em maior escala. Além disso, como observado previamente, o selenito exerce um efeito estimulador no crescimento micelial de *P. djamor* que aumentou os teores de proteínas solúveis na presença dessa forma de selênio (Figura 5).

A incorporação de selênio para o crescimento micelial em soro de leite ainda tem a vantagem de produzir metabólitos contendo formas orgânicas de selênio, com por exemplo selenometionina e selenocisteínas (Da SILVA et al., 2010; De ASSUNÇÃO et al., 2014). Essas formas orgânicas são importantes nos metabolismos oxidativos para eliminação de formas reativas de oxigênio e radicais livres que contribuem para desenvolvimento de doenças em humanos.

3.7 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidativa do micélio de *P. djamor* PLO13 foi observada na presença ou ausência de selênio (Figura 6). A capacidade antioxidante em cogumelos pode variar de 60 – 90% dependendo das espécies, quantidade de amostra e método de extração (BABU et al., 2014). Segundo esses autores, a capacidade antioxidativa de cogumelo *Pleurotus* sp. aumentou proporcionalmente com a quantidade de massa seca utilizada para extração com metanol. Mau e colaboradores (2005) mostraram que há maior capacidade antioxidante nos corpos de frutificação de *Ganoderma tsugae* que no micélio, quando a extração ocorre em água quente. Além disso, eles observaram que na extração em metanol têm maiores atividades antioxidantes que na extração com água quente. Neste estudo, a extração de compostos antioxidantes de *P. djamor* também foi realizada em metanol puro.

A maior capacidade antioxidante ($p < 0,05$) foi observada no micélio de *P. djamor* crescido em soro de leite com selenito (Figura 6) e menor no micélio cultivado na presença de selenato, que no micélio crescido sem o selênio. Nota-se novamente um efeito estimulador do selenito, mas não fica claro a razão da inibição dessa atividade na presença do selenato. Zhao e colaboradores (2006) verificaram que os polissacarídeos extraídos de *Ganoderma lucidum* enriquecidos com selênio, tem maior capacidade antioxidante e conseguem atenuar a produção do radical superóxido, indicando que esses polissacarídeos podem proteger ao DNA do dano oxidativo provocado pelos radicais livres. Além disso, Malinowska

e colaboradores (2009) comprovaram que o fungo crescido com selênio teve um aumento na atividade antioxidante. Segundo esses autores, o incremento nessa capacidade foi de aproximadamente 1,5 vezes quando comparado com o controle sem selênio.

Portanto, o micélio *P. djamor* PLO13 crescido em soro de leite apresenta capacidade antioxidante, adicionalmente, o selenito de sódio consegue incrementar essa propriedade, justificando o cultivo desse fungo para a produção em propósitos ou fins nutracêuticos com adição dessa forma de selênio.

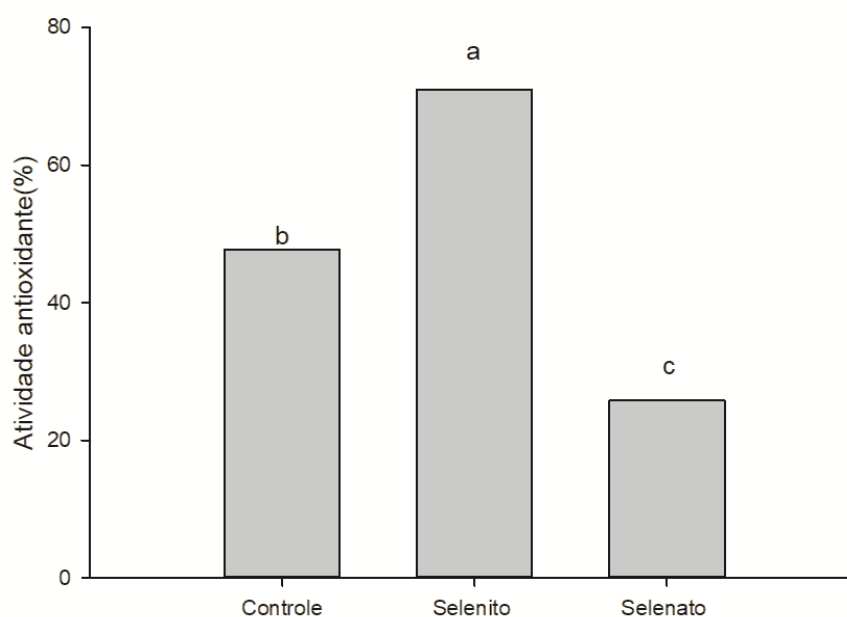


Figura 6. Porcentagem de capacidade antioxidante na fração sólida do micélio *Pleurotus djamor* PLO13 crescido em soro de leite sem (controle) ou com adição de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de selênio na forma de selenito ou selenato de sódio. Essa atividade foi realizada pelo método do radical DPPH. As barras seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.7 Perfil de açúcares

Os açúcares identificados das amostras da fração sólida do extrato dos β -glucanos mostraram a presença de glicose e galactose (Tabela 2). Também foi observado a presença de açúcares nos tempos de retenção 7,4; 8,4 e 9,4 (Figura 7).

Na fração sólida do extrato de β -glucanos não foi observada lactose, mas somente os produtos da hidrólise desse açúcar (Tabela 2). Esse resultado indica

que a lactose foi degradada completamente pelo fungo e não está presente no micélio seco ou ela está solubilizada na fração líquida, mostrando que os micélios obtidos podem ser aplicados como suplemento alimentar sem conteúdo de lactose. A ausência desse dissacarídeo em produtos alimentícios é importante para nutrição de pessoas que apresenta intolerância a lactose.

Para resolver a dúvida da degradação da lactose foi também realizado o perfil de açúcares na fração do extrato proteico bruto (EPB). As amostras do EPB mostraram a presença de galactose, glicose, lactose e N-acetil glicosamina (NAG) (Figura 8, Tabela 2).

A presença de lactose na fração do EPB era esperada devido à solubilidade desse açúcar em água, mas a redução da concentração após crescimento micelial mostra que fungo também degradou a lactose solubilizada em água (Tabela 2). A taxa de degradação da lactose foi, respectivamente, de 30%, 27% e 16% para os meios contendo selenato, controle e selenito. Lisboa e colaboradores (2008) testaram o soro de leite e lactose para a produção de galactooligossacarídeos e observaram que com soro de leite a taxa de conversão é maior (87,8%) que com lactose (80,5%), mas essa taxa diminuiu quando o soro de leite estava em maiores concentrações, indicando que a hidrólise é favorecida em menores concentrações de lactose.

O tratamento com selenato apresentou menor concentração de lactose ($p < 0,05$) que o controle (Tabela 2). Comportamento distinto foi observado com o selenito que reforça o efeito inibidor dessa forma de selênio na atividade enzimática da β -galactosidase (Figura 4 e o capítulo 2). Da mesma maneira, essa enzima foi estimulada pelo selenato com hidrólise da lactose e produzindo quantidades de glicose e galactose (Figura 4, Tabela 2).

Os padrões de açúcares de lactose, glicose e galactose utilizados para analisar o perfil de açúcares do soro de leite antes e após o crescimento micelial (Figura 7 e 8) são semelhantes aos obtidos por Vera e colaboradores (2011) em estudo de transgalactosidação para produção de galacto-oligossacarídeo a partir da lactose. Entretanto, as concentrações observadas por esses autores são maiores, pois trabalharam com quantidades maiores de lactose. Além disso, o tempo de retenção desse oligossacarídeo são menores que os observados para os padrões do

soro de leite (Figura 7 e 8). Assim, os picos de açúcares não identificados (Figuras 7 e 8) pelos padrões podem ser também galacto-oligosacarídeos.

No soro de leite, na biomassa microbiana e no EPB não foram identificados teores de frutose, maltose, manose e sacarose que pode ser devido à ausência desses carboidratos no soro em pó utilizado nesse estudo.

No EPB do soro de leite sem inoculação de *P. djamor* foi observado a presença de ácido N-acetil-glicosamina (Tabela 2) que é um açúcar característico das paredes de celulares de bactérias (MADIGAN et al., 2015). Esse resultado mostra que os soros podem ter sido contaminados por esse micro-organismo. Entretanto, essa concentração desse composto foi baixa e não teve influência no crescimento micelial, uma vez que os meios de cultura foram autoclavados, e ou N-acetil-glicosamina foi degradado após a colonização do fungo.

Tabela 2. Perfil de açúcares das frações sólida e líquida obtidas dos distintos tratamentos de *P. djamor* PLO 13 crescido em soro de leite sem ou com selênio (12,5 mg L⁻¹).

Fração analisada	Açúcares detectados no HPLC (mg mL ⁻¹)			
	Lactose	Glicose	Galactose	NAG
Fração sólida do extrato β-glucanos				
Controle sem inoculação do fungo	-	2,677	0,189	-
Controle (0,00 de Se)	-	5,363	0,734	-
Selenito de sódio	-	11,860	1,097	-
Selenato de sódio	-	7,253	0,836	-
Extrato proteico bruto (EPB)				
Controle sem PLO13	48,140	0,031	0,047	0,059
Controle (0,00 de Se)	35,292	0,054	0,024	-
Selenito de sódio	40,491	-	0,009	-
Selenato de sódio	33,687	0,166	0,045	-

Nos tratamentos controle (sem adição de selênio ao meio de cultura), selenito e selenato de sódio houve a inoculação e o crescimento micelial por 25 dias.

O micélio do fungo *P. djamor* PLO13, crescido em soro de leite, não contém lactose, mas contém glicose e galactose (Tabela 2). Assim, esse dissacarídeo foi degradado após 25 dias de crescimento em soro de leite reconstituído contendo ou não selênio. Entretanto, no EPB ainda contém lactose. Esse resultado mostra a importância de realizar uma filtração do micélio para separação das frações sólida e líquida quando o objetivo é o uso do micélio em

suplemento alimentar sem lactose. Além disso, a presença de β -galactosidase no EPB vai estimular a degradação da lactose na fração líquida em função do tempo.

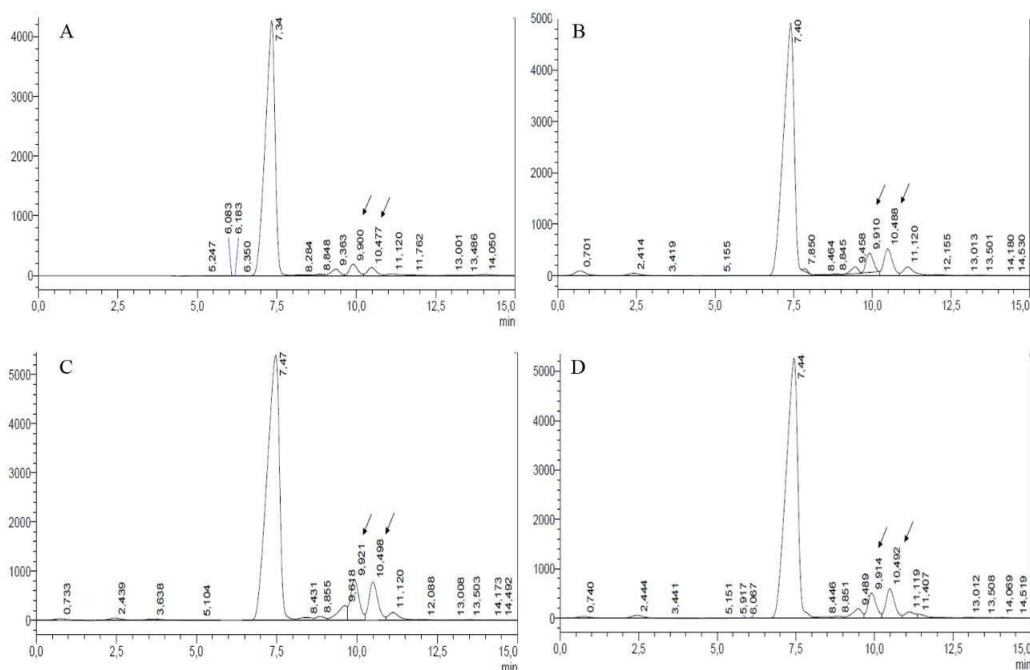


Figura 7. Espectro de cromatografia líquida alta eficiência (HPLC) de açúcares do soro do leite sem inóculo (a) e da fração sólida após a extração de β -glucanos (b-d) de *Pleurotus djamor* PLO13, cultivado em soro de leite, sem ou com a adição de 12, 5 (mg L^{-1}) de selênio. b) Controle sem adição de selênio. c) com adição de selenito de sódio. d) com adição de selenato de sódio. As setas mostram os açúcares na seguinte ordem de tempo de retenção: glicose (9,8 min) e galactose (10,4 min).

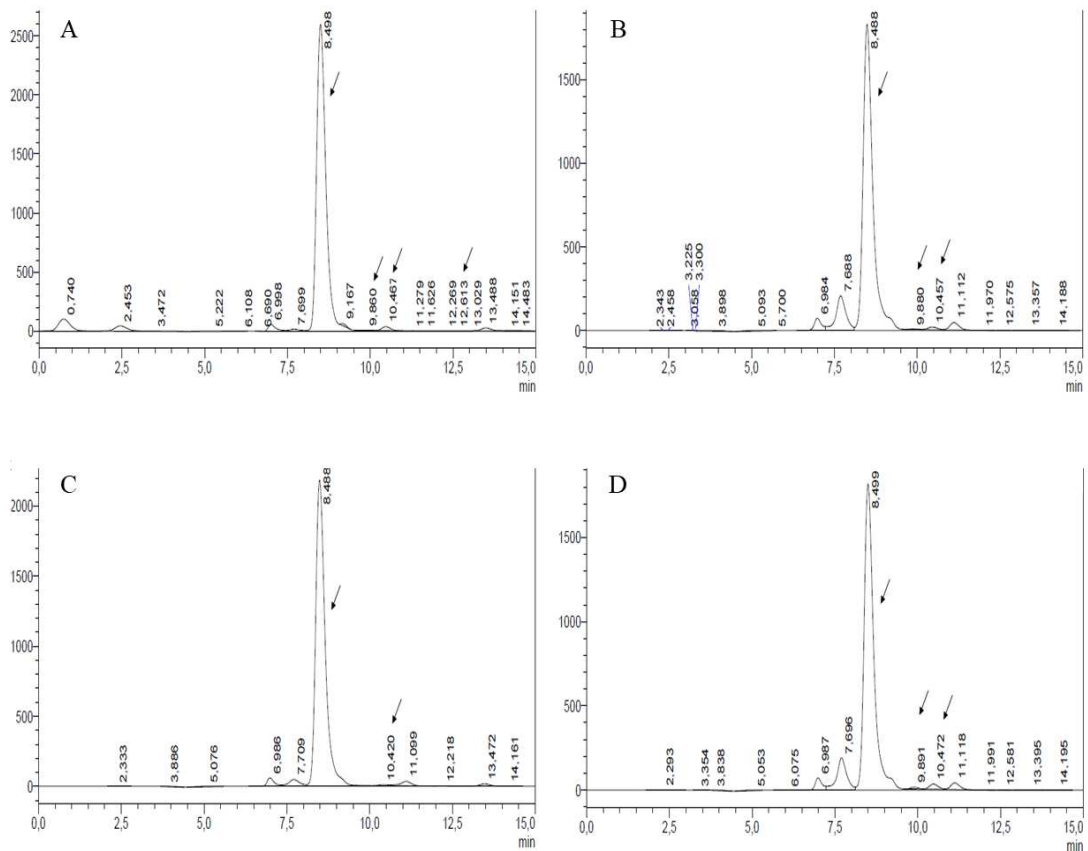


Figura 8. Espectro de cromatografia líquida alta eficiência de açúcares do soro de leite sem inóculo (a) e do extrato proteico bruto (b-d) de *Pleurotus djamor* PLO13 cultivado em soro de leite sem ou com a adição de 12, 5 (mg L⁻¹) de selênio. b) Controle sem adição de selênio. c) selenito de sódio. d) selenato de sódio. As setas mostram os açúcares na seguinte ordem de tempo de retenção: lactose (8,4 min), glicose (9,8 min), galactose (10,4 min) e NAG (12,6 min).

4. Conclusões

O micélio de *P. djamor* PLO13 produzido pelo crescimento em meio líquido com soro de leite e selênio, pode ser aplicado na indústria alimentícia, por ser um composto nutricional ao apresentar elementos bioativos, como ergosterol, β -glucanos, proteínas, compostos antioxidantes e minerais. A biomassa também não apresenta teor de lactose que é importante na alimentação de pessoas com intolerância a esse dissacarídeo. O soro de leite reconstituído é um meio rico em nutrientes e a adição de selênio é uma alternativa importante para incrementar a produção de biomassa micelial.

5. Referências

- ALVES, M. P. et al. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- Association of official analytical chemists – AOAC. Official methods of analysis. 15.ed. Washington, AOAC, 1990
- ASSUNÇÃO, L. S. et al. Enrichment of mushrooms: An interesting strategy for the acquisition of lithium. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1123–1127, 2012.
- ASSUNÇÃO, L. S. et al. SPECIATION OF SELENIUM IN *Pleurotus ostreatus* AND *Lentinula edodes* MUSHROOMS. **Journal of Biotechnology Letters**, v. 5, n. 1, p. 79–86, 2014.
- BABU, D. R.; PANDEY, M.; RAO, G. N. Antioxidant and electrochemical properties of cultivated *Pleurotus* spp. and their sporeless/low sporing mutants. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 3317–3324, 2012.
- BARAJAS-ACEVES, M. et al. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 3, p. 227–236, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CARDOSO, R. V. C. et al. Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. **Food Funct.**, v. 6, p. 1–12, 2017.
- CARVALHO, L. M. et al. Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p. 292–303, 2014.
- CHANG, S.; MILES, P. G. **Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. second ed. New York: CRC Press, 2004.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 2016.
- DA LUZ, J. M. R. **Degradação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais da torta de pinhão manso por *Pleurotus ostreatus***. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- DA LUZ, J. M. R. et al. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 575–580, 2013.
- Da SILVA, M. C. S. et al. In vivo bioavailability of selenium in enriched *Pleurotus ostreatus* mushrooms. **The Royal Society of Chemistry. Metallomics**, v. 2, n. 2, p. 162–166, 2010.

- Da SILVA, M. C. S. et al. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 558–563, 2012.
- Da SILVA, M. C. S. et al. Mycelial Growth of *Pleurotus* Spp in Se-Enriched Culture Media. **Advances in microbiology**, v. 3, n. 8, p. 11–18, 2013.
- ELISASHVILI, V. et al. Extracellular Polysaccharide Production by Culinary-Medicinal Shiitake Mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer and *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. Species Depending on Carbon and Nitrogen Source. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 6, n. 2, p. 165–172, 2004.
- GAO, Y. et al. Ergosterol - A measure of fungal growth in wood for staining and pitch control fungi. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 9, p. 621–626, 1993.
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 119–132, 2017.
- GONZÁLEZ-PALMA, I. et al. Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–9, 12 jul. 2016.
- GROSOVÁ, Z. et al. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2008.
- HAJIBOLAND, R.; KEIVANFAR, N. Selenium supplementation stimulates vegetative and reproductive growth in canola (*Brassica napus* L.) plants. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 99, n. 1, p. 13–19, 2012.
- HILLE, A. et al. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1202–1213, 2009.
- HSU, C. et al. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 197–206, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Tabela 1 – Produção e vendas dos produtos e/ou serviços industriais, segundo as classes de atividades e a descrição dos produtos – Brasil – 2010. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2010/defaulttabpdf.shtm>>. Acesso em: 8 dez. 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI) – Universidade Federal de Viçosa (UFV). Processo de produção de compostos bioativos (β -glucanos, provitamina D e proteínas) por fermentação fúngica do soro de leite. INPI, BR102016018211-5, 2016.
- JUERS, D. et al. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein Science**, v. 21, n. 12, p. 1792–1807, 2012.
- KALACĚ, P. **Edible mushrooms: Chemical composition and Nutritional Value**. 1^o ed. Londres: Academic Press, 2016.

- KAUR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S. Utilization of Whey for the Production of β - Galactosidase Using Yeast and Fungal Culture. **International Journal of Biological, biomolecular, agricultural, food and biotechnological engineering**, v. 9, n. 7, p. 703–707, 2015.
- KAVANAGH, K. Fungi. Biology and Applications. In: **Fungi: Biology and Applications**. 2. ed. Maynooth: Willey-Blackwell, 2011. p. 376.
- KOSSEVA, M. R., et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.
- KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633–640, 2004.
- LISBOA, C. R. **Síntese Enzimática De Galactooligossacarídeos a Partir De Lactose E Soro De Leite**. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciencia de alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.
- MADIGAN, M. et al. 2015. Brock. Biology of microorganisms. Estados Unidos: Editorial Pearson. Edição 14.
- MALINOWSKA, E. et al. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 5, p. 334–343, 2009.
- MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477–482, 1999.
- MAU, J. et al. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. **LWT-Food science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 589-597, 2005.
- MCCLEARY, B. V.; DRAGA, A. Measurement of β -Glucan in mushrooms and mycelial products. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 2, p. 364–373, 2016.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOLNÁR, Á. et al. The intensity of tyrosine nitration is associated with selenite and selenate toxicity in *Brassica juncea* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. September 2017, p. 93–101, 2018.
- NIEMENMAA, O. t al. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 125–134, 2008.
- NOWAK, J. et al. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1553–1558, 2004.
- NUNES, R. Atividade biológica de *Lentinula edodes* e produção de Shiitake em substrato enriquecido com selênio. 127f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- NUNES, R. et al. Selenium Bioaccumulation in Shiitake Mushrooms: A

- Nutritional Alternative Source of this Element. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. 983–986, 2012.
- NUNES, R. et al. Regulation of Respiratory and Ligninolytic Enzyme Activity of *Lentinula edodes* by Selenium. **Advances in microbiology**, v. 3, n. December, p. 31–36, 2013.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F. Biotechnological approaches for the value addition of whey. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 327–348, 2012.
- PARK, Y. K. et al. Determinação da concentração de beta-glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 312–316, 2003.
- PRAZERES, A. R. et al. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012.
- PUTTARAJU, N. G. et al. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9764–9772, 2006.
- RATHORE, H. et al. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 2, p. 35–46, 2017.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.
- RICHARDSON, M. D.; LOGENDRA, S. Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3903–3907, 1997.
- ROSSETTO, B. et al. Determinação da Atividade da Enzima B-galactosidase por Lactose do Soro de Queijo. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 28–32, 2013.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004.
- SARI, M. et al. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. **Food Chemistry**, v. 216, p. 45–51, 2017.
- SERAFÍN-MUÑOZ, A. H. et al. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. **Mycological Research**, v. 3, n. 5, p. 626–632, 2007.
- SHAO, S. et al. Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11616–11625, 2010.
- SHASHIREKHA, M. et al. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 255–259, 2005.
- SHUKLA, S.; JAITLEY, A. K. Morphological and Biochemical Characterization of Different Oyster Mushroom (*Pleurotus* spp.). **Journal of Phytochemistry**, v. 3,

- n. 8, p. 18–20, 2011.
- THIRY, C. et al. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 767–784, 2012.
- VERA, C. et al. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* B-galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 6, p. 745–752, 2011.
- WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258–274, 2002.
- WASSER, S. Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2010.
- WASSER, S. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1323–1332, 2011.
- WERNER, A.; BEELMAN, R. Growing selenium-enriched mushrooms as ingredients for functional foods or dietary supplements. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 3, p. 247, 2001.
- WU, X. J.; HANSEN, C. Proximate composition of *Pleurotus ostreatus* grown in whey permeate based medium. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 52, n. 4, p. 1249–1254, 2009.
- YADAV, J. S. S. et al. Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 6, p. 1017–1029, 2014.
- ZHANG, J.; ZHANG, J. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1066–1077, 2016.
- ZHAO, L. et al. Effect of selenium on increasing free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 3, p. 499–505, 2008.

Capítulo 2: Caracterização da enzima β -galactosidase de *Pleurotus djamor* crescido em soro de leite acrescido de selênio

Resumo

O soro de leite é um produto secundário da Indústria de Laticínios e, se descartado diretamente, tem um alto potencial poluente. Esse soro pode ser aproveitado na fermentação para aplicações industriais, por exemplo, a produção de β -galactosidase fúngica. A remoção da lactose do leite, a redução da cristalização da lactose em produtos lácteos e a produção galacto-oligosacarrídeos (GOS) são as principais aplicações industriais dessa enzima. Os fungos produtores de cogumelos comestíveis são considerados fonte alimentar rica em proteínas, compostos bioativos, vitaminas, lipídios e minerais, e podem crescer utilizando como substrato diferentes composições de soro de leite. Além disso, esses fungos tem o potencial de bioacumular elementos como, selênio (Se), conferindo um maior valor nutricional e propriedades funcionais. Esses fungos podem também produzir β -galactosidase (β -gal). Assim, neste estudo foi testado a capacidade de produção dessa enzima e os parâmetros cinético de uma β -gal produzida por *Pleurotus djamor* PLO13, em crescimento micelial utilizando soro de leite, sem ou com a adição de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Se, na forma de selenito sódio ou selenato de sódio. Após 25 dias de crescimento micelial, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm, independente da adição do Se, foi observado atividade enzimática durante 30 min de incubação e estabilidade em meio ácido, neutro ou básico. Com exceção do efeito da concentração do substrato enzimático, o selenato estimulou a atividade da β -gal e o selenito teve um efeito inibidor. Em temperatura de incubação variando de 15 a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ foi observado as maiores atividades enzimática no substrato com adição de selenato. O selênio diminui a afinidade da enzima pelo substrato, entretanto aumentou a velocidade máxima de conversão do produto. Os valores da constante de Michaelis-Menten (K_M) foram menores para lactose pura que para esse dissacarídeo presente no soro de leite. Assim, na presença da lactose pura, o efeito estimulador do Se sobre a atividade dessa enzima é mais evidente. Portanto, a adição de Se foi positiva para a produção e atividade de β -gal. Além disso, os parâmetros cinéticos analisados mostram o potencial de produção dessa β -gal

utilizando o soro de leite que pode ser uma alternativa promissora para valorização desse produto secundário.

1. Introdução

O dissacarídeo lactose é formado pela condensação de moléculas de glicose e galactose. Esse dissacarídeo é o principal açúcar do leite e pode também ser encontrado no soro após a fabricação do queijo. O soro tem sido aproveitado como ingrediente na alimentação humana e animal, produções de fármacos e como precursor de obtenção de substâncias bioativas derivadas da lactose (SCHAAFSMA, 2008). Entretanto, devido à grande quantidade produzida para obtenção de produtos lácteos, o soro é considerado produto secundário e tem alto potencial poluente quando descartado no solo ou em corpos hídricos (FOX, 2009).

O soro apresenta em sua composição química, além da lactose, proteínas, gorduras, ácidos orgânicos e minerais (HARAGUCHI et al., 2006). Um dos resíduos industriais usados para produzir *Pleurotus* sp. pode ser o soro de leite. No Brasil, no estado de Minas Gerais, a produção leiteira e o processamento de leite e derivados são atividades importantes. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção de queijos no Brasil com Inspeção Federal foi de 896 mil toneladas no ano de 2010 (IBGE, 2010). O soro de leite representa de 80 a 90% do volume total do leite utilizado durante a produção de queijos e contém, aproximadamente, 55% dos nutrientes do leite: proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e uma quantidade mínima de gordura. O soro pode ser utilizado na sua forma original para produção de bebidas lácteas. O produto concentrado é classificado, então, de acordo com o teor de proteína, e pode ter aplicações diversas, devido a suas características nutricionais e tecnológicas, que vão do seu uso como ingrediente alimentício à produção de medicamentos (ALVES et al., 2014).

Uma alternativa viável para valorização desse produto secundário da indústria de laticínios é a fermentação do mesmo com fungos para obtenção de biomassa comestíveis para alimentação humana e animal sem ou com baixos teores de lactose (veja o capítulo 1), compostos bioativos microbianos (veja o capítulo 1) e enzimas microbianas de interesse industrial, entre elas a β -galactosidase. Essa enzima conhecida popularmente como lactase promove a hidrólise da lactose em glicose e galactose e catalisa a transgalactosilação (JUERS et al., 2012). A remoção da lactose do leite e a obtenção de galacto-

oligosacarrídeos (GOS), mediante a transgalactosilação são as duas principais aplicações industriais dessa enzima (HSU et al., 2005).

A utilização da β -galactosidase em produtos alimentícios reduz ou elimina a lactose que é um potente agente alergênico para pessoas intolerantes à lactose. Essa intolerância é ocasionada pela ausência ou baixos níveis de atividade dessa enzima no aparelho digestório (ROSSETTO et al., 2013). Além disso, os produtos da hidrólise da lactose são mais solúveis e menos propensos a cristalização. Assim a β -galactosidase é importante para minimizar os efeitos da cristalização da lactose em produtos lácteos como doce de leite e leite condensado (GROSOVÁ et al., 2008).

A reação de transgalactosilação tem sido explorada para produção de GOS, que são oligosacarrídeos com baixo ou nenhuma taxa de digestão em humanos e animais e são considerados como prebióticos, por estimular o estabelecimento e o crescimento de Bifidobacterias e Lactobacillos no trato digestivo humano (OLIVEIRA et al., 2011). Essa reação é baseada na transferência do resíduo galactosil, obtido após a quebra da lactose, para um aceptor contendo um grupo hidroxil. Esse aceptor pode ser a água e ou a galactose. Os GOS são formados quando o aceptor é um açúcar (MEYER, 2015).

Na natureza, a β -galactosidase pode ser encontrada em vegetais, como por exemplo, amêndoas e pêssego e no sistema digestivo de animais e produzida por microorganismos, a exemplo de fungos filamentosos, bactérias e leveduras (SANTIAGO et al., 2004). Essas fontes microbianas são de especial interesse biotecnológico por possuírem altas taxas de multiplicação, produção e facilidade de manipulação. Em nível industrial a β -galactosidase é obtida a partir do crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*, por serem considerados como organismos GRAS (*generally recognized as safe*) (KOSSEVA et al., 2009).

As β -galactosidases de distintas origens diferem na especificidade sobre as ligações glicosídicas e, portanto, produzem diferentes misturas de GOS (INTANON et al., 2014). As isoenzimas também apresentam diferentes faixas de temperaturas e pH ótimas (BOON et al., 2000; NAGY et al., 2001; HUSAIN, 2010; CHIBA et al., 2015).

Os fungos produtores de cogumelo, também são micro-organismos promissores para a produção de β -galactosidases. A espécie *Pleurotus* spp. são fungos saprófitas que conseguem crescer naturalmente em troncos de árvores ou madeira morta, e é um dos cogumelos mais cultivados e consumidos pelo homem e são também considerados GRAS. Eles apresentam características como tempos curtos de produção, facilidade de cultivo, alto valor nutritivo e produção de metabólitos, como por exemplo, o ergosterol (precursor da vitamina D) e β -glucano (SHAO et al., 2010; GONZÁLEZ-PALMA et al., 2012; CARVALHO et al., 2014). Além disso, esses fungos possuem um complexo enzimático para degradar resíduos lignocelulósicos e orgânicos que são aplicados em processos biotecnológicos (SHUKLA; JAITLEY, 2011).

O selênio tem sido reconhecido por afetar positivamente na eficiência biológica, no incremento da síntese e atividade de algumas enzimas de *Pleurotus ostreatus* e por proteger as células fúngicas de danos contra a peroxidação de lipídeos provocada em condições de estresse (SERAFÍN-MUÑOZ et al., 2007; Da SILVA et al., 2012; NUNES, 2013). Esse elemento é reconhecido como um micronutriente essencial tanto para humanos e para animais sendo importante para as funções biológicas mediadas pelas selenoproteínas (RAYMAN, 2012). Além disso, tem muitas funções fisiológicas, e é mais reconhecido como antioxidante, reduzindo o dano oxidativo nas células (WERNER; BEELMAN, 2001).

O objetivo deste estudo foi determinar a produção e os parâmetros cinéticos de uma β -galactosidase produzida por *Pleurotus djamor* PLO13, em crescimento micelial, utilizando soro de leite reconstituído, sem ou com a adição de formas inorgânicas de selênio.

2. Material e métodos

A caracterização da enzima β -galactosidase foi realizada a partir da determinação dos efeitos do pH, da temperatura de incubação, do tempo de incubação e da concentração dos substratos enzimáticos do soro de leite e lactose, utilizando o extrato protéico bruto (EPB).

O EPB foi obtido a partir do crescimento de *P. djamor* PLO13 em soro de leite reconstituído com água potável na proporção de 1:9, durante 25 dias, com agitação de 150 rpm e 25 ± 3 °C (INPI - UFV, 2016). No preparo do meio de cultivo, 15 g de soro de leite foi solubilizado em 135 mL de água potável. Essa mistura foi adicionada em frascos de Erlenmeyer (250 mL) e esterilizada a 121 °C por 25 min. Após resfriamento, em cada frasco foi inoculada com 4 discos de ágar contendo o micélio crescido em meio de cultura batata dextrose ágar.

Para o preparo do meio de cultura enriquecido com selênio foi preparada uma solução de selenito de sódio e outra de selenato de sódio, ambas a 1 g L^{-1} . Essas soluções foram filtradas em membrana ($2 \mu\text{m}$) antes da adição no meio de cultura. Em sete Erlenmeyer contendo meio de cultura líquido e o inóculo de PLO13 foram adicionados 1,80 mL/Erlenmeyer da solução de selenito de sódio para uma concentração final de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de selênio. Esse mesmo procedimento foi realizado também para a solução de selenato de sódio.

Após o período de incubação, o conteúdo dos frascos foi filtrado em papel filtro. A parte líquida designada de EPB foi recolhida em tubos de centrífuga (15 mL) e armazenada a 4 °C para as análises descritas a seguir.

2.1 Determinação do teor de proteína

O teor de proteínas solúveis foi determinado por método colorimétrico a 595 nm utilizando 0,05 mL de EPB, 1,450 mL de água filtrada ultrapura e 0,5 mL de reagente de Bradford (BRADFORD, 1976; Da LUZ et al., 2012).

2.2 Quantificação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores produzidos pela atividade enzimática utilizando os substratos lactose e soro de leite para caracterização da β -galactosidase de *P. djamor* PLO13 foi realizada pelo método colorimétrico a 540 nm no espectrofotômetro (Thermo scientific, Evolution 60). Essa reação foi feita

utilizando 0,5 mL da solução EPB e 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e incubada por 5 min a 100 °C. Após o resfriamento, em cada tubo de ensaio foi adicionado 7 mL de água filtrada ultrapura. A curva padrão foi realizada utilizando glicose 0,1% (m/v).

O teor de açúcares redutores foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática bruta. A atividade enzimática específica foi realizada pela razão entre atividade enzimática bruta e o teor de proteínas solúveis.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de açúcares redutores (m mol L^{-1}) produzido pela enzima por minuto.

2.3 pH e determinação da faixa de pH ótimo

A determinação do efeito pH sobre a atividade da enzima foi feito em solução de pH 4,0, 7,0 e 10,0. A reação foi composta por 0,4 mL de solução de lactose (1 % m/v, Sigma), 0,1 mL de EPB e 0,5 mL do tampão. Essa reação foi incubada em banho-maria a 45 °C por 15 min. Após esse período, em cada tubo, foi adicionado 1 mL com carbonato de sódio ($0,1 \text{ m mol L}^{-1}$). Para o preparo do método colorimétrico foi utilizado 0,5 mL da solução anterior com 0,5 mL de DNS. Essa mistura foi incubada por 5 minutos em banho maria a 100 °C. Após resfriamento, foram colocados 4,5 mL de água destilada e procedeu-se à determinação de açúcares redutores.

2.4 Temperatura de incubação e determinação da faixa de temperatura ótima

A reação para determinação do efeito térmico sobre a atividade da β -galactosidase foi preparado utilizando 0,1 mL de EPB, 0,4 mL de lactose (1% m/v) e 0,5 mL de tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 4,0). Essa mistura foi incubada por 15 minutos em banho-maria em 10 diferentes temperaturas de incubação variando 15 a 60°C em intervalo de 5°C. Após esse período de incubação, foi adicionado 1 mL com carbonato de sódio ($0,1 \text{ m mol L}^{-1}$). Para o preparo do método colorimétrico e determinação de açúcares redutores foram utilizadas a metodologia descrita no item anterior.

2.5 Estabilidade da enzima

A reação para determinação do efeito de tempo de incubação na atividade enzimática foi semelhante àquela descrita no item anterior. A mistura foi incubada

a 45 °C por 5 diferentes tempos de incubação variando de 5 a 30 minutos em intervalo de 5 min.

2.6 Concentração do substrato enzimático e determinação de parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato enzimático na atividade da β -galactosidase de *P. djamor* foi realizado utilizando lactose (1 % m/v) e soro de leite nas condições ótimas de pH, temperatura e estabilidade da enzima.

A reação enzimática foi preparada utilizando 0,1 mL de EPB, 0,4 mL de lactose pura ou soro de leite em diferentes concentrações (0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 3; 4; 5 g 100 mL⁻¹) e 0,5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 mmol L⁻¹, pH=4,0).

A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas a partir da atividade de β -galactosidase em função da concentração de lactose pura e ou soro de leite.

2.7 Análises estatísticas

Este estudo foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os tratamentos experimentais foram constituídos de soro de leite reconstituído com água sem ou com a adição de selenito de sódio e, ou selenato de sódio. Três frascos sem inoculação do fungo foram utilizados como controle do crescimento micelial. Sete frascos inoculados com micélio, mas sem adição de forma química de selênio foram utilizados para avaliação da produção de β -galactosidade. Finalmente, sete frascos contendo selenito de sódio e outros sete contendo selenato de sódio foram utilizados para analisar os efeitos de formas inorgânicas de selênio para produção micelial dessa enzima.

Os resultados foram submetidos a análise de variância, ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Minitab 7.1 (versão gratuita).

A K_M e a $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados utilizando o programa Sigma Plot versão 12 (gratuito). Os gráficos das figuras também foram feitos nesse programa.

3. Resultados e discussão

3.1 pH e determinação da faixa de pH ótimo

Independente do pH a maior atividade da β -galactosidase foi observada no substrato contendo selenato de sódio e no controle (Figura 1). Semelhante ao observado na atividade de fenoloxidase e peroxidase (NOWAK et al., 2004), o selenito de sódio teve efeito inibidor sobre a atividade de β -galactosidase de *P. djamor* em todos os pH analisados. Isso mostra efeito diferente das formas inorgânicas de selênio sobre a atividade de β -galactosidase uma vez que a concentração de selênio foi a mesma para ambas as formas. Nunes e colaboradores (2013) observaram que o selênio na forma de selenito de sódio não inibiu a atividade das enzimas hidrolíticas, mas estimulou a atividade de lacase no crescimento de *Lentinula edodes* em serragem de eucalipto. Segundo esses autores o selênio regula atividade respiratória e a atividade de enzimas lignocelulolíticas de *L. edodes* quando esse elemento é adicionado na água de choque para induzir a produção de cogumelo.

A atividade de β -galactosidase no controle e nos substratos contendo selenato de sódio foi maior nos pH 4,0 e 10 (Figura 1). Na presença do selenito de sódio a atividade dessa enzima foi inversamente proporcional ao aumento do pH do tampão.

De fato, as enzimas são afetadas pelas mudanças no pH, no substrato, no tampão e na idade ou na viabilidade da cultura (BISSWANGER, 2014). Algumas β -galactosidases fúngicas apresentam atividade em pH ácido, por exemplo valores de 1 até 4,5 em *Teratosphaeria acidotherma*, 3,5 – 6,5 em *Penicillium chrysogenum* e 2,5 até 6 em *Aspergillus niger* (NAGY et al., 2001; HATZINIKOLAOU et al., 2005; CHIBA et al., 2015). No caso da β -galactosidase de *P. ostreatus*, o pH ótimo foi cerca de 3 (SHLOUL et al., 2017). Comportamento distinto foi observado neste estudo, apresentando atividade enzimática máxima em pH 4,0 e 10,0. Semelhante ao mostrado por HU e colaboradores (2017) a enzima α -galactosidase de *P. djamor* foi estável em pH de 3 até 10. Mostrando que as enzimas produzidas por este fungo apresentam estabilidade em uma ampla faixa de pH.

A β -galactosidase produzida por *P. djamor* PLO13 em soro de leite teve atividade tanto em pH ácido, neutro e básico, o que mostra a estabilidade dessa enzima em função de alterações cargas e íons no meio de cultura.

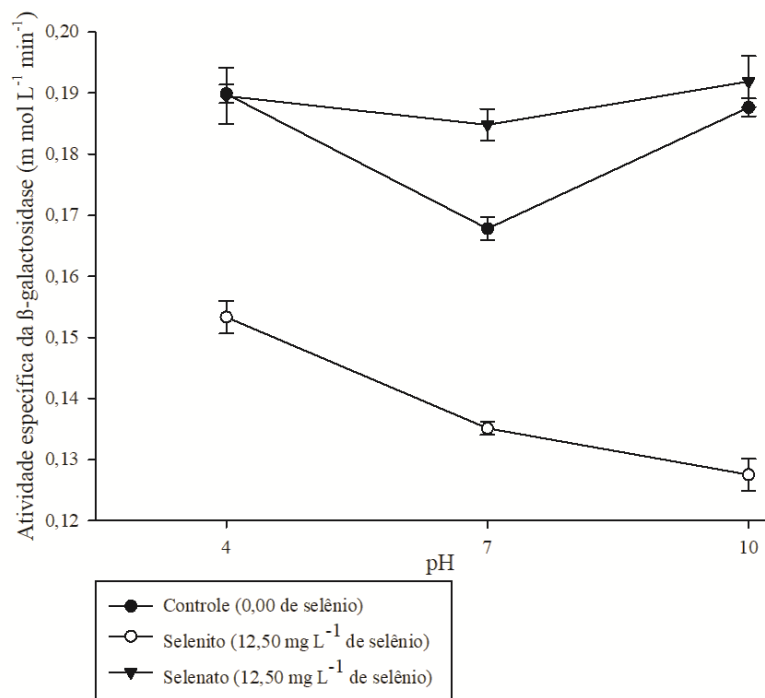


Figura 1. Atividade específica da β -galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13 crescida em soro de leite reconstituído com água em diferentes valores de pH.

3.2 Temperatura de incubação e faixa ótima da atividade enzimática

Semelhante ao observado no efeito do pH, a atividade da β -galactosidase foi maior no controle e no soro de leite contendo selenato, independentemente da temperatura de incubação (Figura 2). Os picos de maior atividade dessa enzima variaram em função da ausência e presença de selênio e da forma química desse elemento adicionado ao soro de leite (Figura 2). Além disso, como já observado, o selenato de sódio estimula a produção da enzima β -galactosidase e o selenito de sódio tem um efeito de inibição (Figuras 1 e 2).

A maior atividade enzimática foi registrada no controle, na temperatura de 40 °C. Enquanto que nas amostras com selenato de sódio essa temperatura foi de 45 °C e no crescimento micelial com selenito de sódio entre 25 e 45 °C (Figura 2).

As menores atividades enzimáticas, nos três tratamentos, foram nas temperaturas de 15 e 55 °C.

As temperaturas ótimas de β -galactosidases fúngicas apresentam variação em função do gênero, substratos e condições de cultivo. As temperaturas da β -galactosidade de *P. chrysogenum* e *T. acidotherma* foram respectivamente 30 e 80 °C (NAGY et al., 2001; CHIBA et al., 2015). No caso de *P. ostreatus* a maior atividade dessa enzima foi a 50 °C (SHLOUL et al., 2017). Além disso, observamos que na faixa de temperatura de 50 a 60 °C não houve uma redução drástica da atividade enzimática. Semelhante ao observado por Hu e colaboradores (2017) a atividade de β -galactosidase de *P. djamor* apresenta estabilidade nas temperaturas entre 4 e 40 °C, mostrando que a enzima deste fungo apresenta alta estabilidade térmica. Isso é interessante para a aplicação da β -galactosidase em processos industriais, como na produção de oligossacarídeos, com temperaturas variáveis. Boon e colaboradores (2000) observaram que a conversão de lactose aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura, e dependendo da origem da enzima, obtém-se diferentes quantidades de oligossacarídeos. Portanto, a temperatura é um fator importante para a quebra da lactose e para atividade enzimática.

3.3 Estabilidade da enzima

A atividade específica da β -galactosidase tem uma redução linear no intervalo de 5 a 15 min (Figura 3). No tempo de 5 min a atividade específica é a maior para os três tratamentos. No entanto, aos 15 min essa atividade diminui e continua estável até os 30 minutos de incubação. Esse padrão observou-se na ausência ou presença do selênio, entretanto, as amostras com selenito de sódio foram afetadas com uma diferença mínima na atividade específica quando comparadas com as amostras controle e com selenato de sódio, o que ratifica o efeito inibidor de selenito sobre a atividade dessa enzima.

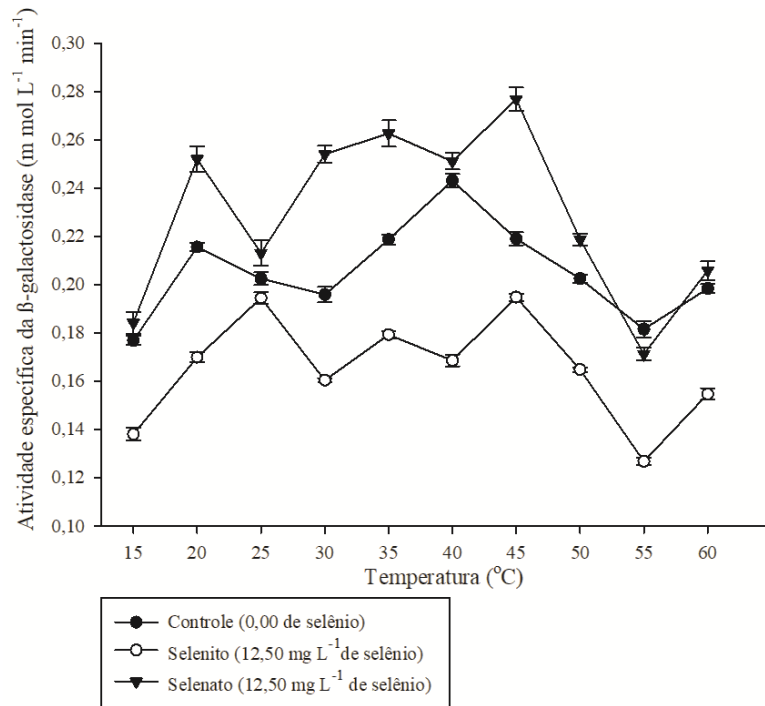


Figura 2. Atividade específica de β -galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13, produzida em soro de leite reconstituído com água, em diferentes temperaturas de incubação.

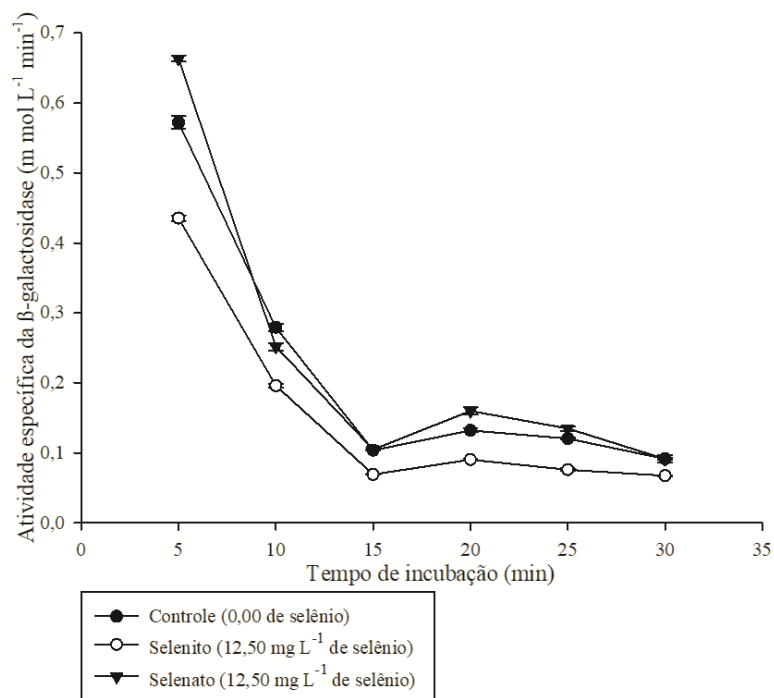


Figura 3. Atividade específica da β -galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13 produzida em soro de leite reconstituído com água em diferentes tempos de incubação.

Nos primeiros 5 min, o substrato apresenta maior concentração e no decorrer do tempo de incubação a concentração do substrato reduz e ou esgota, o que explica a queda da atividade enzimática. Além disso, não foi observado diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de incubação superior a 15 min, o que demonstra a estabilidade funcional da enzima. O tempo também é um fator importante, onde a temperatura e o pH são dependentes dele (BISSWANGER, 2014). Boon e colaboradores (2000) observaram que as β -galactosidases de *Bacillus circulans*, *A. oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* apresentam maior conversão de lactose nos primeiros 100 min, mas a estabilidade é mantida até 400 min, mostrando que essa enzima tem estabilidade por vários minutos, independentemente da sua origem. Essa característica da β -galactosidase é muito importante na degradação da lactose em produtos alimentícios devido a sua rápida ação e estabilidade por pelo menos 30 min a 45 °C.

3.4 Concentração do substrato enzimático e determinação de parâmetros cinéticos

Independente da presença do selênio, a faixa de máxima atividade da β -galactosidase foi entre 0,05 e 1,00 g mL⁻¹ de soro de leite (Figura 4). Entretanto, a velocidade máxima e constante de Michaelis-Menten Michalis (K_M) foram maiores no soro de leite contendo selênio. Esses resultados mostram que o selênio altera a afinidade da enzima pelo substrato enzimático e estimula a degradação mais rápida do mesmo (Figura 4, Tabela 1).

Neste estudo, observou-se que, no controle, a atividade enzimática aumentou até chegar a 0,5 g mL⁻¹ (Figura 4). Após essa concentração a mesma foi reduzida à metade e se manteve estável até 5 g mL⁻¹ de soro de leite. As amostras com selenito de sódio mantém o mesmo padrão descrito, apresentando a máxima atividade em 0,5 g mL⁻¹. Em maiores concentrações do soro foi observado redução de um terço do ponto máximo da atividade enzimática. No entanto, as amostras de selenato de sódio apresentam atividade máxima com 0,25 g mL⁻¹, reduzindo também uma terceira parte da atividade enzimática quando a concentração foi aumentada (Figura 4).

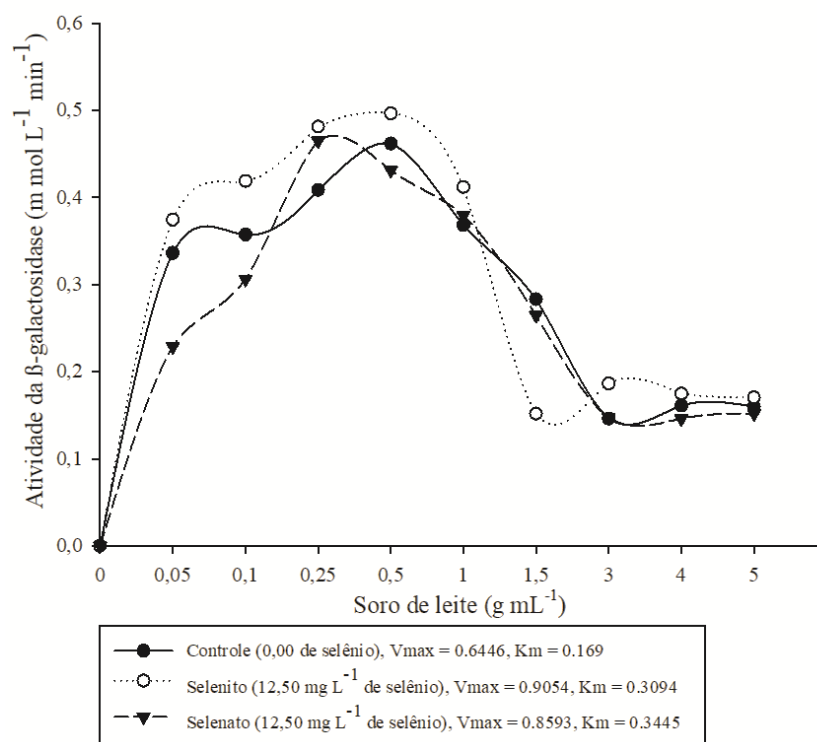


Figura 4. Atividade da β -galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13 e a determinação dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) utilizando diferentes concentração de soro de leite como substrato enzimático.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da β -galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13 utilizando lactose comercial e soro de leite como substratos enzimáticos.

Tratamentos	Lactose comercial		Soro de leite	
	K_M (g mL ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (g mL ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)
Controle (0,0 de Se)	0,0028 a	0,200 b	0,169 b	0,6446 b
Selenito de sódio	0,0032 a	0,327 a	0,3094 a	0,9054 a
Selenato de sódio	0,0075 b	0,330 a	0,3445a	0,8593 a

As letras iguais, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Diferentemente da utilização do soro de leite como substrato enzimático, no controle, a atividade enzimática com a lactose comercial foi menor que as amostras crescidas com selênio (Figura 5). Esse resultado confirma o efeito estimulante desse elemento sobre a atividade da β -galactosidase de *Pleurotus*

djamor PLO 13. Além disso, com maior disponibilidade de substrato enzimático o efeito inibitório do selenito de sódio sobre a atividade dessa enzima não foi mais observado (Figura 4).

A faixa de máxima de atividade enzimática com a lactose comercial foi de 0,05 a 1,5 g mL⁻¹ que é maior que a faixa observada utilizando o soro de leite (Figura 5). Além disso os K_M da lactose foram menores que aqueles do soro de leite que mostra a maior afinidade da β-galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13 com lactose pura (Tabela 1).

Os valores de K_M e V_{máx} observados nos substratos contendo selenito e selenato não apresentaram diferenças (p < 0,05) quando foi utilizado o soro de leite como substrato enzimático, no entanto, o valor da K_M na presença do selenito de sódio foi diferente (p < 0,05) utilizando a lactose comercial que a K_M no substrato contendo selenato de sódio (Figura 5, Tabela 1). Nesse caso, a presença do selenito de sódio aumentou a afinidade da β-galactosidase para a lactose comercial, embora a velocidade máxima de degradação fosse a mesma na presença de ambas as formas de selênio.

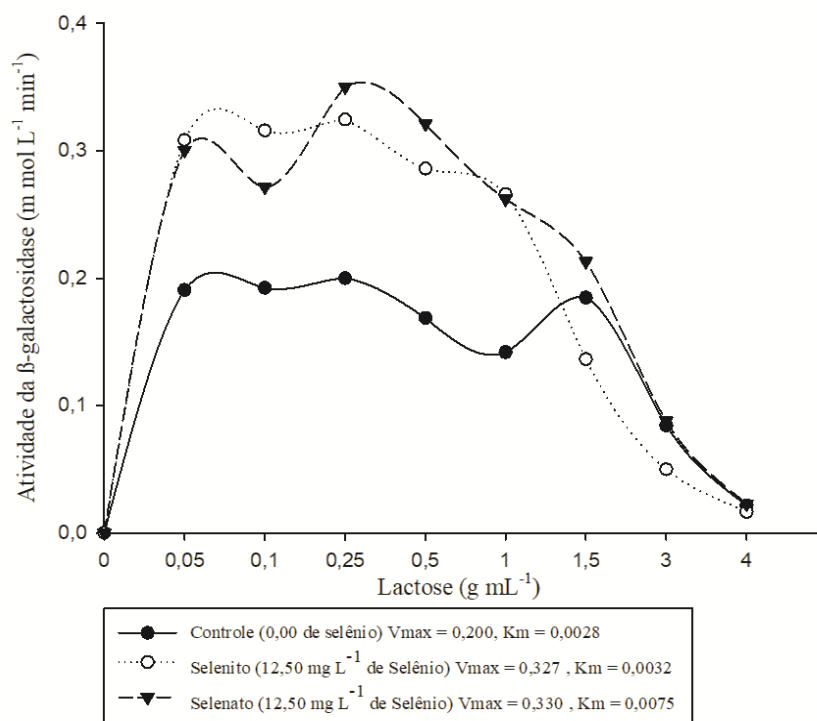


Figura 5. Atividade da β-galactosidase de *Pleurotus djamor* PLO 13 e determinação dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{máx}), utilizando diferentes concentração de lactose como substrato enzimático.

Os valores menores de K_M mostram a preferência do substrato da enzima pela lactose (Tabela 1). O soro de leite é uma mistura de compostos onde a enzima pode ser inibida pelos seus próprios produtos como é galactose (BOON et al., 2000). Nishanthi (2017) mostrou que dependendo do tratamento para a obtenção de soro de leite em pó, as características físico-químicas são afetadas. O conteúdo de lactose é de 4,7 % em 100 g de soro de leite, após tratamentos de purificação (VASILEVA et al., 2016). Portanto, os valores de K_M diferentes entre os dois substratos podem ser também devido à baixa concentração ou disponibilidade de lactose e a presença de potentes inibidores no soro de leite. O substrato enzimático natural da β -galactosidase é a lactose (EGAL, 1979). Assim, os menores valores de K_M observado utilizando esse açúcar reforça essa afirmação. Além disso, estudos de caracterização da β -galactosidase utilizando soro de leite como substrato não têm sido realizados.

A especificidade das enzimas pelo substrato depende da sua origem, devido a presença de isoenzimas ou diferentes mecanismos de acoplamento aos açúcares, o que explica as diferentes distribuições nos produtos de síntese (TORRES, 2010). Assim, os valores de K_M de cada enzima variam dependendo da origem, da composição do meio de cultivo, do grau de pureza do substrato enzimático e da presença de inibidores. As β -galactosidasas produzidas por bactérias e leveduras têm maior afinidade pela lactose presente no leite, no entanto, essa mesma enzima produzida por fungos filamentosos, semelhante a este estudo, tem maior afinidade pela lactose do soro de leite (ISOBE et al., 2013; INTANON et al., 2014). *K. lactis* apresenta menor taxa de conversão de lactose em meio contendo soro de leite doce que no meio com soro ácido (FISCHER; KLEINSHMIDT, 2015). Segundo esses autores, *Aspergillus oryzae* crescido em soro ácido e em soro doce não apresenta diferença na conversão de lactose. Assim, o tipo de soro de leite e a origem da enzima pode afetar a atividade da β -galactosidase e os parâmetros cinéticos. Além disso, o objetivo da utilização da lactose pura em nosso estudo foi confirmar a presença de uma β -galactosidase no crescimento de *P. djamor* em soro de leite.

A β -galactosidase requer Na^+ ou K^+ para ser completamente ativa (JUERS et al., 2012). Fischer e Kleinshmidt (2015) testaram o efeito de Na^+ , K^+ e NH_4^+ sobre a atividade enzimática de *A. oryzae* e *K. lactis* usando ONPG como

substrato e observaram um efeito positivo desses cátions somente para *K. lactis*. Em nosso estudo, a forma de selênio em mistura com o sódio pode ter provocado algum estímulo, como por exemplo a maior atividade enzimática com selenato de sódio em relação ao o controle.

Em estudos com fungos filamentosos, as K_M obtidas com lactose foram de $0,00305 \text{ g mL}^{-1}$, $0,0208 \text{ g mL}^{-1}$ e $0,105 \text{ g mL}^{-1}$ para *Penicillium multicolor*, *Aspergillus fonsecaeus* e *A. carbonarius*, respectivamente (GONZALEZ; MONSAN, 1991; NAGY et al., 2001; O'CONNELL; WALSH, 2008). Os últimos autores mostraram que a enzima produzida por *A. carbonarius* teve maior estabilidade, quando exposta a condições gástricas, que as enzimas comercializadas como suplementos para intolerância a lactose. Observamos neste estudo que os valores dos parâmetros cinéticos são bastantes similares àqueles obtidos no crescimento de *P. djamor* PLO13 (Tabela 1). Além disso, a β -galactosidase de *P. djamor* PLO13 apresenta similaridade de atividade e parâmetros cinéticos com a β -galactosidase de *A. carbonarius*. Assim, a enzima produzida por *P. djamor* mostra potencial para ser aplicada a nível de laboratório em fermentadores visando sua produção em escalas maiores e também no mercado de alimentos.

Na presença de lactose comercial o efeito estimulador do Se sobre a atividade da β -galactosidase de *P. djamor* PLO13 foi mais evidente (Figuras 4 e 5). Nesse meio, a atividade do controle foi menor que nos meios contendo selenito ou selenato de sódio (Figura 5). Esse fato pode ser devido à composição diversificada do soro de leite e os ânions de selênio ter interações com outros componentes do meio, produzindo efeito estimulador do selenato e inibidor do selenito, na atividade da β -galactosidase quando foram alterados os parâmetros físico-químicos, tais como, o pH, a temperatura e o tempo de incubação (Figuras 1 a 4). Portanto, a adição de Se foi positiva para a produção e atividade de β -galactosidase de *P. djamor* PLO13 produzida em meio líquido utilizando soro de leite.

4. Conclusões

Os parâmetros cinéticos analisados mostram o potencial de produção de β -galactosidase de *P. djamor* PLO13 utilizando o soro de leite que pode ser uma alternativa promissora para valorização desse produto secundário da Indústria de Laticínios. Além disso, a adição de formas inorgânica de selênio ao soro de leite mostra ter potencial para aumentar a produção, a atividade e estabilidade funcional dessa enzima.

5. Referências

- ALVES, M. P. et al. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1, p. 41-55. 2014
- BOON, M. et al. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2, p. 271-281. 2000
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, L. M. et al. Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p. 292-303, 2014.
- CHIBA, S. et al. Novel acidophilic β -galactosidase with high activity at extremely acidic pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 120, n. 3, p. 263-267. 2015.
- Da LUZ, J. M. R. et al. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1508-1515, 2012.
- Da SILVA, M. C. S. et al. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 558-563, 2012.
- EGAL, R. The lac-operon for lactose degradation, or rather for the utilization of galactosylglycerols from galactolipids? **J Theor Biol**, v. 79, n.1, p. 117-119. 1979
- FISCHER, C.; KLEINSCHMIDT, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 15-22, 2015.
- FOX, P. Lactose: Chemistry and Properties. In: McSweeney P., Fox P. (eds) *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, New York, 2009.
- GONZALEZ, R. R.; MONSAN, P. Purification and some characteristics of β -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 4, p. 349-352, 1991.
- GONZÁLEZ-PALMA, I. et al. Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1-9, 12 jul. 2016.
- GROSOVÁ, Z. et al. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.
- HARAGUCHI, F. et al. Proteínas do soro do leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana.

- Revista de Nutricao**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.
- HATZINIKOLAOU, D et al. Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, n. 2, p. 161-172. 2005
- HSU, C. et al. Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 197–206, 2005.
- HU, Yujing, et al. A protease-resistant α -galactosidase from *Pleurotus djamor* with broad pH stability and good hydrolytic activity toward raffinose family oligosaccharides. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, p. 122-130, 2017.
- HUSAIN, Q. β Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 41-62. 2010
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Tabela 1 – Produção e vendas dos produtos e/ou serviços industriais, segundo as classes de atividades e a descrição dos produtos – Brasil – 2010. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto2010/defaulttabpdf.shtm>>. Acesso em: 8 dez. 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI) – Universidade Federal de Viçosa (UFV). Processo de produção de compostos bioativos (β -glucanos, provitamina D e proteínas) por fermentação fúngica do soro de leite. INPI, BR102016018211-5, 2016.
- INTANON, M. et al. Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. **FEMS microbiology letters**, v. 353, n. 2, p. 89-97, 2014.
- ISOBE, K. et al. Characterization of new β -galactosidase from acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 293-297, 2013.
- JUERS, D. et al. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein Science**, v. 21, n. 12, p. 1792–1807, 2012.
- KOSSEVA, M. R., et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.
- MEYER, T. S. M. et al. Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry. In: EISSA, A. H. A. (Ed.). **Food Production and Industry**. [s.l.] Intech, 2015. p. 25–78.
- NAGY, Z, et al. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein expression and purification**, v. 21, n. 1, p. 24-29. 2001.
- NISHANTHI, M. et al. Properties of whey proteins obtained from different whey streams. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 76–83, 2017.

- NOWAK, J. et al. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1553–1558, 2004.
- NUNES, R. et al. Selenium Bioaccumulation in Shiitake Mushrooms: A Nutritional Alternative Source of this Element. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. 983–986, 2012.
- NUNES, R. et al. Regulation of Respiratory and Ligninolytic Enzyme Activity of *Lentinula edodes* by Selenium. **Advances in microbiology**, v. 3, n. December, p. 31–36, 2013.
- O'CONNELL, S.; WALSH, G. Application relevant studies of fungal B-galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 2, p. 129–138, 2008.
- OLIVEIRA, C. et al. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 600–609, 2011.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.
- ROSSETTO, B. et al. Determinação da Atividade da Enzima B-galactosidase por Lactose do Soro de Queijo. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 28–32, 2013.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004.
- SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 458–465, 2008.
- SERAFÍN-MUÑOZ, A. H. et al. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. **Mycological Research**, v. 3, n. 5, p. 626–632, 2007.
- SHAO, S. et al. Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11616–11625, 2010.
- SHLOUL, T. et al. Influence of pH, temperature and various heavy metals on β -galactosidase activity in the crude extract of *Pleurotus ostreatus*. **Journal of applied biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 29–42, 2017.
- SHUKLA, S.; JAITLEY, A. K. Morphological and Biochemical Characterization of Different Oyster Mushroom (*Pleurotus* spp.). **Journal of Phytology**, v. 3, n. 8, p. 18–20, 2011.
- TORRES, D. P. M. et al. Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 438–454, 2010.

- VASILEVA, N. et al. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 339–346, 2016.
- WERNER, A.; BEELMAN, R. Growing selenium-enriched mushrooms as ingredients for functional foods or dietary supplements. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 3, p. 247, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

O micélio de *P. djamor* PLO13 produzido pelo crescimento em meio líquido com soro de leite reconstituído e selênio, pode ser aplicado na indústria alimentícia, como um composto nutricional que apresenta elementos bioativos, como ergosterol, β -glucanos, proteínas, compostos antioxidantes e minerais. O micélio pode ser utilizado como alimento para pacientes intolerantes à lactose, por não apresentar esse dissacarídeo. O meio de soro de leite reconstituído é um meio rico em nutrientes e a adição de selênio é uma alternativa importante para incrementar a produção de biomassa micelial.

Os parâmetros cinéticos analisados mostram o potencial de produção de β -galactosidase de *P. djamor* PLO13 utilizando o soro de leite reconstituído que pode ser uma alternativa promissora para valorização desse produto secundário da Indústria de Laticínios. Além disso, a adição de formas inorgânicas de selênio ao soro de leite mostrou ter potencial para aumentar a produção, a atividade e estabilidade funcional dessa enzima.