



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DA BIOMASSA DE *Pleurotus albidus* POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA ELABORAÇÃO DE  
BARRAS DE CEREAIS

LARISSA DE SOUZA KIRSCH

MANAUS  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

LARISSA DE SOUZA KIRSCH

PRODUÇÃO DA BIOMASSA DE *Pleurotus albidus* POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA ELABORAÇÃO DE  
BARRAS DE CEREAIS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS  
2013

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

***K61p*** Kirsch, Larissa de Souza  
Produção da biomassa de *Pleurotus albidus* por fermentação submersa para elaboração de barras de cereais / Larissa de Souza Kirsch. - 2013.  
124 f. : il. color. ; 31 cm.  
Tese (doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas.  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira.

1. Cogumelos comestíveis – Processamento 2. Fermentação  
3. Alimentos - Biotecnologia I. Teixeira, Maria Francisca Simas, orientador II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 602.4:635.8(043.2)

LARISSA DE SOUZA KIRSCH

PRODUÇÃO DA BIOMASSA DE *Pleurotus albidus* POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA ELABORAÇÃO DE  
BARRAS DE CEREAIS

Tese apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Araújo Viana Marques  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima  
Universidade do Minho-Portugal

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helyde Albuquerque Marinho  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Antunes Palheta  
Instituto Federal do Amazonas

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais Curt e Marta, e ao meu marido Adriano, dedico-lhes esta conquista como gratidão por todo carinho e apoio demonstrados.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, muito obrigada pelo seu amor, cuidado e fidelidade.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de desenvolver este trabalho na Micoteca DPUA/UFAM, pelo apoio e suporte oferecidos.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, por todo suporte concedido durante o curso.

À Capes, pelo suporte financeiro.

Aos meus queridos pais, Curt e Marta, por todo carinho e incentivo.

Ao meu marido Adriano, obrigada por todo apoio, carinho e compreensão mostrados durante esses anos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira. Obrigada por todos seus ensinamentos e por compartilhar comigo parte de sua experiência profissional e de vida.

A todos os colegas de laboratório, Taciana, Tamiris, Jéssica, Raiane, Felipe, Leonanda, Rosana, Meire, Thayanna, Ritinha, Kilma, Hellen, Lorisa, Larissa, Rosimar, Hérlon, Mircella, Néllly, Valéria, Annie, Ana Júlia e Professor Antônio. Muito obrigada por todo apoio, amizade e pelos momentos divertidos compartilhados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Obrigada por abrir as portas para a realização da análise antioxidante.

Aos professores Pedro Roberto de Oliveira, Jerusa de Souza Andrade e Carolina Michelin de Almeida.

Ao Fábio Lopes pela ajuda na realização das análises físico-químicas e sensoriais.

À Maria da Conceição Loureiro Campelo, responsável pelo Laboratório de Análises de Solos e Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental. Obrigada por auxiliar na realização das análises de minerais.

E a todos que de alguma forma me ajudaram nessa jornada, muito obrigada!

## RESUMO

Nos últimos anos a busca por alimentos que promovam a qualidade e expectativa de vida dos consumidores tem crescido mundialmente. Espécies de *Pleurotus* atendem para essa tendência, pois são considerados alimentos de elevado potencial nutricional. Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições *in vitro* de produção e as propriedades nutricionais de *Pleurotus albidus* visando a elaboração de barras de cereais. Inicialmente foi avaliada a influência das condições de cultivo em meio sólido e os parâmetros físico-químicos por fermentação submersa para produzir biomassa micelial. Os resultados mostraram que em meio sólido o crescimento micelial foi similar em todos os meios de cultivo na ausência de luz, contudo, na presença de luz o crescimento em ágar extrato de malte e ágar extrato de malte com extrato de levedura foi estatisticamente superior em relação aos demais. Na fermentação submersa sacarose, frutose e maltose foram as fontes de carbono que mais favoreceram a produção da biomassa, 7,28 g.L<sup>-1</sup>, 7,07 g.L<sup>-1</sup>, 6,99 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, e das fontes de nitrogênio o melhor resultado foi com extrato de levedura (7,98 g.L<sup>-1</sup>). O planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência da concentração de sacarose e extrato de levedura, pH e velocidade de agitação indicou que todas as variáveis influenciaram significativamente na produção da biomassa, com destaque para a concentração da sacarose. A máxima produção de biomassa (9,81 g.L<sup>-1</sup>) foi em meio contendo sacarose (30,0 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (2,5 g.L<sup>-1</sup>), pH 7,0 e velocidade de agitação (180 rpm). A biomassa não apresentou contaminação microbiana nem toxicidade frente a *Artemia salina*, e mostrou uma capacidade antioxidante com redução em 28% do radical DPPH. Na qualidade nutricional, a biomassa apresentou teor de carboidratos totais de 50,7%, 20,41% de proteínas, 18,55% de fibra bruta, 8,18% de cinzas, 2,66% de lipídios e 303,34 Kcal. O potássio foi o macromineral mais abundante, seguido de fósforo, sódio e magnésio, com 17,13 g.Kg<sup>-1</sup>, 12,31 g.Kg<sup>-1</sup>, 3,52 g.Kg<sup>-1</sup> e 2,06 g.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto zinco (57,99 mg.Kg<sup>-1</sup>), ferro (28,82 mg.Kg<sup>-1</sup>) e cobre (3,97 mg.Kg<sup>-1</sup>) foram os microminerais em maior quantidade. Todos os aminoácidos essenciais foram detectados na biomassa, sendo os mais abundantes a leucina, lisina e valina com teores de 0,91 g.100 g<sup>-1</sup>, 0,78 g.100 g<sup>-1</sup> e 0,73 g.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. Ácido aspártico (1,31 g.100 g<sup>-1</sup>), ácido glutâmico (1,14 g.100 g<sup>-1</sup>), alanina (1,12 g.100 g<sup>-1</sup>) e arginina (1,01 g.100 g<sup>-1</sup>) destacaram-se em relação aos aminoácidos não essenciais. Na avaliação da qualidade microbiológica as três formulações de barras de cereais elaboradas com diferentes concentrações da biomassa de *P. albidus* (0%, 4% e 8%) foram consideradas seguras para consumo humano. A adição da biomassa nas barras de cereais elevou o teor de fibras, carboidratos e minerais. Os valores médios dos atributos avaliados não diferiram estatisticamente entre as três formulações e todos tiveram índice de aceitabilidade acima de 70%. As condições de cultivo proporcionaram a produção da biomassa micelial de *P. albidus* para o desenvolvimento de barras de cereais, produto alimentício com qualidades nutricional e sensorial adequadas ao consumo, passível de transferência tecnológica para a indústria e consequentemente uma nova alternativa de geração de renda.

Palavras-chave: *Pleurotus albidus*, fermentação submersa, composição nutricional, barras de cereais

## ABSTRACT

In recent years the search for foods that promote quality of life and expectation of consumers has grown worldwide. Species of *Pleurotus* cater to this trend because they are considered foods of high nutritional potential. This study aimed to evaluate the *in vitro* conditions of production and the nutritional properties of *Pleurotus albidus* in order to develop cereal bars. Initially we evaluated the influence of culture conditions on solid medium and physico-chemical parameters in submerged fermentation to produce mycelial biomass. The results showed that the mycelial growth was similar in all culture media in the absence of light, however, in the presence of light growth in malt extract agar and malt extract agar with yeast extract was statistically superior compared with others. In submerged fermentation sucrose, fructose and maltose were the carbon sources that most favored the production of biomass, 7.28 g.L<sup>-1</sup>, 7.07 g.L<sup>-1</sup>, 6.99 g.L<sup>-1</sup>, respectively, and the best result was obtained with extract of yeast (7.98 g.L<sup>-1</sup>) as nitrogen source. The factorial design used to evaluate the influence of sucrose and yeast extract, agitation speed and pH indicated that all variables significantly influenced the production of biomass, especially the concentration of sucrose. The maximum biomass production (9.81 g.L<sup>-1</sup>) was in media containing sucrose (30.0 g.L<sup>-1</sup>), yeast extract (2.5 g.L<sup>-1</sup>), pH 7.0 and agitation speed (180 rpm). Biomass exhibited no microbial contamination or toxicity in the brine shrimp, and showed a reduction in antioxidant capacity with 28% DPPH. In nutritional quality, biomass indicated total carbohydrate 50.7%, 20.41% protein, 18.55% crude fiber, 8.18% ash, 2.66% fat and 308.34 Kcal. Potassium was the most abundant macromineral, followed by phosphorus, sodium and magnesium, with 17.13 g.kg<sup>-1</sup>, 12.31 g. Kg<sup>-1</sup> 3.52 g.Kg<sup>-1</sup> and 2.06 g.Kg<sup>-1</sup> respectively, while zinc (57.99 mg.Kg<sup>-1</sup>), iron (28.82 mg.Kg<sup>-1</sup>) and copper (3.97 mg.kg<sup>-1</sup>) were as trace minerals in greater quantities. All essential amino acids were detected in the biomass, being the most abundant leucine, lysine and valine at levels of 0.91 g.100g<sup>-1</sup>, 0.78 g.100 g<sup>-1</sup> and 0.73 g.100 g<sup>-1</sup>, respectively. Aspartic acid (1.31 g.100 g<sup>-1</sup>), glutamic acid (1.14 g.100 g<sup>-1</sup>), alanine (1.12 g.100 g<sup>-1</sup>) and arginine (1.01 g.100 g<sup>-1</sup>) stood out in relation to non-essential amino acids. In relation to microbiological quality of the three formulations prepared cereal bars with different *P. albidus* biomass concentration (0%, 4% and 8%) were considered safe for human consumption. The addition of biomass of *P. albidus* in cereal bars increased the content of fiber, carbohydrates and minerals. The mean values of the attributes evaluated were not statistically different among the three formulations and all had acceptability index above 70%. The cultivation conditions provided the production of mycelial biomass of *P. albidus* for developing cereal bars, food product with nutritional and sensory qualities suitable for consumption, subject to technology transfer to industry and consequently a new alternative source of incomes.

Key-words: *Pleurotus albidus*, submerged culture, nutritional composition, cereal bars



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
Figura 1- Características morfológicas dos basidiomas de <i>Pleurotus</i> sp.....	14
Figura 2- <i>P. ostreatus</i> (a), <i>P. eryngii</i> (b) e <i>P. ostreatoroseus</i> (c).....	15
Figura 3- Aspecto macromorfológico dos basidiomas de <i>P. albidus</i> .....	17
<b>METODOLOGIA</b> .....	28
Figura 4- Fluxograma das etapas do preparo das barras de cereais utilizando a biomassa de <i>P. albidus</i> .....	42
Figura 5- Questionário de avaliação sensorial das barras de cereais formuladas com biomassa de <i>P. albidus</i> .....	45
<b>Capítulo 1-</b> Mycelial biomass production by <i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692, an edible mushroom from Amazon.....	53
Figura 1- Inoculum volume on mycelial biomass production of <i>P. albidus</i> .....	75
Figura 2- Pellets morphology under different culture conditions.....	75
<b>Capítulo 3-</b> Caracterização nutricional e aceitabilidade de barras de cereais elaboradas com biomassa de <i>Pleurotus albidus</i> , um cogumelo da Amazônia.....	100
Figura 1- Frequência das notas das barras de cereais controle (a), teste 4% (b) e 8% (c) para os atributos avaliados.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>METODOLOGIA</b> .....	28
Tabela 1- Níveis das variáveis do planejamento fatorial $2^4$ para avaliar a produção da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	32
Tabela 2- Formulação das barras de cereais elaboradas com a biomassa de <i>P. albidus</i> .....	40
Tabela 3- Critérios de inclusão e exclusão para seleção dos degustadores na análise sensorial.....	43
<b>Capítulo 1-</b> Mycelial biomass production by <i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692, na edible mushroom from Amazon.....	53
Tabela 1- Factor levels used in the full factorial design $2^4$ for study mycelial biomass production by <i>P. albidus</i> .....	76
Tabela 2- Growth of <i>P. albidus</i> on different culture media and conditions of incubation.....	76
Tabela 3- Mycelial biomass, conversion factor of substrate to biomass ( $Y_{x/s}$ ), yield ( $Y_{r/s}$ ) and productivity ( $P_x$ ) by <i>P. albidus</i> under different carbon and nitrogen sources	77
Tabela 4- Results of the full factorial design $2^4$ for mycelial biomass production by <i>P. albidus</i> .....	78
Tabela 5- Contrast values calculated according to the factorial design for mycelial biomass production by <i>P. albidus</i> .....	79
<b>Capítulo 2-</b> Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica da biomassa de <i>Pleurotus albidus</i> produzida por fermentação submersa.....	80
Tabela 1- Composição centesimal da biomassa de <i>P. albidus</i> [base seca (bs) e valor calórico.....	89
Tabela 2- Teor de minerais presentes na biomassa de <i>P. albidus</i> , em base seca.....	92
Tabela 3- Composição de aminoácidos da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	94
<b>Capítulo 3-</b> Caracterização nutricional e aceitabilidade de barras de cereais elaboradas com biomassa de <i>Pleurotus albidus</i> , um cogumelo da Amazônia.....	100
Tabela 1- Formulações utilizadas para o preparo das barras de cereais.....	105
Tabela 2- Composição centesimal e valor calórico das barras de cereais.....	108
Tabela 3- Composição mineral das barras de cereais.....	111
Tabela 4- pH, acidez total titulável e dureza das barras de cereais formuladas com biomassa de <i>P. albidus</i> .....	112

Tabela 5- Média das notas atribuídas pelos provadores e intenção de compra das barras de cereais.....	113
---	-----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	Gênero <i>Pleurotus</i> (Fr.) Quél.....	14
2.2	Produção de biomassa por fermentação submersa.....	17
2.3	Fatores que influenciam na fermentação submersa.....	19
2.3.1	Fontes de carbono.....	19
2.3.2	Fontes de nitrogênio.....	21
2.3.3	Fontes de lipídios.....	22
2.3.4	Macro, micronutrientes e vitaminas.....	23
2.3.5	Influência de temperatura, pH e velocidade de agitação.....	24
2.4	Considerações gerais sobre barras de cereais.....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
5.1	Organismo e reativação da cultura.....	28
5.2	Avaliação do crescimento micelial radial em meio sólido.....	28
5.3	Produção da biomassa de <i>P. albidus</i> por fermentação submersa.....	29
5.3.1	Influência do volume de inóculo.....	29
5.3.2	Influência de fontes de carbono.....	29
5.3.3	Influência de fontes de nitrogênio.....	30
5.3.4	Determinação de carboidratos totais.....	30
5.3.5	Cálculos dos fatores de conversão do substrato em biomassa, rendimento e produtividade.....	31
5.3.5.1	Determinação do fator de conversão do substrato em biomassa.....	31
5.3.5.2	Determinação do rendimento em biomassa.....	31
5.3.5.3	Determinação da produtividade.....	32
5.3.6	Planejamento fatorial.....	32
5.3.7	Avaliação morfológica da biomassa de <i>P. albidus</i> produzida na fermentação submersa.....	32
5.4	Produção da biomassa de <i>P. albidus</i> em escala ampliada.....	33
5.5	Análise da composição nutricional da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	33
5.5.1	Determinação da composição centesimal e valor calórico da biomassa de <i>P.</i>	

<i>albidus</i> .....	33
5.5.2 Determinação do pH, atividade de água e acidez total titulável da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	35
5.5.3 Determinação da composição mineral da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	35
5.5.4 Determinação da composição de aminoácidos da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	36
5.5.5 Determinação da atividade antioxidante da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	36
5.6 Preparo dos extratos orgânicos e teste de toxicidade da biomassa de <i>P. albidus</i> frente a <i>Artemia salina</i> .....	37
5.7 Determinação da qualidade microbiológica da biomassa de <i>P. albidus</i> .....	38
5.7.1 Preparo da amostra.....	38
5.7.2 Contagem de Coliformes totais, termotolerantes e <i>E. coli</i> .....	38
5.7.3 Contagem direta de <i>Salmonella</i> sp.....	39
5.7.4 Contagem direta de <i>S. aureus</i> coagulase positiva.....	39
5.8 Elaboração das barras de cereais utilizando a biomassa desidratada de <i>P. albidus</i> .	40
5.8.1 Ingredientes para formulação das barras de cereais.....	40
5.8.2 Formulação das barras de cereais.....	40
5.8.3 Preparação das barras de cereais.....	41
5.9 Análise da composição nutricional das barras de cereais.....	42
5.10 Determinação da análise microbiológica das barras de cereais.....	43
5.11 Análise sensorial das barras de cereais.....	43
5.12 Análises estatísticas.....	44
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	46
<b>CAPÍTULO 1-</b> Mycelial biomass production by <i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692, an edible mushroom from Amazon.....	53
<b>CAPÍTULO 2-</b> Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica da biomassa de <i>Pleurotus albidus</i> produzida por fermentação submersa.....	80
<b>CAPÍTULO 3-</b> Caracterização nutricional e aceitabilidade de barras de cereais elaboradas com a biomassa de <i>Pleurotus albidus</i> , um cogumelo da Amazônia.....	100
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	120
<b>ANEXO 1</b> .....	121
<b>ANEXO 2</b> .....	122

## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade vem buscando cada vez mais o consumo de alimentos de qualidade e com características sensoriais agradáveis, que possam saciar a fome e, ao mesmo tempo, auxiliar na manutenção da saúde, melhorar o físico e o bem-estar. Dentre esses alimentos, os cogumelos têm se destacado por apresentar componentes importantes para uma dieta mais saudável, pois são ricos em proteínas (20-30%, em base seca), fibras alimentares, e vitaminas (riboflavina, niacina e folatos) e uma grande variedade de minerais e elementos traços, têm reduzidos teores de lipídios e são praticamente livres de colesterol (FORTES; NOVAES, 2006; MANJUNATHAN; KAVIYARASAN, 2011; MOORE; CHIU, 2001). Papaspyridi *et al* (2010) mencionam que os cogumelos podem ser alimentos funcionais, pois podem promover efeitos benéficos à saúde.

Mundialmente, esses macrofungos são cultivados e comercializados como produto para ser consumido por indivíduos de qualquer idade e em todas as condições de saúde (MEHTA *et al*, 2011; SIRÓ *et al*, 2008; UDDIN *et al*, 2011). A produção mundial de cogumelos *in natura* equivale cerca de  $5 \times 10^6$  toneladas, sendo que os cultivados em escala industrial pertencem aos gêneros *Agaricus*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Volvariella*, *Flammulina* e *Tremella* (OMARINI *et al*, 2010). No Brasil, estima-se que essa produção é de aproximadamente 3 mil toneladas anuais ou 0,12% da produção mundial e as espécies *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *Lentinus edodes*, *Agaricus brasiliensis* e *A. bisporus* são as de maior comercialização (FAEMG, 2010; FURLANI; GODOY, 2007).

Atualmente, os cogumelos comercializados no mundo são em sua maioria derivados de basidiomas cultivados por fermentação semi-sólida, processo que pode durar longos períodos de cultivo. Assim, a fermentação submersa está sendo uma alternativa promissora para obtenção de produtos funcionais, especialmente cogumelos medicinais e comestíveis, pois a biomassa produzida por esse bioprocessos pode apresentar composição química similar

ao cultivo semi-sólido. Além disso, outros benefícios da fermentação submersa podem ser citados, tais como a elevada produção de biomassa em larga escala e com custos reduzidos, menor tempo de produção, possibilidade de cultivo independente das variações sazonais e controle dos parâmetros físico-químicos (PAPASPYRIDIS *et al*, 2011; GREGORI *et al*, 2007).

O consumo de barras de cereais vem crescendo constantemente em virtude da facilidade de acesso e a associação que se tem com os alimentos saudáveis. Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de verificar a incorporação de determinados ingredientes alternativos mais saudáveis na elaboração desses produtos (CÓRDOVA, 2012; TORRES, 2009).

Considerando a necessidade de disponibilização de alimentos alternativos que desempenham papel de destaque e a crescente demanda por produtos com qualidade nutricional para reduzir os gastos com saúde por meio da prevenção de doenças e aumentar a expectativa de vida, esta pesquisa teve como finalidade produzir biomassa de *Pleurotus albidus* para utilização na elaboração de barras de cereais, visto que tal espécie de cogumelo ainda não foi devidamente investigada em condições *in vitro* na Amazônia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Pleurotus* (Fr.) Quél

De acordo com Guzmán (2000) há grandes dificuldades na identificação das espécies de *Pleurotus* e este fato está associado às variações das características bioquímicas e genéticas das linhagens encontradas nos diferentes ecossistemas. Nesse sentido, mais de 1000 espécies de *Pleurotus* já foram descritas, no entanto aproximadamente 50 destas espécies são consideradas válidas.

O gênero *Pleurotus* (Fr.) Quél pertence à Ordem Agaricales, família Polyporaceae e constitui um grupo de cogumelos cosmopolitas, comumente encontrado em regiões de clima temperado, cujas espécies são sapróbias, desenvolvendo-se em troncos de árvores em decomposição. As principais características morfológicas desses cogumelos incluem basidiomas que se desenvolvem com aspecto semelhante a uma ostra (Figura 1), estipe geralmente lateral, lamelas decurrentes e esporada branca (COHEN *et al*, 2002; PUTZKE; PUTZKE, 2004).

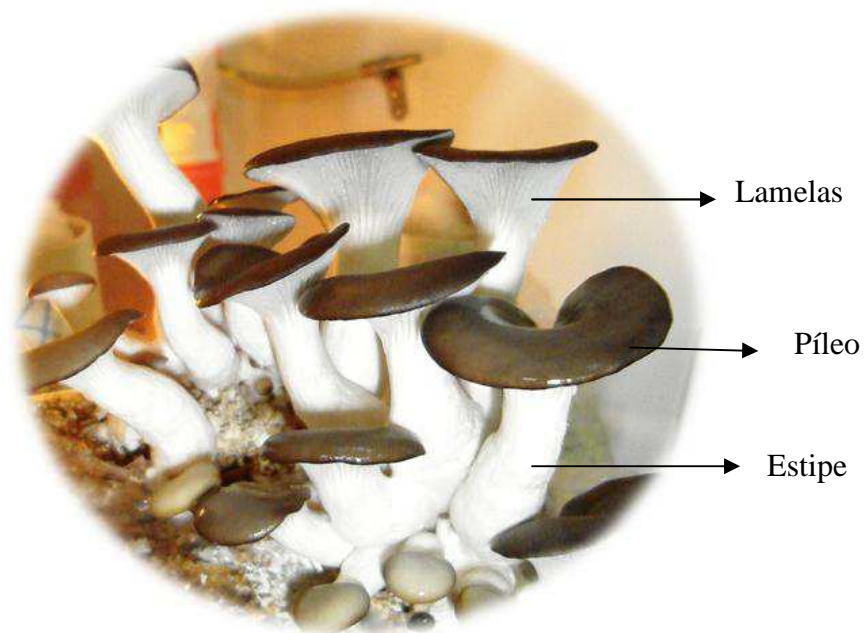


Figura 1- Características morfológicas dos basidiomas de *Pleurotus* sp.

FONTE: Retirado do Acervo fotográfico do Herbário Micológico Jair Putzke/UFAM



Espécies comestíveis do gênero *Pleurotus* possuem elevado conteúdo de proteínas, fibras, carboidratos, vitaminas e minerais. Além dessas características nutricionais, diversas substâncias isoladas desses cogumelos têm sido caracterizadas demonstrando propriedades terapêuticas, tais como atividade antitumoral, imunomodulatória, anticolesterolêmica, antimicrobiana, dentre outras (COHEN *et al*, 2002; RAGUNATHAN; SWAMINATHAN, 2003).

*Pleurotus* spp. são um dos principais grupos de cogumelos mais comercializados no mundo, juntamente com *Agaricus* e *Lentinus*. O complexo sistema enzimático de espécies de *Pleurotus* possibilita o seu cultivo em diversos substratos ricos em lignina e celulose, a exemplo de palha de arroz, lascas de madeira, trigo, milho e outros resíduos agrícolas (COHEN *et al*, 2002). *P. ostreatus* (Figura 2a) é uma das espécies de cogumelos mais cultivadas, tradicionalmente conhecida pelo seu sabor exótico e altamente nutritivo (CHANG; MILES, 2004). Outras espécies como *P. eryngii* (Figura 2b) e *P. ostreatoroseus* (Figura 2c) também são comercialmente importantes.



Figura 2- *P. ostreatus* (a), *P. eryngii* (b) e *P. ostreatoroseus* (c)

FONTE: Retirado de <<http://www.forum.mycotopia.net>; [www.rcashop.org/mushroom\\_shop/pleurotus-eryngii-king-oyster-straw-small](http://www.rcashop.org/mushroom_shop/pleurotus-eryngii-king-oyster-straw-small); [www.shroom.com.br/shroom/pt/cogumelos/comestiveis](http://www.shroom.com.br/shroom/pt/cogumelos/comestiveis)

Além das espécies anteriormente citadas, Lechner; Albertó (2011) estudando a produtividade e a obtenção de basidiomas de *Pleurotus* spp. verificaram elevados rendimentos

em cultivo para *P. albidus* e sugeriram que essa possa ser considerada uma nova espécie cultivável em nível comercial.

Segundo revisão de Putzke (2002) ocorrem pelo menos 15 espécies do gênero *Pleurotus* consideradas nativas no Brasil: *Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler, *Pleurotus araucariicola* Sing., *Pleurotus calyx* (Speg.) Sing. (= *Lentinus patulus*), *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedj. [sin.: *Pleurotus flabellatus* (Berk. & Br.) Sacc.], *Pleurotus dryinus* (Pers.: Fr.) Kummer, *Pleurotus eugrammus* (Mont.) Dennis – Pegler (como *Nothopanus*), *Pleurotus favoloides* Sing., *Pleurotus hirtus* (Fr.) Sing., *Pleurotus macropus* Bagl. [sin.: *Pleurotus cornucopiae* (Paulet : Pers.) Rolland], *Pleurotus opuntiae* (Dur. & Lév.) Sacc., *Pleurotus ostreatoroseus* Sing., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., *Pleurotus rickii* Bres., *Pleurotus submembranaceus* (Berk.) e *Pleurotus subtilis* (Berk.) Br.

*P. albidus* tem a seguinte classificação taxonômica (PUTZKE ; PUTZKE, 2004):

- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Classe: Basidiomycetes
- Ordem: Agaricales
- Família: Polyporaceae
- Gênero: *Pleurotus*
- Espécie: *Pleurotus albidus*

*P. albidus* (Figura 3) é comumente encontrado em troncos caídos, raramente em árvores vivas. As características morfológicas incluem píleo circular, infundibuliforme, glabro, cor branca a creme, às vezes apresenta cor marrom próximo ao encontro do estipe, margem inteira à crenada, fina, geralmente encurvada. As lamelas são decurrentes e brancas, estipe branco, geralmente curvado ascendentemente, ocasionalmente com pêlos na base e esporada branca a creme (LECHNER *et al* 2004). A espécie já foi relatada no México

(FUENTES; NAVA, 2006) e Argentina (LECHNER *et al*, 2004). No Brasil foi identificada na região Sul do país (PUTZKE, 2002), no Estado do Amapá (SÓTÃO *et al*, 2006) e recentemente no Amazonas (TEIXEIRA *et al*, 2009).



Figura 3- Aspecto macromorfológico dos basidiomas de *P. albidus*

FONTE: Retirado do Acervo fotográfico do Herbário Micológico Jair Putzke/UFAM

## 2.2 Produção de biomassa por fermentação submersa

A maneira mais comumente utilizada para a obtenção de biomassa de cogumelo é a fermentação semi-sólida, empregando como substratos resíduos agroindustriais de grande disponibilidade. Desta forma, a biomassa obtida é resultado da degradação dos nutrientes pela ação de enzimas lignolíticas e conversão em basidiomas. Contudo, esse processo requer um longo período de produção, que pode levar meses, além da dificuldade de controlar os fatores ambientais e possíveis contaminantes (TANG *et al*, 2007).

Nesse sentido, a fermentação submersa tem sido considerada uma alternativa promissora para a produção eficiente de biomassa de cogumelos comestíveis e seus metabólitos de interesse biotecnológico, devido a possibilidade de elevada produção em um espaço reduzido, produção em curto período de tempo, independente da sazonalidade, e a facilidade de controle dos parâmetros físico-químicos, o que garante menores riscos de

contaminação e a obtenção dos produtos de maneira uniforme, quando comparado a fermentação semi-sólida (GREGORI *et al*, 2007; PAPASPYRIDIS *et al*, 2010).

A fermentação submersa utilizando cogumelos é caracterizada pelo aumento da viscosidade do meio de cultivo durante o período de fermentação, que pode ser resultado do aumento da concentração celular, alterações na morfologia celular, além da produção de compostos extracelulares que podem alterar as características reológicas do meio (TANG *et al*, 2007). Além disso, não há produção de basidiomas, contudo são formados aglomerados de hifas que assumem uma forma normalmente esférica, denominada de *pellets*. A biomassa resultante pode ser utilizada como inóculo na fermentação semi-sólida para produção de basidiomas, como aditivo alimentar, ou ainda para a extração de compostos com atividade antimicrobiana, aromas, polissacarídeos, antioxidantes e outros (ZANOTELLI *et al*, 2007)

A composição nutricional da biomassa oriunda da fermentação submersa de *Pleurotus ostreatus* tem sido estudada e comparada aos basidiomas resultantes do cultivo semi-sólido. Hadar; Cohen-Arazi (1986) analisaram a composição química dos basidiomas de *P. ostreatus* produzidos em resíduo de algodão e da biomassa por fermentação submersa, tendo a glicose como principal fonte de carbono. Os resultados mostraram similaridades em relação ao conteúdo de cinzas (6,1% e 5,8%), glicogênio (13,4% e 13,3%), ácidos graxos (1,6% e 1,5%), proteínas (24,3% e 23,3%) e nitrogênio total (4,0% e 3,8%), para os basidiomas e biomassa micelial, respectivamente. Além disto, os autores verificaram que embora o conteúdo de ácidos graxos tenha sido semelhante, a biomassa micelial apresentou maior quantitativo de ácidos graxos saturados que nos basidiomas.

O conteúdo de aminoácidos também foi analisado nas diferentes amostras e os resultados revelaram que na biomassa obtida por fermentação submersa foram encontrados níveis elevados de ácido aspártico, cisteína, fenilalanina e leucina, enquanto que nos

basidiomas os maiores valores foram para valina e isoleucina (HADAR; COHEN-ARAZI, 1986).

Confortin *et al* (2008) avaliaram a produção de biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator, contendo glicose como fonte de carbono. A composição química foi comparada com dados na literatura para basidiomas da mesma espécie e os resultados revelaram valores similares de proteínas (32,1% e 36,36%), fibras (46,45% e 35,8%) e carboidratos (55,5% e 55,35%) na biomassa e basidiomas, respectivamente, contudo o conteúdo de lipídios e calorías foi maior (10,2% e 362,6 kcal, respectivamente) na biomassa de *P. sajor-caju*.

### **2.3 Fatores que influenciam na fermentação submersa**

As exigências nutricionais dos cogumelos por fermentação submersa são, ao mesmo tempo, pouco conhecidas e bastante diversificadas podendo haver diferenças até dentro de uma mesma espécie. Além da composição do meio de cultivo outros fatores devem ser avaliados quando se deseja obter elevados rendimentos de biomassa por fermentação submersa, a saber: pH, temperatura, velocidade de agitação e outros.

#### **2.3.1 Fontes de carbono**

Os carboidratos considerados fontes de energia e de carbono são os maiores componentes do citoesqueleto, além de serem a base constituinte de proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e da parede celular. A presença de carboidratos nos meios de cultivo é de extrema importância no crescimento e síntese de produtos metabólitos dos fungos superiores (CHANG; MILES, 2004; XIAO *et al*, 2005).

Os fungos são muito versáteis quanto à utilização de fontes de carbono, tanto que muitas espécies são capazes de utilizar monossacarídeos, polissacarídeos, polióis e ácidos orgânicos. Na natureza os cogumelos crescem principalmente sobre troncos de árvores vivas

ou em decomposição, material rico em polissacarídeos como celulose, lignina e hemicelulose. Tais polissacarídeos são insolúveis e para que possam ser metabolizados devem ser degradados pela ação de enzimas extracelulares que são excretadas pelo micélio. Em laboratório, a fonte de carbono mais comumente utilizada pela maioria dos fungos é a glicose, embora algumas espécies possam crescer sob a influência de outras fontes de carbono (CHANG; MILES, 2004).

Adenipekun; Gbolagade (2006) utilizaram sete monossacarídeos e cinco dissacarídeos para avaliar o crescimento micelial de *P. florida* por fermentação submersa. Os resultados mostraram que houve diferença no crescimento do cogumelo e dentre as fontes de carbono testadas a glicose proporcionou a maior produção de biomassa (186,7 mg.30mL<sup>-1</sup>). Já a sacarose pouco favoreceu o crescimento de *P. florida*, com apenas 46,7 mg.30mL<sup>-1</sup>, resultado quatro vezes menor quando comparado à glicose.

Wu *et al* (2008) investigaram o efeito de fontes de carbono no crescimento micelial e produção de polissacarídeos de *P. citrinopileatus*. Esses autores verificaram que o máximo crescimento micelial foi alcançado quando se utilizou frutose, seguido por glicose. Além disso, os monossacarídeos avaliados proporcionaram maior crescimento do fungo em relação aos dissacarídeos.

A influência de cinco fontes de carbono para a produção de biomassa e polissacarídeos de *Grifola frondosa* por fermentação submersa foi avaliada por Lee *et al* (2004). Os resultados mostraram que a adição de 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose no meio de cultivo favoreceu tanto a maior produção de biomassa quanto de polissacarídeos.

No estudo realizado por Wu *et al* (2003) os autores avaliaram a curva de crescimento de *P. tuber-regium* em meio de cultivo, contendo, separadamente, frutose, glicose e amido de milho, na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup>. Em todos os ensaios verificou-se a máxima produção de biomassa após o 10º dia de cultivo. Embora os meios formulados com amido de milho tenham

apresentado maior produção de biomassa ocorreu um rápido decréscimo da biomassa a partir desse período. Entre os dois monossacarídeos avaliados frutose proporcionou maior crescimento micelial da biomassa em relação à glicose.

Gbolagade *et al* (2006) estudaram cerca de 17 fontes de carbono, incluindo açúcares simples, oligossacarídeos, polissacarídeos e polióis no crescimento de *Lentinus subnudus* por fermentação submersa. Após uma semana de incubação, a maior produção de biomassa foi obtida em meio formulado contendo frutose (193,3 mg.30 mL<sup>-1</sup>), seguida de glicose (150 mg.30 mL<sup>-1</sup>), enquanto que a arabinose não favoreceu o crescimento do cogumelo (43,3 mg.30 mL<sup>-1</sup>).

### 2.3.2 Fontes de nitrogênio

Diversos estudos demonstram que o nitrogênio é um componente essencial na síntese de proteínas, purinas, pirimidinas e algumas vitaminas (CHANG; MILES, 2004). A habilidade que os cogumelos têm em colonizar os substratos naturais que são reconhecidamente pobres em nitrogênio é uma adaptação ecológica para o seu crescimento na natureza. O maior conteúdo de compostos nitrogenados na madeira é de proteínas, localizados no xilema de células vivas ou associada à parede celular. Nesse sentido, as proteases assumem uma função importante no crescimento micelial e formação dos basidiomas.

Gbolagade *et al* (2006) avaliaram o crescimento de *P. tuber-regium* sob 17 diferentes fontes de nitrogênio, sendo sete aminoácidos, cinco fontes orgânicas complexas e cinco fontes inorgânicas. Os resultados mostraram que a adição de extrato de levedura (200 mg.30 mL<sup>-1</sup>), peptona (140 mg.30 mL<sup>-1</sup>), nitrato de sódio (130 mg.30 mL<sup>-1</sup>) e extrato de malte (120 mg.30 mL<sup>-1</sup>) estimularam o crescimento de *P. tuber-regium*. Dentre os aminoácidos testados, asparagina, alanina, leucina e glutamina tiveram crescimento moderado, enquanto os demais não diferiram estatisticamente em relação ao meio controle (48,3 mg.30 mL<sup>-1</sup>). De uma forma

geral, observou-se que com exceção da uréia, as demais fontes complexas de nitrogênio estimularam mais o crescimento do cogumelo quando comparado aos aminoácidos.

Na pesquisa realizada por Wu *et al* (2008) foi avaliada a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biomassa e polissacarídeos de *P. citrinopileatus* por fermentação submersa. A maior produção de biomassa foi alcançada quando se utilizou extrato de levedura no meio de cultivo e comparando os resultados com as fontes orgânicas, verificou-se que as fontes inorgânicas foram pouco eficientes na produção de biomassa.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Le *et al* (2007) ao estudar o efeito de sete fontes de nitrogênio na produção de biomassa e polissacarídeos de *P. nebrodensis*. Os autores verificaram que ao utilizarem peptona, extrato de levedura ou extrato de carne, a produção de biomassa era bem maior quando comparada às fontes inorgânicas de nitrogênio. Wu *et al* (2008) sugere que a preferência desses organismos pelas fontes orgânicas seja pelo fato de que certos aminoácidos essenciais necessários ao metabolismo fúngico não são sintetizados a partir de fontes inorgânicas de nitrogênio.

### 2.3.3 Fontes de lipídios

Estudos têm mostrado que a adição de óleos vegetais é um fator estimulante de crescimento para algumas espécies de cogumelos, além de favorecer a produção de outros metabólitos de importância, a exemplo da excreção de enzimas, ácido cítrico, dentre outros. Esse fato parece ser atribuído à parcial incorporação dos lipídios na membrana celular, facilitando a absorção de nutrientes no meio de cultivo (YANG *et al*, 2000).

Shih *et al* (2006) estudaram o efeito de diferentes concentrações de óleos vegetais (0,1, 0,5 e 1,0%) na produção de biomassa de *Antrodia cinnamomea* em cultivo submerso. Os resultados mostraram que a presença de óleos vegetais (óleo de soja, oliva, coco, girassol e amendoim) no meio de cultivo estimulou a produção de biomassa de *A. cinnamomea* tanto no



10° quanto no 14° dias de incubação. Verificou-se também que, à medida que elevou-se a concentração de todas as fontes de lipídio no meio de cultivo, a produção da biomassa também foi maior.

Pi *et al* (2005) no cultivo de *Lentinus squarrosulus* e *Psathyrella atroumbonata*, avaliaram o efeito de seis fontes de lipídios adicionadas ao meio de cultivo nas concentrações de 0,001, 0,003, 0,005 e 0,007 mL.mL<sup>-1</sup>. Os autores observaram que o tipo da fonte de lipídio influenciou de forma significativa na produção de biomassa de *L. squarrosulus* e *P. atroumbonata*. A presença da nata no meio de cultivo favoreceu a produção da biomassa de *L. squarrosulus* e *P. atroumbonata* e foi estatisticamente maior quando comparado às outras fontes lipídicas (coco, algodão, amendoim, amêndoa). Além disso, a concentração de lipídios testada teve efeito significativo para ambas as espécies. As concentrações de 0,003, 0,005 e 0,007 mL.mL<sup>-1</sup> favoreceram a produção da biomassa, com valores comparativamente maiores em relação à concentração de 0,001 mL.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.3.4 Macro, microminerais e vitaminas

Jonathan; Fasidi (2001) estudaram o efeito da utilização de macrominerais (magnésio, cálcio, potássio e sódio) e microminerais (cobre, ferro, manganês, cobalto e zinco) na produção da biomassa de *Psathyrella atroumbonata* por fermentação submersa. Para tanto, foram preparados meios de cultivo controle contendo todos os macro e microminerais, separadamente, e meios de cultivo sem um dos minerais. Os resultados indicaram que o meio de cultivo formulado com todos os macrominerais favoreceu o maior rendimento em biomassa (120 mg.mL<sup>-1</sup>), indicando que o macrofungo necessita da utilização de todos esses minerais, embora a quantidade de cada um deles, individualmente, seja variável. Por exemplo, o meio de cultivo sem adição de sódio estimulou a maior produção de biomassa

quando comparado a potássio, cálcio e magnésio. Além disso, os resultados mostraram que o cálcio foi o macromineral mais utilizado pelo fungo, seguido de magnésio, potássio e sódio.

Em relação aos microminerais Jonathan; Fasidi (2001) verificaram que a maior produção de biomassa foi obtida no meio de cultivo formulado sem a adição de cobalto ( $126,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), seguido de manganês ( $126,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), ferro, zinco e cobre, sugerindo que *P. atroumbonata* pode crescer na ausência de cobalto e manganês.

A influência de vitaminas no crescimento de *P. florida* foi analisada por Adenipekun; Gbolagade (2006). Os resultados mostraram que em cultivo submerso a presença da tiamina no meio de cultivo foi a melhor fonte de vitamina para a produção de biomassa de *P. florida* ( $146,7 \text{ mg.30 mL}^{-1}$ ), seguida por piridoxina ( $133,3 \text{ mg.30 mL}^{-1}$ ). Em contrapartida, os autores observaram baixa produção de biomassa ( $48,3 \text{ mg.30 mL}^{-1}$ ) quando utilizou-se cobalamina.

### 2.3.5 Influência de temperatura, pH e velocidade de agitação

A temperatura é um parâmetro de grande importância no crescimento dos fungos. Gbolagade *et al*, (2006) analisando o comportamento de *Lentinus subnudus* em temperaturas variando entre  $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  observaram que, embora o fungo tenha crescido na faixa de temperatura entre  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a máxima produção de biomassa foi obtida a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $150 \text{ mg.30 mL}^{-1}$ ). Le *et al* (2008) estudaram *P. nebrodensis* em diferentes faixas de temperatura e pH e verificaram que a máxima produção de biomassa foi obtida na temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e em pH 8,0.

Com relação ao efeito da agitação, Tang *et al* (2007) relataram que na fermentação submersa, o meio de cultivo deve ser submetido à agitação para que haja homogeneização adequada dos componentes do meio e promova transferência de massa e calor. No entanto, a velocidade de agitação também pode criar forças de cisalhamento que podem ser danosas às

hifas e causar mudanças no micélio, variações na taxa de crescimento e formação do produto de interesse.

A influência da agitação na morfologia da biomassa de *Cordyceps militaris* produzida por fermentação submersa foi avaliada por Park *et al* (2002). Os autores verificaram que os *pellets* formados durante o período de cultivo aumentaram de tamanho independente da frequência de agitação, contudo quando o processo fermentativo foi conduzido sob agitação mais reduzida os *pellets* tornaram-se mais largos e macios, enquanto que sob agitação mais elevada as partes externas dos *pellets* foram removidas e, conseqüentemente, tornaram-se mais reduzidas e perderam a sua morfologia circular.

#### 2.4 Considerações gerais sobre barras de cereais

As primeiras barras de cereais foram comercializadas em meados da década de 80 no Reino Unido. Apesar da venda de produtos fora do país sempre influenciar o mercado brasileiro, as barras de cereais não tiveram muita divulgação nesse período, somente em 1992 a empresa Nutrimental lançou o primeiro produto desse segmento no país. Desde então, as barras de cereais ganharam grande popularidade e as empresas brasileiras vêm investindo fortemente nessa área, visando ampliar o seu público consumidor que, inicialmente era predominantemente de atletas ciclistas ou corredores de maratonas, para pessoas que também desejam manter ou diminuir o peso corporal (CÓRDOVA, 2012; MAESTRI *et al*, 2012).

Estimativas apontam para um consumo de cerca de 2,9 bilhões de dólares/ano de barras de cereais somente nos Estados Unidos, enquanto que no Brasil esse valor é de aproximadamente 4 milhões de dólares (CARVALHO, 2008). Estudos recentes demonstram que o consumo de barras de cereais entre os jovens adultos com idades variando entre 15 a 25 anos aumentou nos últimos anos, representando 62,5% dos consumidores desse produto (BRITO *et al*, 2004).

A busca crescente dos consumidores por uma alimentação rápida e mais adequada com a finalidade de evitar ou corrigir problemas diversos na saúde humana tem levado a população a consumir esse tipo de produto. Além disto, as barras de cereais são fáceis de encontrar, transportar e podem ser ingeridas como uma forma de repor as energias gastas durante as atividades diárias (CARVALHO, 2008; FREITAS; MORETTI, 2006).

Os cereais em barras vendidos na forma retangular em embalagens individuais contendo cerca de 20 a 25 g de produto são considerados uma classe de produtos de confeitaria. As barras de cereais são multicomponentes e podem apresentar ingredientes complexos na sua formulação, a exemplo de frutas desidratadas e cereais como a aveia, trigo, milho, arroz e soja. Diferentes tipos de ingredientes utilizados na formulação de barras de cereais são citados na literatura, e podem ser divididos em três grupos: os ingredientes secos, aglutinantes e os compostos de revestimento (CARVALHO, 2008; GUTKOSKI *et al*, 2007). Nesse sentido, diversas pesquisas já foram realizadas visando a produção de barras de cereais utilizando frutos regionais do Cerrado, como polpa de baru (LIMA *et al*, 2010), amêndoa de macaúba (DESSIMONI-PINTO *et al*, 2010), amêndoa de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia (CARVALHO, 2008), quinoa (SILVA *et al*, 2011), resíduos da agroindústria (CICHACZEWSKI, 2012; FONSECA *et al*, 2011; SILVA *et al*, 2009) e outros.

Na elaboração desse tipo de produto devem ser considerados alguns aspectos importantes, a saber: a escolha dos cereais e dos carboidratos, o enriquecimento com outros nutrientes e a estabilidade no processamento com a finalidade de garantir a complementaridade dos ingredientes nas características de textura, sabor, odor e outras propriedades físicas. Comumente, tem-se verificado certa preferência por produtos que apresentem um reduzido teor de lipídios, alto conteúdo de fibras e elevado valor energético (GUTKOSKI *et al*, 2007).

### **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar *in vitro* as condições de produção e as propriedades nutricionais de *Pleurotus albidus* DPUA 1692 com a finalidade de elaborar barras de cereais suplementadas com a biomassa desse cogumelo comestível da Amazônia.

### **4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o crescimento micelial radial de *P. albidus* em meio sólido para selecionar um meio formulado para manutenção da cultura matriz;
- Verificar a produção da biomassa de *P. albidus* por fermentação submersa utilizando diferentes volumes de inóculo, fontes de carbono e nitrogênio;
- Avaliar a influência de diferentes parâmetros físico-químicos, como concentração de sacarose e extrato de levedura, pH e velocidade de agitação, na produção de biomassa de *P. albidus* por fermentação submersa;
- Avaliar o potencial nutricional da biomassa de *P. albidus* produzida por fermentação submersa;
- Elaborar barras de cereais com a biomassa de *P. albidus*;
- Caracterizar as barras de cereais quanto a sua composição centesimal, suas características físicas, químicas e sensoriais.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Organismo e reativação da cultura

*P. albidus* DPUA 1692, do acervo da Micoteca DPUA da Universidade Federal do Amazonas foi a espécie utilizada neste estudo. As culturas preservadas em óleo mineral foram reativadas em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v) em placas de Petri. Os cultivos foram incubados a 25 °C na ausência de luz por oito dias (KIRSCH *et al*, 2011).

### 5.2 Avaliação do crescimento micelial radial em meio sólido

Com a finalidade de selecionar um meio de cultura adequado para a manutenção de *P. albidus* o crescimento micelial radial foi avaliado em seis diferentes meios de cultura: ágar batata dextrose, ágar batata dextrose + extrato de levedura (0,5 %, p/v), ágar Sabouraud, ágar Sabouraud + extrato de levedura (0,5 %, p/v), ágar extrato de malte, ágar extrato de malte + extrato de levedura (0,5 %, p/v). Os meios de cultura foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos e distribuídos em placas de Petri.

Discos miceliais medindo 8 mm de diâmetro foram retirados da periferia das culturas obtidas do item 5.1, inoculados no centro da superfície dos meios de cultura e incubados à 25 °C, na ausência de luz. A taxa de crescimento radial foi avaliada medindo-se o diâmetro da colônia com auxílio de uma régua em duas direções perpendiculares, a cada 24 horas, a partir do 2º dia de cultivo até a completa colonização na placa. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

O vigor do micélio foi avaliado através de critério subjetivo utilizando-se as seguintes notas: (1) micélio fracamente adensado; (2) micélio mediamente adensado e (3) micélio fortemente adensado (MARINO; ABREU, 2009).

### 5.3 Produção da biomassa de *P. albidus* por fermentação submersa

#### 5.3.1 Influência do volume de inóculo

Com a finalidade de avaliar a influência do volume de inóculo na produção de biomassa micelial foi utilizado um meio basal contendo: (g.L<sup>-1</sup> de água destilada), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5), peptona (10,0) e glicose (20,0). O pH foi aferido para 6,0, em seguida 50 mL de meio foram distribuídos em frascos Erlenmeyers (125 mL) e esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

A partir dos subcultivos de *P. albidus* em BDA com extrato de levedura 0,5 % (p/v) foi preparada uma suspensão de micélio homogeneizando-se em um triturador modelo LAR 2 previamente esterilizado a cultura de *P. albidus* com 50 mL de água destilada esterilizada (por placa). Desta suspensão foram retirados diferentes volumes (0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 6,0 mL) e adicionados aos meios de cultura e a fermentação submersa foi conduzida durante cinco dias a 25 °C em agitador orbital (Certomat U) 150 rpm (WU *et al*, 2003).

Ao término do processo fermentativo a biomassa foi separada por filtração a vácuo em papel de filtro com peso conhecido, lavada três vezes com água destilada e desidratada a 70 °C para quantificação.

#### 5.3.2 Influência de fontes de carbono

Diferentes fontes de carbono foram utilizadas para avaliar a produção da biomassa de *P. albidus* por fermentação submersa. Desta forma, a glicose do meio basal (item 5.3.1.) foi substituída, separadamente, pela frutose, maltose, sacarose e maltose na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup>. O pH foi aferido para 6,0 e os meios de cultura esterilizados 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento dos meios 6 mL da suspensão de micélio (item 5.3.1.) foram adicionados e a fermentação submersa foi conduzida segundo descrito no item anterior. A biomassa

produzida foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo em papel de filtro com peso conhecido, lavada três vezes com água destilada e desidratada a 70 °C para quantificação.

### 5.3.3 Influência de fontes de nitrogênio

A influência de fontes de nitrogênio na produção da biomassa de *P. albidus* foi avaliada substituindo-se a peptona do meio basal (5.3.1.) pelo extrato de levedura, triptona, nitrato de sódio e sulfato de amônio na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup>. O pH foi aferido para 6,0, os meios de cultura foram distribuídos em frascos Erlenmeyers (125 mL) e esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Uma alíquota de 6 mL da suspensão de micélio (item 5.3.1.) foi adicionada e a fermentação submersa foi conduzida conforme descrito no item anterior. A biomassa produzida foi separada por filtração a vácuo em papel de filtro com peso conhecido, lavada três vezes com água destilada e desidratada a 70 °C para quantificação.

### 5.3.4 Determinação de carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais foi determinada utilizando-se a metodologia do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956). Após a filtração da biomassa (itens 5.3.2 e 5.3.3) o extrato bruto foi coletado e uma alíquota de 0,25 mL foi homogeneizada com 0,25 mL de solução de fenol a 5% (p/v) e 1,5 mL de ácido sulfúrico, em tubos de ensaio. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a leitura das amostras foi feita em 490 nm. A concentração de carboidratos totais foi estimada através da correlação da absorbância com a curva padrão de solução de sacarose (0,01 a 0,1 g.L<sup>-1</sup>).



5.3.5 Cálculos dos fatores de conversão do substrato em biomassa, rendimento e produtividade.

A partir da biomassa obtida nos itens 5.3.2 e 5.3.3. foram determinados os fatores de conversão do substrato em biomassa, bem como o rendimento em biomassa e a produtividade, segundo Gern (2005).

#### 5.3.5.1 Determinação do fator de conversão do substrato em biomassa

Para determinar o fator de conversão do substrato em biomassa foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Y_{(X/S)} = (X_f - X_i) / (S_i - S_f)$$

Onde:

$Y_{(X/S)}$  = fator de conversão do substrato em biomassa ( $g \cdot g^{-1}$ )

$X_f$  = concentração final de biomassa ( $g \cdot L^{-1}$ )

$X_i$  = concentração inicial de biomassa ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_f$  = substrato final [concentração final do açúcar ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_i$  = substrato inicial [concentração inicial do açúcar ( $g/L$ )

#### 5.3.5.2 Determinação do rendimento em biomassa

Para determinar o rendimento do substrato foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Y_{(r/S)} = (X_f - X_i) / (S_i)$$

Onde:

$Y_{(r/S)}$  = rendimento do substrato em biomassa ( $g \cdot g^{-1}$ )

$X_f$  = concentração final de biomassa ( $g \cdot L^{-1}$ )

$X_i$  = concentração inicial de biomassa ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_i$  = substrato inicial [concentração inicial do açúcar ( $g \cdot L^{-1}$ )

### 5.3.5.3 Determinação da produtividade

Para determinar a produtividade em biomassa celular foi utilizada a seguinte fórmula:

$$P_X = (X_f - X_i)/t$$

Onde:

$P_X$  = produtividade substrato em biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$X_f$  = concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_i$  = concentração inicial de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t$  = tempo de fermentação (h)

### 5.3.6 Planejamento fatorial

Para avaliar a influência de fatores físico-químicos na produção da biomassa de *P. albidus* foi empregado um planejamento fatorial completo  $2^4$ , (Tabela 1), com quatro pontos centrais, totalizando 20 experimentos (NETO *et al*, 2002). As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nesses experimentos foram selecionadas com base nos resultados obtidos dos processos fermentativos (itens 5.3.2 e 5.3.3).

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	10	20	30
Concentração de extrato de levedura ( $\text{g.L}^{-1}$ )	2,5	5,0	10,0
pH	5,0	6,0	7,0
Velocidade de agitação (rpm)	120	150	180

Tabela 1- Níveis das variáveis do planejamento fatorial  $2^4$  para avaliar a produção da biomassa de *P. albidus* (-1), (0) e (+1) correspondem aos níveis inferior, central e superior, respectivamente.

### 5.3.7 Avaliação morfológica da biomassa de *P. albidus* produzida na fermentação submersa

Os detalhes morfológicos da biomassa produzida nos experimentos realizados do planejamento fatorial (item 5.3.6) foram avaliados através do software Analysis FIVE

Olympus acoplado a um estereomicroscópio (Olympus SZ61, Ltd, Tokyo, Japan). Para tanto, as amostras foram fixadas com uma solução contendo 13 mL of formaldeído 40% (v/v), 5 mL de ácido acético e 200 mL of etanol 50%, (v/v) e posteriormente visualizadas em estereomicroscópio (KIM *et al*, 2003).

#### 5.4 Produção da biomassa de *P. albidus* em escala ampliada

Com base nos resultados obtidos do planejamento fatorial (item 5.3.6) a produção da biomassa de *P. albidus* foi realizada em frascos Erlenmeyer (1000 mL). O meio de fermentação (500 mL) foi formulado conforme item 5.3.6 e neste foi adicionado inóculo equivalente (item 5.3.1) a 12% do volume do meio de fermentação. A fermentação submersa foi conduzida a 25 °C sob agitação pré-determinada (item 5.3.6) durante 5 dias. Ao término do processo fermentativo a biomassa foi separada do extrato bruto e desidratada para quantificação e avaliação das características físico-químicas.

#### 5.5 Análise da composição nutricional da biomassa de *P. albidus*

##### 5.5.1 Determinação da composição centesimal e valor calórico da biomassa de *P. albidus*

A avaliação da composição centesimal e valor calórico da biomassa de *P. albidus* foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas, conforme metodologias oficiais da Association Official Analytical Chemists (AOAC, 1997).

- Determinação da umidade: a umidade foi determinada por dessecação em estufa a 105 °C até peso constante.
- Determinação de cinzas: o conteúdo de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C até os resíduos apresentarem uma coloração cinza claro ou branca.

- Determinação de nitrogênio total e proteínas: a determinação de nitrogênio total foi feita pelo método de Kjeldahl. Para a determinação de proteínas totais foi empregado o seguinte fator de correção: Proteínas (%) = N x 4,38.

- Determinação de lipídios: para determinação do teor de lipídios foi utilizado o método Bligh e Dyer. Nesse método são extraídas todas as classes de lipídios sem aquecimento que são obtidos por pesagem.

- Determinação de fibra bruta: para determinação do teor de fibra bruta a biomassa foi submetida à digestão ácida com solução de ácido sulfúrico 1,25% (v/v), seguida por digestão alcalina com hidróxido de sódio 1,25% (p/v). As amostras foram filtradas a vácuo com papel de filtro e o resíduo resultante da hidrólise foi incinerado em mufla a 550 °C até a formação de cinzas.

- Determinação de carboidratos: o teor de carboidratos totais foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$C (\%) = 100 - (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{lipídios} + \text{proteínas}).$$

- Determinação do valor calórico: o valor calórico foi determinado utilizando-se fatores de conversão de Atwater: 4 kcal.g<sup>-1</sup> (proteína), 4 kcal.g<sup>-1</sup> (carboidratos) e 9 kcal.g<sup>-1</sup> (lipídios), conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times \text{proteínas} + 4 \times \text{carboidratos} + 9 \times \text{lipídios}$$

### 5.5.2. Determinação do pH, atividade de água e acidez total titulável da biomassa de *P. albidus*

- Determinação do pH: para a determinação da medida de pH foram pesados 10 g de cada amostra e adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada. A solução foi agitada por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi coletado e acondicionado em Becker para realização da leitura do pHmetro marca Quimis.
- Determinação da atividade de água: A atividade de água da biomassa de *P. albidus* foi determinada por higrômetro marca Bras-Eq, a temperatura de 25 °C.
- Determinação da acidez total titulável: Para a determinação da acidez total titulável foi pesado 1 g da biomassa, adicionado em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada. Após homogeneização da solução por 1 minuto foi realizada a titulação com solução de NaOH 0,1 N, usando como indicador 3 gotas de fenolftaleína (BRASIL, 2005).

### 5.5.3 Determinação da composição mineral da biomassa de *P. albidus*

A determinação da composição mineral da biomassa de *P. albidus* foi realizada no Laboratório de Análise de Solos e Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental. Para tanto, a amostra foi acondicionada em tubos Kjeldhal foram submetidas à digestão adicionando-se 10 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), P.A para eliminação do óxido nitroso. A digestão completa foi realizada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e em seguida foi adicionada uma solução de 1,0% de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (óxido de lantânio) e as amostras diluídas em água ultrapura para leitura em Espectrometria de absorção atômica de chama ar/acetileno: AAS 932 plus - Leitura de Minerais em GBC Aas 932 Plus. O teor de fósforo foi determinado em espectrofotômetro UV/Vis da Thermo, modelo Helyos Beta (MALAVOLTA *et al*, 1989).

Os macrominerais (cálcio, potássio, magnésio, sódio, fosfato) e os microminerais (cobre, ferro, zinco, cobalto, cromo e manganês) foram expressos em  $\text{g.kg}^{-1}$  e  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente.

#### 5.5.4. Determinação da composição de aminoácidos da biomassa de *P. albidus*

A determinação da composição de aminoácidos da biomassa de *P. albidus* foi realizada no Laboratório de Fontes Proteicas da Universidade Estadual de Campinas, segundo metodologia proposta por White *et al* (1986), com modificações. Para tanto foi utilizada uma coluna LUNA C18 100Å 5 u 250 x 4,6 mm 00G-4252-EQ de baixo custo comercial. Outra modificação foi relacionada ao sistema de secagem, os tubos onde as alíquotas das amostras foram colocadas para serem tratadas e derivatizadas apresentaram um diâmetro interno aumentado de 6 para 8mm, desta forma as 3 etapas de preparo das alíquotas foram efetuadas em 50 minutos. O triptofano foi quantificado segundo Spies (1967) por digestão alcalina com NaOH 5N. Os resultados foram expressos em  $\text{g.100g}^{-1}$ .

#### 5.5.5 Determinação da atividade antioxidante da biomassa de *P. albidus*

Para a determinação da atividade antioxidante 2 g da biomassa desidratada de *P. albidus* foi homogeneizada com 20 mL de álcool etílico absoluto e a mistura foi mantida sob agitação constante por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a biomassa foi filtrada em papel de filtro e o volume do extrato recuperado foi completado para 20 mL (10%, v/v). A partir deste extrato foi preparada uma diluição 1% (v/v) (CONFORTIN, 2008).

A atividade antioxidante foi avaliada pela porcentagem de inibição de oxidação do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). Em um ambiente escuro, uma alíquota de 0,1 mL de cada extrato foi adicionada a 0,1 mL de solução etanólica de DPPH (0,06 mM) e após 30 minutos à temperatura ambiente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 517

nm. Como controle positivo foi utilizado o ácido gálico (ROESLER *et al*, 2007; VORARAT *et al*, 2010).

A capacidade de seqüestrar radical livre foi expressa pelo percentual de inibição de oxidação do radical, conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extrato}}) / (A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde:

$A_{\text{DPPH}}$  = absorvância da solução de DPPH

$A_{\text{Extrato}}$  = absorvância da amostra em solução.  $A_{\text{Extrato}}$  foi calculado pela diferença da absorvância da solução da amostra testada pelo seu branco.

#### 5.6 Preparo dos extratos orgânicos e teste de toxicidade da biomassa de *P. albidus* frente a *Artemia salina*

Os extratos orgânicos da biomassa de *P. albidus* avaliados em relação a toxicidade frente a *A. salina* foram preparados pesando-se 2 g da biomassa desidratada e adicionando-se, 50 mL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada durante 24 horas a 25 °C sob agitação de 150 rpm e ao término o extrato foi recuperado em papel de filtro e concentrado sob vácuo. A partir deste extrato diferentes concentrações de 15 a 2000 µg.mL<sup>-1</sup> em DMSO (10%, v/v) foram utilizados nos experimentos.

O teste de toxicidade foi avaliado segundo metodologia de Harwig; Scott (1971), González *et al* (2007) e Atayde *et al* (2008). Os cistos de *A. salina* (0,1%, p/v) foram incubados em solução de sal marinho não-iodado (3%, p/v) durante 30 horas sob luminosidade constante em agitador orbital a 30 °C e 140 rpm. Em uma microplaca de 24 poços foram adicionados 200 µL do extrato orgânico, 1700 µL de solução de sal marinho e 100 µL de suspensão de larvas de *A. salina*. A microplaca foi mantida nas mesmas condições

de cultivo das larvas. A mortalidade de *A. salina* foi determinada pela ausência da mobilidade interna e externa sob estereomicroscópio.

A porcentagem de toxicidade foi calculada pela fórmula abaixo e classificada da seguinte forma: não tóxico (NT, 0-9%), ligeiramente tóxico (LT, 10-49%), tóxico (T, 50-89%) e altamente tóxico (AT, 90-100%).

$$\text{Toxicidade (\%)} = (\text{Náuplios mortos})/(\text{Total de náuplios})$$

### 5.7 Determinação da qualidade microbiológica da biomassa de *P. albidus*

Para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene da biomassa de *P. albidus* foi realizada a determinação de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella* sp., conforme preconizado pela Resolução RDC n° 12 de janeiro/2001 (BRASIL, 2001). As análises microbiológicas seguiram as recomendações de SILVA *et al* (2001).

#### 5.7.1 Preparo da amostra

Para as análises microbiológicas 25 g da biomassa foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada durante 2 minutos e desta solução foram preparadas diluições seriadas até  $10^{-3}$  em tubos de ensaio contendo água peptonada.

#### 5.7.2 Contagem de Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*

De cada diluição preparada (item 5.7.1) foram retiradas alíquotas de 1 mL e inoculadas em séries de três tubos, contendo 9 mL de caldo Brila (Himedia ®, Mumbai-India) e um tubo de Duhran invertido para determinação presuntiva de coliformes totais. Os tubos foram incubados a 35 °C durante 24-48 h e a partir da observação de crescimento e produção



de gás foram realizados testes confirmativos para coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) a 35 °C por 24-48 horas e coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia®, Mumbai-India) a 45 °C por 24 horas. Os valores de NMP.g<sup>-1</sup> foram calculados conforme Silva et al. (2007).

A partir da observação de turvação do meio EC, com ou sem produção de gás foi realizada a confirmação de *E. coli*. Para tanto, uma alíquota deste meio de cultura foi retirada com auxílio de uma alça de platina e semeada em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e as placas foram incubadas a 35 °C por 24-48 horas.

#### 5.7.3 Contagem direta de *Salmonella* sp.

Para detecção de *Salmonella* sp. foi utilizado o procedimento descrito no item 5.7.1 e 5.7.2. A partir da confirmação de coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) da leitura positiva uma alíquota deste meio de cultura foi retirada com auxílio de uma alça de platina e semeada em ágar Verde Brilhante – VB (Himedia®, Mumbai-India). As placas foram mantidas a 35 °C por 24 horas e as colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos (SILVA *et al*, 2001).

#### 5.7.4 Contagem direta de *S. aureus* coagulase positiva

De cada diluição preparada (conforme item 5.7.1) foram retiradas alíquotas de 1 mL e transferidas para placas de Petri e em seguida vertidos 15 mL de ágar Manitol Salgado fundido e resfriado até 45 °C. Após homogeneização e solidificação do meio de cultura as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas e em seguida, as colônias fermentadoras de manitol foram contadas (SILVA *et al*, 2001). Para a confirmação de *S. aureus* coagulase positiva foram selecionadas 3 colônias típicas e outras 3 atípicas e transferidas para tubos contendo 2 mL caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI). Os tubos foram incubados a 37 °C

por 24 horas e em seguida alíquotas de 0,3 mL deste meio de cultivo foram retirados e adicionados a 0,3 mL de plasma de coelho em tubos de ensaio. O resultado foi considerado positivo quando após 6 horas de incubação a 37 °C houve formação de coágulos (SILVA *et al*, 2001).

## 5.8 Elaboração das barras de cereais utilizando a biomassa desidratada de *P. albidus*

### 5.8.1 Ingredientes para formulação das barras de cereais

Os ingredientes utilizados para a formulação das barras de cereais (xarope de glicose, açúcar mascavo, flocos de aveia, farelo de aveia, flocos de arroz, leite em pó desnatado, farinha de linhaça e castanha-do-Brasil) foram obtidos em estabelecimentos comerciais da cidade de Manaus/Amazonas.

### 5.8.2 Formulação das barras de cereais

As barras de cereais foram formuladas variando a concentração da biomassa de *P. albidus* para cada 100 g de produto, conforme citado na Tabela 2.

Ingredientes	Concentração (g.100 g <sup>-1</sup> )		
	A	B	C
Ingredientes secos			
Biomassa de <i>P. albidus</i>	0	4	8
Flocos de arroz	10	8	6
Flocos de aveia	20	18	16
Farinha de linhaça	6	6	6
Farelo de aveia	8	8	8
Leite em pó desnatado	8	8	8
Castanha-do-Brasil	3	3	3
Xarope de aglutinação			
Xarope de glicose	25	25	25
Açúcar mascavo	20	20	20

Tabela 2- Formulação das barras de cereais elaboradas com a biomassa de *P. albidus*

### 5.8.3 Preparação das barras de cereais

As barras de cereais foram preparadas 24 horas antes da análise sensorial no Setor de Agroindústria do Instituto Federal do Amazonas, Campus Manaus Zona Leste (IFAM/CMZL). Os ingredientes secos (flocos de arroz, flocos de aveia, farelo de aveia, farinha de linhaça, leite em pó desnatado, castanha-do-Brasil e a biomassa de *P. albidus*) foram pesados e homogeneizados em uma tigela de aço inox por cerca de 5 minutos, em seguida foram acondicionados em uma forma de aço inox e aquecidos em forno por aproximadamente 15 minutos a 100 °C.

O xarope de aglutinação foi preparado em uma panela de aço inox homogeneizando-se o xarope de glicose e o açúcar mascavo em banho-maria por 5 minutos. Terminado o tempo de preparação do xarope de aglutinação e do aquecimento dos ingredientes secos todos os ingredientes foram homogeneizados manualmente até atingirem uma massa uniforme. Em seguida esta massa uniforme foi distribuída em uma forma de aço inox forrada com papel manteiga. A massa foi mantida em repouso à temperatura ambiente até o seu resfriamento e em seguida com auxílio de uma espátula foram feitos cortes retangulares (40 mm x 20 mm) pesando aproximadamente 5 g. As barras de cereais foram embaladas em papel laminado e mantidas lacradas até o início dos testes sensoriais (Figura 4).

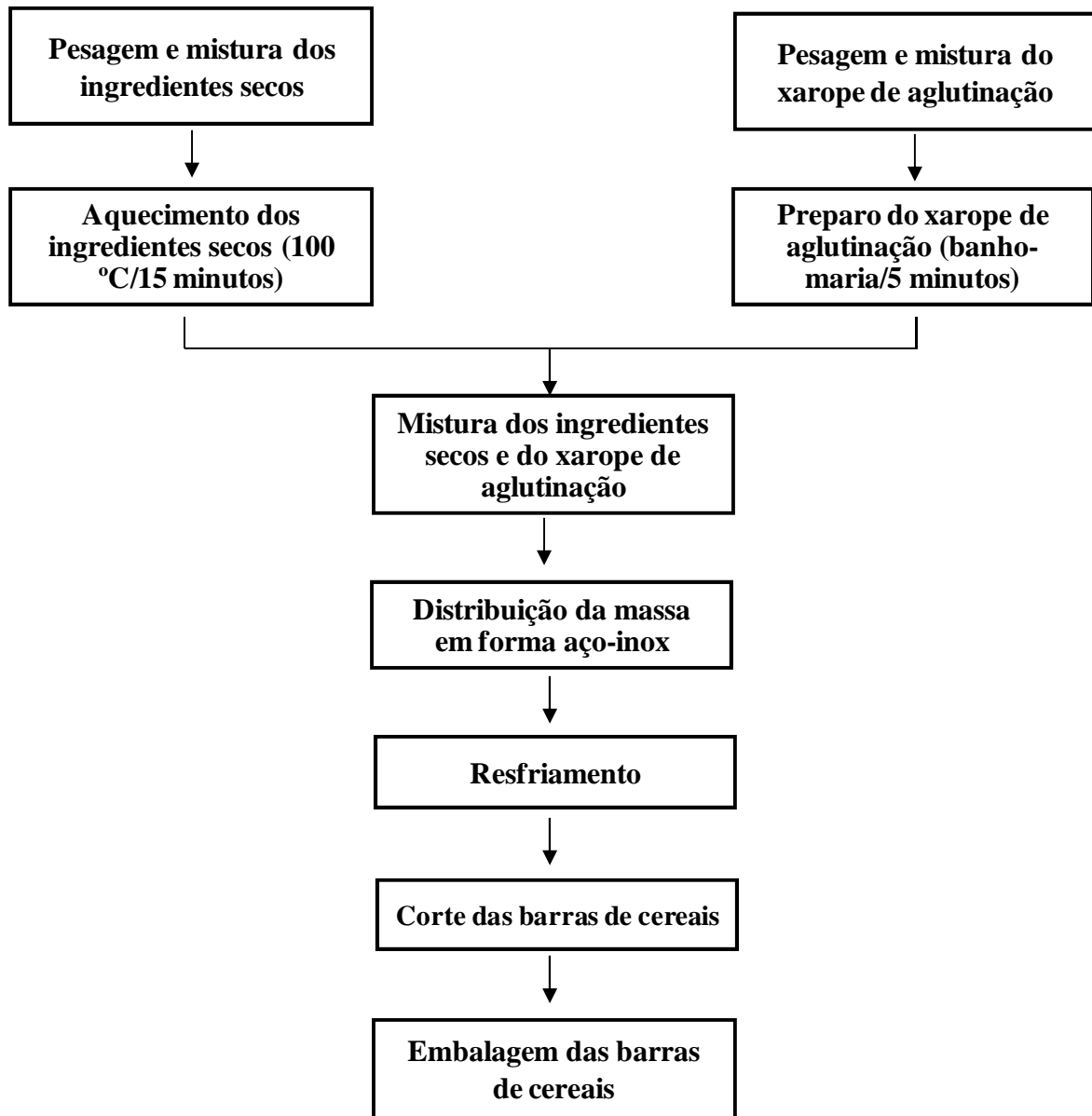


Figura 4- Fluxograma das etapas do preparo das barras de cereais utilizando a biomassa de *P. albidus*

### 5.9 Análise da composição nutricional das barras de cereais

As análises para determinar o pH, valor calórico, composição centesimal e mineral das barras de cereais elaboradas foram realizadas conforme descrito no item 5.5.

### 5.10 Determinação da análise microbiológica das barras de cereais

A enumeração de micro-organismos indicadores de higiene das barras de cereais foi realizada pela determinação de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella* sp., segundo descrito no item 5.7.

Para a quantificação de *Bacillus cereus* foram preparadas diluições sucessivas (semelhante a item 5.7.1) das amostras de barras de cereais. De cada uma destas diluições foram transferidas alíquotas de 1 mL para placas de Petri e em seguida, 15 mL de meio de cultura ágar tripticase de soja com polimixina B fundido e resfriado foram adicionados e homogeneizados. Após solidificação do meio as placas foram incubadas a 37 °C por 24/48 h (SILVA *et al*, 2001).

### 5.11 Análise sensorial das barras de cereais

Com a finalidade de avaliar a aceitabilidade das barras de cereais elaboradas foi realizado um teste afetivo de aceitabilidade, no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UFAM. Para tanto, foram recrutados verbalmente 44 provadores não-treinados, incluindo discentes, docentes e funcionários da FCA que deveriam atender aos critérios de inclusão e exclusão, conforme Tabela 3.

<b>Critérios de inclusão</b>	<b>Critérios de exclusão</b>
Idade entre 20 a 60 anos	Alérgico aos ingredientes das barras de cereais
Sexos Masculino e Feminino	Com resfriado
Apreciadores de barras de cereais	Diabéticos
Não fumantes	Gestantes

Tabela 3- Critérios de inclusão e exclusão para seleção dos provadores na análise sensorial

Após o aceite do provador em participar da análise sensorial, este foi orientado corretamente sobre o procedimento da análise e o preenchimento de duas cópias do termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE (Anexo 1) aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da UFAM (Parecer 137.288) (Anexo 2), ficando uma cópia com o provador e a outra entregue para a equipe do projeto.

Amostras de 5 g das barras de cereais elaboradas foram codificadas e servidas individualmente em pratos descartáveis, acompanhadas de água mineral no intervalo entre as degustações. Os provadores receberam uma ficha de avaliação da análise sensorial (Figura 5) correspondente às formulações das barras de cereais, onde foram avaliados os seguintes atributos: aparência, aroma, sabor, cor e aceitação geral, usando uma escala hedônica, variando de 1 (desgostei muito) a 5 (gostei muito), bem como a intenção de compra, segundo (DUTCOSKY, 2011).

Os dados obtidos para cada uma das três preparações das barras de cereais foram utilizados para calcular o índice de aceitabilidade, utilizando a seguinte fórmula (PEUCKERT *et al*, 2010):

$$IA (\%) = A \times 100 / B$$

Onde:

A = nota média obtida para o produto;

B = nota máxima dada ao produto

### 5.12 Análises estatísticas

Os resultados do planejamento fatorial foram avaliados utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). As demais análises foram pela análise de Variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o software MiniTab 16.

### FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( )F ( )M Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Escolaridade: ( ) Fundamental ( ) Médio ( ) Superior

**Com que frequência você consome barra de cereais:**

( ) Diariamente ( ) 2 a 3 vezes na semana ( ) 1 vez/semana ( ) 2 vezes/mês ( ) raramente.

Por favor, observe e indique usando o valor da escala abaixo, o quanto você **GOSTOU** ou **DESGOSTOU** da **COR, APARÊNCIA, AROMA, SABOR, e ACEITABILIDADE GERAL** das amostras de barras de cereal.

	Atributos do produto	Amostra		
		1	2	3
5- Gostei muito				
4- Gostei	Cor			
3- Não gostei nem desgostei	Aparência			
2- Desgostei	Aroma			
1- Desgostei muito	Sabor			
	Aceitabilidade geral			

Por favor, indique a **INTENÇÃO DE COMPRA** do produto, utilizando a escala baixo:

	Amostra	Intenção de compra
5- Certamente eu compraria		
4- Provavelmente eu compraria	1	
3- Talvez eu compraria	2	
2- Provavelmente eu não compraria	3	
1- Certamente eu não compraria		

Figura 5- Questionário de avaliação sensorial das barras de cereais formuladas com biomassa de *P. albidus*

## 6 REFERÊNCIAS

- ADENIPEKUN, C.O.; GBOLAGADE, J.S. Nutritional requirements of *Pleurotus florida* (Mont.) Singer, a nigerian mushroom. *Pakistan Journal of Nutritional*, v. 6, n. 5, p. 597-600, 2006.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 ed. Washington: Gaithersburg, 1997. 850 p
- ATAYDE, H.M. Potencial de toxicidade de microfungos isolados de ração para peixes fabricada no Estado do Amazonas. 2008. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução RDC n.12, de 03 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, seção 1. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018p.
- BRITO, I.P. *et al.* Elaboração e avaliação global de barra de cereais caseira. *Boletim CEPPA*, v. 22, n. 1, p. 35-50, 2004.
- CARVALHO, M.G. Barras de cereais com amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia, complementadas com casca de abacaxi. 2008. 93 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- CHANG, S.T.; MILES, P.G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, 451 p.
- CICHACZEWSKI, A. Desenvolvimento de uma barra de cereal rica em fibras, a partir do subproduto da extração do suco de maçã. 2012.55 f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.
- COHEN, R.*et al.* Biotechnological applications and potencial of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 5, p. 582-594, 2002.



CONFORTIN, F.G. *et al.* Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 10, p. 1149-1155, 2008.

CÓRDOVA, K.R.V. Barras de cereais com *Agaricus brasiliensis* e minerais: elaboração, caracterização física, química e sensorial. 2012.172 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DESSIMONI-PINTO, N.A.V *et al.* Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na elaboração de barras de cereais. *Alimentos e Nutrição*, v. 21, n. 1, p.77-84, 2010.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 380-356, 1956.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. 3 ed. Curitiba: Editora Champagnat, 2011. 426 p.

FAEMG. Cogumelos- mercado e comercialização. Disponível em: <http://www.faemg.org.br>> Acesso em: 12 de junho de 2010.

FONSECA, R.S.; SANTO, V.R.; SOUZA, G.B.; PEREIRA, C.A.M. Elaboração de barra de cereais com casca de abacaxi. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 61, n. 2, p. 216-223, 2011.

FORTES; R.C.; NOVAES, M.R.C.G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 52, n. 4, 2006.

FREITAS, D.G.C.; MORETTI, R.H. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 318-324, 2006.

FUENTES, A.M.; NAVA, E.B.; El “hongo blanco patón” *Pleurotus albidus*, em Hidalgo. Su primer registro em México. *Revista Mexicana de Micología*, v. 22, p. 41-47, 2006.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p.154-157, 2007.

GBOLAGADE, J.S. *et al.* Effect of physico-chemical factors and semi-synthetic media on vegetative growth of *Lentinus subnudus* (Berk.), an edible mushroom from Nigeria. Food Chemistry v. 99, n. 4, p. 742-747, 2006.

GERN, R.M.M. Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. 2005. 156 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GONZÁLEZ, A.M. *et al.* Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. Revista Iberoamericana de Micología, v. 24, n.1, p. 59-61, 2007.

GREGORI, A. *et al.* Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. Food Technology and Biotechnology, v. 45, n. 3, p. 236-247, 2007.

GUSMÁN, G. Genus *Pleurotus* (Jacq.; Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 2, n. 2, p. 95-123, 2000.

GUTKOSKI, L.G. *et al.* Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 2, p. 355-363, 2007.

HADAR, W.; COHEN-ARAZI, E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. Applied Environment Microbiology, v. 51, n. 6, p. 1352-1354, 1986.

HARWIG, J.; SCOTT, P.M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. Applied Microbiology, v. 21, n. 6, p.1011-06, 1971.

JONATHAN, S.G.; FASIDI, I.O. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian mushroom. Food Chemistry, v. 72, n. 4, p. 479-483, 2001.

KIM, H.M. *et al.* Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 16, n. 8, p. 1240-1247, 2003.

KIRSCH, L.S. *et al.* The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535

(Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 13, n. 2, p. 185-192, 2011.

LE, J. *et al.* Optimization of submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharide by *Pleurotus nebrodensis*. *Annals of Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 389-393, 2007.

LECHNER, B. E. *et al.* The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, v. 96, n. 4, p. 845-858, 2004.

LECHNER, B. E.; ALBERTÓ, E. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *P. albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 28, n.4, 2011.

LEE, B.C. *et al.* Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 5, p. 369-376, 2004.

LIMA, J.C.R. *et al.* Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa e baru. *B. Ceppa*, v. 28, n. 2, p. 331-343, 2010.

MAESTRI, B. *et al.* Anteprojeto de industria de barras de cereais. Florianópolis, 2012.

MALAVOLTA, E *et al.* Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Editora Gráfica Nagy, 1989, 201 p.

MANJUNATHAN, J.; KAVIYARASAN, V. Nutrient composition in wild and cultivated edible mushroom, *Lentinus tuberregium* (Fr.) Tamil Nadu., India. *International Food Research Journal*, v. 18, p. 784-786, 2011.

MARINO, R.H.; ABREU, L.D. Cultivo do cogumelo Shiitake em residuo de coco suplementado com farelo de trigo e/ou arroz. *Revista Brasileira em Ciências Agrárias*, v. 4, n. 1, p. 11-16, 2009.

MEHTA, B.K. *et al.* Cultivation of button mushroom and its processing: a techno-economic feasibility. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, v. 2, n. 1, p. 201-207, 2011.

MOORE, D.; CHIU, S.W. Fungal products as food. In: Bio-exploitation of Filamentous Fungi. Hong Kong, 2001, p. 223-251.

NETO, B. B. *et al.* Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3 ed. Campinas: Unicamp, 2002, 280 p.

OMARINI, A. *et al.* Sensory analysis and fruiting bodies characterization of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. International Journal of Food Science and Technology, v. 45, n. 3, p. 466-474, 2010.

PAPASPYRIDIS, L.M. *et al.* Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibers content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. Biochemical Engineering Journal, v. 50, n. 3, p. 131-138, 2010.

PARK, J.P. *et al.* Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and micelial morphology in *Cordyceps militaris*. Letters in Applied Microbiology, v. 34, n. 6, p. 433-438, 2002.

PEUCKERT, Y.P. *et al.* Caracterização e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de proteína texturizada de soja e camu-camu (*Myrciaria dubia*). Alimentação e nutrição, v. 21, n. 1, p. 149-154, 2010.

PI, N. *et al.* The effect of media, oil type and rate on the mycelia wet and dry weights of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler in submerged liquid culture. African Journal of Biotechnology, v. 4, n. 3, p. 326-331, 2005.

PUTZKE, J. Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, Basidiomycota, Fungos) no Brasil – I: Lista de espécies e chaves de identificação. Caderno de Pesquisa Série Biologia, v. 14, n. 1, p. 67-75, 2002.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. 2 ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004. 605 p.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. Food Chemistry, v. 80, n. 3, p. 371-375, 2003.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

- SHIH, I.L. *et al.* Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 5, p. 1129-1135, 2006.
- SILVA, F.D *et al.* Elaboração de uma barra de cereal de quinoa e suas propriedades sensoriais e nutricionais. *Alimentos e nutrição*, v. 22, n. 1, p. 63-69, 2011.
- SILVA, I.Q *et al.* Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. *Alimentos e nutrição*, v.20, n. 2, p.321-329, 2009.
- SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.
- SIRÓ, I. *et al.* Functional foods. Product development, marketing and consumer acceptance – a review. *Appetite*, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.
- SÓTÃO, H.M.P. *et al.* Fungos macroscópicos e Uredinales da costa do Amapá e Região dos Lagos. Macapá: 2006. 218p. (Inventário Biológico das Áreas do Sucuriçu e Região dos Lagos: Relatório Final PROBIO).
- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 12, p.1412-1415, 1967.
- TANG, Y.L. *et al.* Submerged culture of mushrooms in bioreactors-challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, n. 3, p.221-229, 2007.
- TEIXEIRA, M.F.S. *et al.* Herbário micológico: patrimônio de cogumelos da Amazônia. In: 61ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2009, Manaus. Anais da 61ª Reunião anual da SBPC: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2009.
- TORRES, E.R. Desenvolvimento de barra de cereais formuladas com ingredientes regionais. 2009. 78 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes, Aracaju.
- UDDIN, M.S. *et al.* Production of oyster mushrooms in different seasonal conditions of Bangladesh. *Journal of Scientific Research*, v. 3, n. 1, p. 161-167, 2011.

VORARAT, S. *et al.* Examination of antioxidant activity and development of rice bran oil and gamma-oryzanol microemulsion. *Journal of Health Research*, v. 24, n. 2, p. 67-72, 2010.

WHITE, J.A. *et al.* An Evaluation of the Waters Pico-Tag System for the Amino-Acid-Analysis of Food Materials. *Journal of Automatic Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WU, C.Y. *et al.* Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 16, n. 2, p. 61-67, 2008.

WU, J.Z. *et al.* Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer-Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry*, v. 81, n. 3, p. 389-393, 2003.

XIAO, J.H. *et al.* Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 8, p. 1887-1893, 2005.

YANG, F.C. *et al.* Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n.3-5, p. 295-301, 2000.

ZANOTELLI, C.T. *et al.* Avaliação do modelo de Monod na produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 8, n. 2, p. 14-18, 2007.

# CAPÍTULO 1

**MYCELIAL BIOMASS PRODUCTION BY *Pleurotus albidus* DPUA 1692, AN  
EDIBLE MUSHROOM FROM AMAZON**

**TITLE PAGE****Mycelial biomass production by *Pleurotus albidus* DPUA 1692, an edible mushroom from Amazon**

Larissa de Souza Kirsch<sup>1</sup>, Ana Júlia de Porto Macedo<sup>1</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>1(\*)</sup>

<sup>1</sup> Culture Collection DPUA. Federal University of Amazonas.

Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus, Amazonas, Brazil.

(\*) Corresponding author: Culture Collection DPUA. Federal University of Amazonas

Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000. 69.077-000, Manaus, Amazonas, Brazil.

Phone/Fax: +55 92 3305-4284

E-mail address: mteixeira@ufam.edu.br

**Running title:** Mycelial biomass production by *Pleurotus albidus*

**Key-words:** *Pleurotus albidus*, mycelial biomass, factorial design, pellet morphology



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the radial mycelial growth in different solid media and the influence of physicochemical parameters on mycelial biomass production by *Pleurotus albidus* in submerged fermentation. The mycelial growth rate was similar in all media incubated in the absence of light, however, in malt extract agar and malt extract agar + yeast extract under light presence, maximum mycelial growth rate was observed. Among the five carbon sources tested in submerged fermentation, sucrose favored the higher mycelial biomass production ( $7.28 \text{ g.L}^{-1}$ ), followed by fructose ( $7.07 \text{ g.L}^{-1}$ ) and maltose ( $6.99 \text{ g.L}^{-1}$ ). Inorganic nitrogen sources did not promote the mycelial biomass production and the best result was significantly higher with yeast extract ( $7.98 \text{ g.L}^{-1}$ ). The factorial design used to evaluate the influence of different concentrations of sucrose and yeast extract, pH and agitation speed on the mycelial biomass production indicated that the sucrose concentration was more significant, suggesting that how higher the addition of this carbon source greater the mycelial biomass production. In this work, the highest mycelial biomass production ( $9.81 \text{ g.L}^{-1}$ ) was reached in the medium formulated with  $30.0 \text{ g.L}^{-1}$  sucrose,  $2.5 \text{ g.L}^{-1}$  yeast extract, pH 7.0 and speed agitation of 180 rpm. Furthermore, the mycelial biomass produced in different growing conditions of the factorial design presented differentiated morphology at the end of the fermentation process.

## INTRODUCTION

The genus *Pleurotus* is a cosmopolitan group of mushrooms, saprobic habit that grows naturally in decaying tree trunks. Member of this group, *Pleurotus albidus* (Berk.) has pileus circular, infundibuliform, glabrous, white to cream colored lamellae deeply decurrent. Stipe upward fluted through lamellar bases, tapering downward, usually curved-ascendant, dull white, occasionally with hairs at the base (1). This species has occurred in Mexico (2), Argentina (3) and Brazil (4).

Most *Pleurotus* is very versatile and can be easily cultivated on several substrates formulated with lignocellulosic residues. In this bioprocess, it develops fungal biomass as a result of nutrients degradation by the action of enzymes that consequently produce fruiting bodies, under optimal conditions for growth. However, it can usually takes several months to cultivate the fruiting bodies and it is difficult to control the quality of the final product, as it is subject to possible contaminants and pests (5).

In this way, the submerged fermentation has presented a promising alternative for efficient biomass production and synthesis of mushrooms metabolites. Among the advantages related to this bioprocess we mention: easier control of physicochemical parameters, ensuring less risk of contamination and the obtaining products of interest uniformly, besides the possibility of high biomass production in a compact space, shorter time and the production can be done all year around, regardless seasonality (6,7).

In mushroom cultivation by submerged fermentation there is no fruiting body production, but the mycelial biomass can express two distinct forms: the filamentous form and the pelleted form. Pellets are characterized by the mycelia developing into spherical aggregates consisting of a more or less dense, branched and partially intertwined network of hyphae (8). The biomass resulting from this bioprocess can be used as inoculum for mushroom production by semi-solid fermentation, as food additives and for extraction of

compounds with antimicrobial activity, flavorings, polysaccharides, antioxidants, among others (9).

The aim of this study was to evaluate the influence of synthetic media and physicochemical parameters on growth and mycelial biomass production by *Pleurotus albidus*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Organism**

The species used in this study was *Pleurotus albidus* DPUA 1692 obtained from the DPUA Culture Collection of Federal University of Amazonas, Brazil. The culture preserved in mineral oil was reactivated in potato dextrose agar (PDA) with yeast extract 0.5% (w/v) plates at 25 °C without light and subcultured every month (10).

### **Influence of different solid media on the mycelial growth rate**

The mycelial growth rate was evaluated under six different solid media, potato dextrose agar + yeast extract (PDA+YE), potato dextrose agar (PDA), malt extract agar + yeast extract (MEA+YE), malt extract agar (MEA), Sabouraud agar + yeast extract (SAB+YE) and Sabouraud agar (SAB). The media were sterilized at 121 °C for 15 min, and dispensed into Petri plates. *P. albidus* initially grown on PDA medium was transferred to the surface of each medium by punching out 8 mm of the mycelial agar culture with a sterilized self-designed cutter. The plates were incubated at 25 °C under absence and presence of continuous light. The mycelial growth rate was daily evaluated from the second day of cultivation to the complete mycelium propagation in the media. Mycelial growth rate was expressed by  $\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$ .

The mycelial density was evaluated according to the following subjective criteria: [1+] to weakly dense mycelium, [2+] to moderately dense mycelium and [3+] to strongly dense mycelium (11). All experiments were performed in triplicate.

### **Effect of inoculum volume on mycelial biomass production**

The basal media used to evaluate the effect of inoculum volume on the mycelial biomass production of *P. albidus* contained: (g.L<sup>-1</sup>, distilled water), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.0), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5), peptone (10.0) and glucose (20.0). The culture media were prepared and distributed (50 mL) in Erlenmeyer flasks (125 mL). The pH was adjusted to 6.0 and the media were sterilized at 121 °C for 15 min.

An aqueous homogenate of mycelium, previously subcultured on PDA with yeast extract (0.5 %, w/v), was prepared using 50 mL of sterilized distilled water (per plate) in a blender. Different volumes (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 mL) of the mycelial homogenate were added into the Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 50 mL of culture medium and the submerged fermentation was conducted for 5 days at 25 °C in orbital shaker (Certomat U) at 150 rpm (12). At the end of fermentation process, biomass was collected by vacuum filtration, washed three times with distilled water and dried at 70 °C for quantification.

### **Effect of carbon and nitrogen sources on mycelial biomass production**

Five different carbon sources (glucose, fructose, maltose, sucrose and lactose) and five nitrogen sources (peptone, yeast extract, tryptone, sodium nitrate and ammonium sulfate) were used to evaluate the mycelial biomass production of *P. albidus*. The glucose and peptone in the basal medium (cited at previous item) were replaced, separately, by the carbon and nitrogen sources mentioned. The pH was adjusted to 6.0 and the media were sterilized at 121 °C for 15 min. After cooling, 6.0 mL of the aqueous homogenate of mycelium was added to

the flasks and the submerged fermentation was performed under the same conditions of the previous item. At the end of fermentation, the biomass was collected, dried at 70 °C and quantified.

### **Determination of total carbohydrates**

The total carbohydrate concentration was determined by the phenol-sulfuric acid method by Dubois (13).

### **Conversion factor of substrate to biomass, yield and productivity**

The conversion factor of substrate to biomass was expressed in grams of mycelial biomass produced per gram of substrate consumed ( $\text{g.g}^{-1}$ ),

$$Y_{(X/S)} = (X_f - X_i) / (S_i - S_f)$$

Where  $X_f$  and  $X_i$  are final and initial biomass concentration, respectively, and  $S_i$  and  $S_f$  are initial and final sugar concentration, respectively.

The yield was expressed in grams of mycelial biomass produced per gram of substrate initially present in the culture medium ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

$$Y_{(f/S)} = (X_f - X_i) / (S_i)$$

Where  $X_f$  and  $X_i$  are final and initial biomass concentration, respectively, and  $S_i$  and  $S_f$  are initial and final sugar concentration.

The productivity in biomass was expressed in grams of mycelial biomass produced per liter of culture media, per hour ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) (14).

$$P_X = (X_f - X_i) / t$$

Where  $X_f$  and  $X_i$  are final and initial biomass concentration, respectively, and  $t$  is incubation period.

### **Factorial design**

A 2<sup>4</sup> factorial design (15) was used to evaluate the influence of pH, agitation speed and sucrose and yeast extract concentration which were selected as the carbon and nitrogen sources, successively, after the test by the one-factor-at-a-time method. The levels used in the factorial design are presented at Table 1.

The media composition was as follows: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g.L<sup>-1</sup>) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.0 g.L<sup>-1</sup>) with sucrose and yeast extract in different concentrations (Table 1). The submerged fermentation was conducted as described previously and the biomass was collected, dried at 70 °C and quantified.

### **Photography**

The morphological details of the mycelial biomass produced in the experimental design were evaluated using software Analysis FIVE Olympus coupled to a stereomicroscope (Olympus SZ61, Ltd, Tokyo, Japan). The samples were fixed with a fixative [13 mL of 40% (v/v) formaldehyde, 5mL of acetic acid and 200 mL of 50%, (v/v) ethanol] (16).

### **Statistical Analysis**

The results were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA) and the average compared by the Tukey test at  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Mycelial growth rate of *P. albidus***

The data in Table 2 presents that all culture media promoted growth of *P. albidus* in both incubation conditions. In the absence of light the mycelial growth rate was higher when

compared to continuous light condition, however no significant different in PDA + YE and SAB. In the absence of light, the mycelial growth rate was similar in all culture media.

Literature data presented that MEA and PDA were the best media for the growth of *Morchella* species with mycelial growth rate ranging from 1.0 to 1.8 cm per day (17). When *Pleurotus ostreatus* var *sajor caju*, *Pleurotus ostreatus* var *cystidiosus* and *Volvariella volvaceae* were cultured on MEA and PDA, presented variations in mycelial growth with significant growth in MEA for the three mushrooms (18). The stimulatory effect on mycelial growth of other mushrooms species in PDA and MEA has been also reported for *Volvariella speciosa* (19) and *Lentinus subnudus* (20).

Under in vitro cultivation conditions, growth of *P. albidus* was observed in all culture media studied; however, the mycelium density had a peculiar aspect in each of them. In the absence of light, the mycelium was strongly dense in PDA and MEA, with or without yeast extract, although under presence of continuous light only MEA and MEA + YE presented the highest mycelium density (Table 2). SAB and SAB + YE in both culture conditions were not efficient for the dense mycelial, as well as PDA and PDA + YE in the presence of light. Among other factors, the nutrients of the culture medium are also important to the mycelial growth which may vary with the species of mushrooms (21).

### **Effect of inoculum volume**

Among several physiological properties of fungi, age and volume of inoculum plays an important role in mycelial biomass, as well as the formation of fruiting body (22).

In this research, mycelial biomass varied significantly with the increasing of inoculum volume in culture media (**Fig. 1**), indicating that is an important variable in the production of mushroom mycelial biomass in submerged fermentation. Among the volumes of inoculum

evaluated, 6.0 mL allowed the higher biomass production ( $5.00 \text{ g.L}^{-1}$ ), therefore, this volume was used for further experiments.

In research with *P. tuber-regium* (12) and *Grifola frondosa* (23) the authors found that the inoculum size influenced on the mycelial growth of the mushrooms, when they used, respectively, volume of cell suspension ranging of 0.5 to 12.0 mL or 2 to 6% in relation to the medium volume in submerged fermentation.

### **Effect of carbon and nitrogen sources**

In order to investigate an appropriate carbon source for growth, *P. albidus* grown in media containing different carbon sources, separately, at  $20 \text{ g.L}^{-1}$  for 5 days. Data in Table 3 presents that all carbon sources tested promoted growth of *P. albidus*; however, those that have stimulated it significantly ( $p \leq 0.05$ ) were sucrose ( $7.28 \text{ g.L}^{-1}$ ), fructose ( $7.07 \text{ g.L}^{-1}$ ) and maltose ( $6.99 \text{ g.L}^{-1}$ ). It is noteworthy that, even the mushroom having the highest mycelial biomass production with sucrose, this sugar consumption during the fermentation process was twice lower than fructose ( $6.41 \text{ g.L}^{-1}$ ) (data not presented). This fact may be related with the nature of the carbon source, whereas sucrose is a disaccharide the organism needs to excrete invertase for degrade into glucose and fructose and then be absorbed by it (24).

The use of monosaccharides such as fructose and glucose have been reported as one of the carbon sources which more stimulate the growth of *Pleurotus* species in submerged fermentation (25, 26) and this fact is due to the presence of specific enzymes that often are constitutive for the degradation of these molecules. However, the preference for sucrose as carbon source has also been reported for other edible mushroom species, such as *Antrodia cinnamomea* (27), *Cordyceps militaris* (28), *C. sinensis* (29) and *C. jiangxiensis* (30). Considering costs and easiness of production, sucrose can be considered a suitable substrate compared to other synthetic sources obtained on the market.



On analyzing the data related to mycelial biomass production by *P. albidus* it was observed that the culture medium containing sucrose as carbon source was more efficient in conversion of substrate into biomass ( $1.15 \text{ g.g}^{-1}$ ) and productivity ( $0.061 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) when compared to the data obtained with fructose,  $0.86 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0.059 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectively. These results are highest when compared with *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 (14),  $0.82 \text{ g.g}^{-1}$  and  $0.085 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  in liquid medium containing initial concentration of  $10 \text{ g.L}^{-1}$  for glucose and  $0.59 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0.041 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  for sucrose ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ).

As presented at Table 3, the addition of sodium nitrate and ammonium sulfate in the culture media did not favor the mycelial biomass production and the maximum values of biomass were  $0.79 \text{ g.L}^{-1}$  and  $1.39 \text{ g.L}^{-1}$ , respectively. These data are in accordance with obtained for *C. militaris* (28) and *Grifola frondosa* (23). Overall, it has been observed that sources of inorganic nitrogen do not promote growth of several fungi species, as opposed to the organic sources (28, 31).

Deacon (24) describes that some mushroom species may not metabolize ammonia as nutritional source. As this nutrient is degraded, ions  $\text{H}^+$  are released and the pH of the medium is reduced, inhibiting the growth. This fact was verified when, at the end of fermentation process, pH of culture media (ammonium sulfate and sodium nitrate) was below 4.5 (Table 3).

Results also showed that yeast extract ( $7.98 \text{ g.L}^{-1}$ ) was the one that most stimulated mycelial biomass production. The presence of tryptone ( $7.19 \text{ g.L}^{-1}$ ) and peptone ( $6.56 \text{ g.L}^{-1}$ ) in culture media also favored biomass production, being statistically different ( $p \leq 0.05$ ) from values found for inorganic sources of nitrogen. In submerged fermentation different organic sources of nitrogen have been reported as suitable for mushrooms growth (23, 27, 32). In the case of yeast extract was observed that this nutrient has positive effect on the mushrooms growth due to protein, amino acids and vitamin contents (32).

Considering the fact that mycelial biomass of *P. albidus* was higher in culture medium containing yeast extract as nitrogen source, the values obtained for the yield ( $0.40 \text{ g.g}^{-1}$ ) and productivity ( $0.066 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) were significantly higher when compared with others nitrogen sources evaluated, however in relation to conversion factor of substrate to biomass no statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) was observed between the values for yeast extract ( $0.42 \text{ g.g}^{-1}$ ) and control ( $0.43 \text{ g.g}^{-1}$ ).

### **Factorial design**

The variables as well as the results obtained from the runs of  $2^4$  full factorial design for evaluate the influence of sucrose and yeast extract concentration, initial pH of the culture media and the agitation speed in mycelial biomass production of *P. albidus* are presented at Table 4. The mycelial biomass production ranged from  $3.92 \text{ g.L}^{-1}$  to  $9.81 \text{ g.L}^{-1}$ , represented by runs 3 and 12, respectively.

The Table 5 presents the values of the contrasts calculated for each of the variables and their interactions from the experiments of factorial design. All variables had significant influence on mycelial biomass production and in decreasing order of significance were sucrose concentration, agitation speed, yeast extract concentration and pH. For the first three variables the effect was positive indicating that the increase of these lower level to the high level favored biomass production of *P. albidus* in the fermentation process. The pH was also significant for this response, however the negative effect showed that the reduction of initial pH promoted the more favorable production of mycelial biomass. The interactions of pH and agitation speed and sucrose concentration and agitation speed on the high level also favored the growth of *P. albidus* and were the most significant.

Under the conditions evaluated at higher biomass production was  $9.81 \text{ g.L}^{-1}$ , value determined in run n. 12 with the culture medium formulated with sucrose ( $30.0 \text{ g.L}^{-1}$ ), yeast

extract ( $2.5 \text{ g.L}^{-1}$ ), pH 7.0 and agitation speed of 180 rpm. With the data of biomass production was obtained a R-square = 0.9341, indicating that the model explained about 93% of the variability data.

In the study by Park (33) for evaluate the influence of different physicochemical parameters on growth and production of polysaccharides in *Cordyceps militaris* by submerged fermentation, the authors verified that the among carbon sources tested sucrose favored both the mycelial growth and the polysaccharides production. Furthermore, the concentration of sucrose had a positive influence on the cultivation of mushroom, in other words, the growth was proportional to the increase of initial concentration of this carbon source, which ranged from  $10 \text{ g.L}^{-1}$  to  $60 \text{ g.L}^{-1}$ , expressing maximum growth in medium containing  $60 \text{ g.L}^{-1}$  of sucrose.

The pH of the fermentation medium is an extremely important variable in growth of filamentous fungi, as this may affect the function of the cell membrane, structure and cellular morphology, as well as various nutrient uptake and biosynthesis of products (24, 34). In this research, the results indicated that, in general, the use of initial pH more acid in culture medium favored growth of *P. albidus*, although maximum biomass production was found at pH 7.0 ( $9.81 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Moreover, it was observed that at the end of the fermentation process the pH remained constant in culture media whose initial pH was 5.0, however, when the fungus grew at initial pH 7.0 there was reduction in pH to 5.0 (data not presented). According Papagianni (34), the composition of the culture medium may affect the initial pH of the culture medium causing the pH range during fungus growth.

The use of yeast extract as a nitrogen source in the culture medium to evaluate biomass production by *Grifola frondosa* was reported (23). The authors found that there was a proportional biomass increase in relation to the concentration of this organic source of

nitrogen and  $6 \text{ g.L}^{-1}$  was the concentration that most favored biomass production. Research has presented that species of mushrooms in submerged fermentation has a preference for organic nitrogen sources such as yeast extract and peptone, instead of inorganic sources (20, 35). Gbolagade (26) reports that this preference may be explained by the complex combination of amino acids and carbohydrates present in these organic compounds, nutrients which promote fungal growth.

According to Tang (5) in most bioprocesses, the culture medium kept under vigorous agitation promotes proper homogenization of the medium components and the mass and heat transfer, conditions which favor the mycelial growth of mushroom by submerged fermentation. However, very high agitation speeds may also create shear forces that may be damaging to hyphae and cause changes in the mycelium, variations in growth rate and formation product of interest. In this study with *P. albidus*, agitation speed of 180 rpm was that the most favored mycelial growth than the others tested. These results differ from those found by Kim (36) that evaluated the effect of agitation speed and aeration rate on the mycelial growth of *Ganoderma resinarum*. The authors found that when agitation speed increased from 50 to 250 rpm, biomass production was reduced by around 30% ( $12.7 \text{ g.L}^{-1}$  to  $8.9 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### **Mycelium morphological observations in submerged fermentation**

In citations from Znidarsik and Pavko (37) and Kim (36) report that the characteristics of mycelium produced by submerged fermentation are influenced by culture conditions such as the composition and initial pH of the fermentation medium, size and inoculum age, aeration rate and agitation speed.

In all fermentation conditions was observed the formation of pellets, having size and morphology differential. These characteristics of the pellets were more evident in relation to

the variation of the agitation speed and the initial pH of the culture medium. When the bioprocess was performed at 120 rpm, pellets were large and few in number, whereas at 180 rpm those structures formed acquired smaller size and larger quantity. The variation in the pellets size under different agitation conditions was also reported (36). The authors observed the presence of large pellets when *Ganoderma resinaceum* was subject to agitation speed of 50 rpm, whereas under more vigorous agitation (300 rpm) pellets became small at the end of the fermentation process.

In cultivation at 120 rpm and pH 7.0 was observed growth of elongated and protruding hyphae on the surface of the pellets (**Fig. 2a**). Under conditions of fermentation with pH 5.0, the extensions of these hyphae exhibited length much reduced or absent (**Fig. 2b, Fig. 2d**). In a study by Hwang (38) the authors verified that *Phellinus baumii* grown in liquid medium producing pellets with starfish-like appearance in more acidic pH, however when the pH of the culture medium ranged from neutral to alkaline, pellets became more compact and there was lots of free mycelium.

In cultures performed at higher agitation speed (180 rpm), except for run n.6, pellets presented, in general, elongated hyphae on its surface. At pH 7.0 (**Fig. 2c, Fig. 2e**) hyphae around the pellets were more numerous than at pH 5.0 (**Fig. 2f**).

Similar results were also obtained by Park (8). The authors found that the pellets of *Cordyceps militaris* formed during the fermentation period increased in size independently of the agitation speed, however, when the fermentation was conducted under low agitation (50 rpm) the pellets became large and fluffy, while that high agitation (300 rpm) the outer hairy region of the pellets were shaved off, and consequently became them smaller and changing its circular morphology.

During the fermentation process was observed that *P. albidus* biomass was strongly adhered on the inside walls of the bottles in all growth conditions evaluated. This

phenomenon was also observed (39) in submerged fermentation of *G. lucidum* and the authors reported that biomass adherence of with the polysaccharides production.

Establishing a relationship between production and biomass morphology of *P. albidus* was observed that the higher mycelial biomass production was found when the pellets presented low size and short hyphae.

In conclusion, from the results obtained in this study it was possible to know some aspects of the morphology and physiology of *P. albidus*, data considered pioneering for mycelial biomass production of this mushroom by submerged fermentation. The components of the culture media, as the concentration and type of carbon and nitrogen source, initial pH, inoculum volume and agitation speed are factors that affect significantly the mycelial biomass production of *P. albidus*. The experimental design was an effective tool for evaluating the culture factors that most influenced in growth and morphology of the mushroom biomass.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the technical and financial support granted by the Culture Collection DPUA and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)/Brazil.

## **REFERENCES**

- 1. Lechner, B.E., Wright, J.E., and Albertó, E.:** The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, **96**, 845-858 (2004).
- 2. Moreno-Fuentes, A., and Bautista-Nava, E.:** El “hongo blanco patón” *Pleurotus albidus*, en Hidalgo. Su primer registro em México. *Rev. Mex. Micol.*, **22**, 41-47 (2006).

- 3. Lechner, B.E., and Albertó, E.:** Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Rev. Iberoam. Mycol.*, **28**, 148-154 (2011).
- 4. Putzke, J.:** Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, Basidiomycota, Fungos) no Brasil – I: Lista de espécies e chaves de identificação. *Cad. Pesqui. Sér. Biol.*, **14**, 67-75 (2002).
- 5. Tang, Y.J., Zhu, L.W., Li, H.M., and Li, D.S.:** Submerged culture of mushrooms in bioreactors-challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol. Biotech.*, **45**, 221-229 (2007).
- 6. Gregori, A., Svagelj, M., and Pohleven, J.:** Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol. Biotech.*, **45**, 236-247 (2007).
- 7. Papaspyridi, L.M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., and Christakopoulos, P.:** Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibers content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochem. Eng. J.*, **50**, 131-138 (2010).
- 8. Park, J.P., Kim, Y.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Cho, Y.J., Lee, Y.S., Song, C.H., and Yun, J.W.:** Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and micelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 433-438 (2002).
- 9. Gern, R.M.M., Wisbeck, E., and Rampinelli, J.R.:** Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Biores. Technol.*, **99**, 76-82 (2008).
- 10. Kirsch, L.S., Pinto, A.C.S., Porto, T.S., Porto, A.L.F., and Teixeira, M.F.S.:** The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *Int. J. Med. Mushroom.*, **13**, 185-192 (2011).

11. **Marino, R.H., Abreu, L.D., Mesquita, J.B., and Ribeiro, G.T.:** Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. Arq. Inst. Biol., **75**, 29-36 (2008).
12. **Wu, J.Z., Cheung, P.C.K., Wong, K.H., and Huang, N.L.:** Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer-Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. Food Chem., **81**, 389-393 (2003).
13. **Dubois, M., Gilles, K.A.L., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F.:** Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. **28**, 380-356 (1956).
14. **Confortin, F.G., Marchetto, R., Bettin, F., Camassola, M., Salvador, M., and Dillon, A.J.P.:** Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. J. Ind. Microbiol., **35**, 1149-1155 (2008).
15. **Neto, B.B., Scarminio, I.S., and Bruns, R.E.:** Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 3 ed. Unicamp, 2007, 280 p.
16. **Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Sung, J.M., Choi, J.W., and Yun, J.W.:** Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. J. Appl. Microbiol., **94**, 120-126 (2003).
17. **Kalm, E., and Kalyoncu, F.:** Mycelial growth rate of some morels (*Morchella* spp.) in four different microbiological media. J. Agr. Env. Sci., **3**, 861-864 (2008).
18. **Nasim, G., Malik, S.H., Bajwa, R., Afzal, M., and Miam, S.W.:** Effect of three different media on mycelial growth of oyster and Chinese mushrooms. J. Biol. Sci., **1**, 1130-1133 (2001).
19. **Fasola, T.R., Gbolagade, J.S., and Fasidi, I.O.:** Nutritional requirements of *Volvariella speciosa* (Fr. Ex. Fr.) Singer, a Nigerian edible mushroom. Food Chem. **100**, 904-908 (2007).



- 20. Gbolagade, J.S., Fasidi, I.O., Ajayi, E.J., and Sobowale, A.A.:** Effect of physico-chemical factors and semi-synthetic media on vegetative growth of *Lentinus subnudus* (Berk), an edible mushroom from Nigeria. *Food Chem.* **99**, 752-747 (2006).
- 21. Kibar, B., and Peksen, A.:** Mycelial growth requirements of *Lactarius pyrogalus* and *Lactarius controversus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **5**, 5107-5114 (2011).
- 22. Petre, M., Teodorescu, A., Tuluca, E., Bejan, C., and Andronescu, A.:** Biotechnology of mushrooms pellets producing by controlled submerged fermentation. *Roman. Biotechnol. Lett.*, **15**, 50-55 (2010).
- 23. Lee, B.C., Bae, J.R., Pyo, H.B., Choe, T.B., Kim, S.W., Hwang, H.J., and Yun, J.W.:** Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Tech.*, **35**, 369-376 (2004).
- 24. Deacon, J.W.:** Fungal nutrition, p. 110-121. In: Deacon, J.W. (ed.), *Fungal Biology*, 4th ed. Blackwell Publishing Ltd, New York, (2006).
- 25. Fasidi, I.O., and Olorunmaiye, K.S.:** Studies on requirements for growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian edible mushroom. *Food Chem.*, **50**, 397-401 (1994).
- 26. Gbolagade, J., Sobowale, A., and Adejaye, D.:** Optimization of submerged culture conditions for biomass production in *Pleurotus florida* (mont.) Singer, a Nigerian edible fungus. *Afr. J. Biotechnol.*, **5**, 1464-1469 (2006).
- 27. Yang, F.C., Huang, H.C., and Yang, M.J.:** The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme Microb. Tech.* **33**, 395-402 (2003).
- 28. Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., and Yun, J.W.:** Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microb.* **33**, 76-81 (2001).

- 29. Dong, C.H., and Yao, Y.J.** Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 483-492 (2005).
- 30. Xiao, J.H., Chen, D.X., Wan, W.H., Hu, X.J., Qi, Y., and Liang, Z.Q.:** Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. *Process Biochem.*, **41**, 1887–1893 (2005).
- 31. Kim, H.O., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W., and Yun, J.W.:** Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technol.*, **96**, 1175-1182 (2005).
- 32. Pokhrel, C.P., and Ohga. S.:** Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chem.*, **105**, 641-646 (2007).
- 33. Park, J.P., Kim, Y.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., and Cho, Y.S.:** Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 433-438, (2002).
- 34. Papagianni, M.:** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. *Biotechnol. Adv.* **22**, 189-259 (2004).
- 35. Cho, E.J., Oh, J.Y., Chang, H.Y., and Yun, J.W.:** Production of exopolysaccharides by submerge mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *J. Biotechnol.*, **127**, 129-140 (2006).
- 36. Kim, H.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, M.K., Mahmoud, Y.A.G., Choi, J.W.J., and Yun, J.W.:** Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1240-1247 (2006).

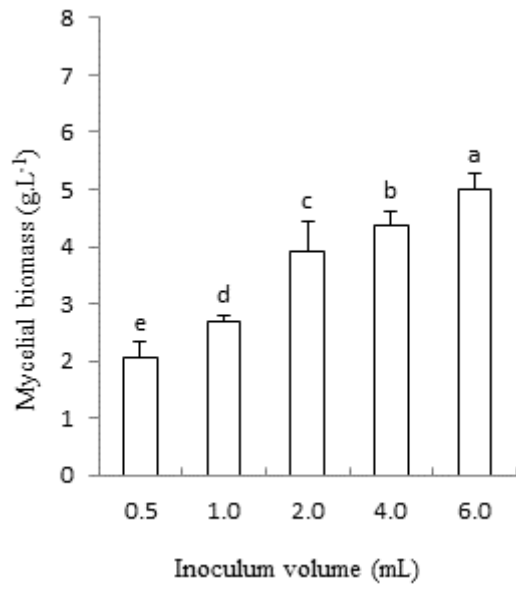
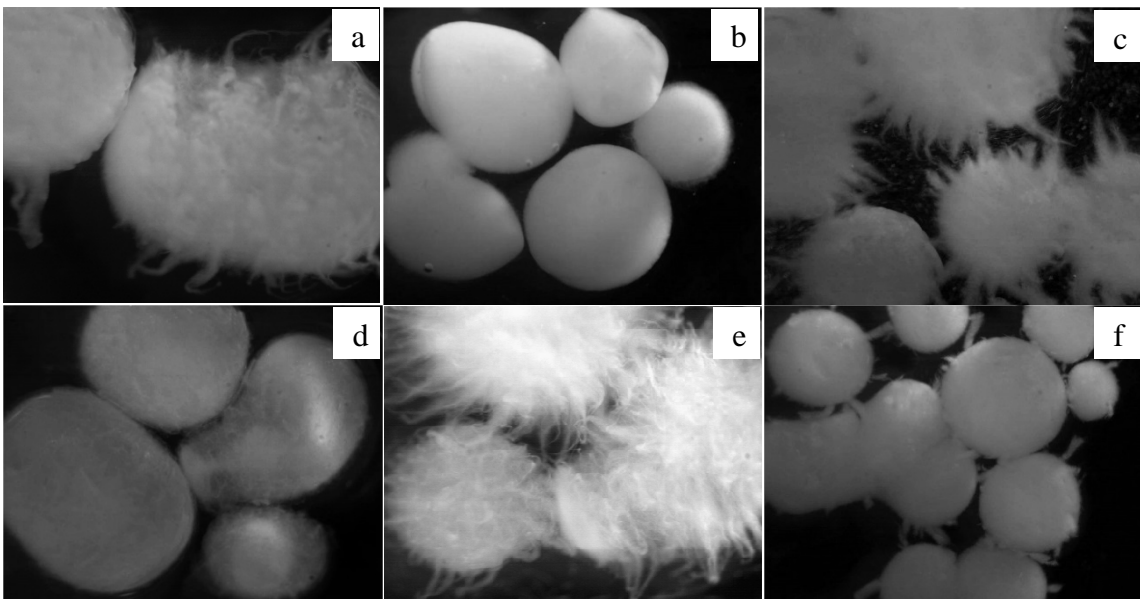
- 37. Znidarsic, P., and Pavko, A.:** Morphology of filamentous fungi. *Food Technol. Biotech.*, **39**, 237-252 (2001).
- 38. Hwang, H.J., Kim, S.W., Xu, C.P., Choi, J.W., and Yun, J.W.:** Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 1296-1305 (2004).
- 39. Wagner, R., Mitchell, D.A., Sasaki, G.L., and Amazonas. M.A.L.A.:** Link between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *J. Biotechnol.* **114**, 153-164 (2004).

## Figures legends

**Fig 1-** Inoculum volume on mycelial biomass production of *P. albidus*

Average followed by the same letter(s) are not significantly different by Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 2** – Pellets morphology under different culture conditions: (a) Run 11- 30.0g/L sucrose, 2.5g/L yeast extract, pH 7.0, 120 rpm, (b) Run 5- 10.0g/L sucrose, 10.0g/L yeast extract, pH 5.0, 120 rpm, (c) Run 8-10.0g/L sucrose, 10.0g/L yeast extract, pH 7.0, 180 rpm, (d) Run 9- 30.0g/L sucrose, 2.5g/L yeast extract, pH 5.0, 120 rpm, (e) Run 12- 30.0g/L sucrose, 2.5g/L yeast extract, pH 7.0, 180 rpm, (f) Run 14- 30.0g/L sucrose, 10.0g/L yeast extract, pH 5.0, 180 rpm.

**Fig 1-****Fig 2-**

## Tables

Table 1- Factor levels used in the full factorial design  $2^4$  for study mycelial biomass production by *P. albidus*

Variables	Levels		
	Lower (-1)	Center (0)	Higher (+1)
Sucrose concentration (g.L <sup>-1</sup> )	10.0	20.0	30.0
Yeast extract concentration (g.L <sup>-1</sup> )	2.5	5.0	10.0
pH	5.0	6.0	7.0
Agitation speed (rpm)	120	150	180

Table 2. Growth of *P. albidus* on different culture media and conditions of incubation

Culture media	Conditions of incubation			
	Light		Dark	
	Mycelial growth rate (cm.day <sup>-1</sup> )	Mycelial colony density	Mycelial growth rate (cm.day <sup>-1</sup> )	Mycelial colony density
PDA+YE	1.37 <sup>bcA</sup>	2+	1.50 <sup>abA</sup>	3+
PDA	1.35 <sup>cbB</sup>	1+	1.60 <sup>aA</sup>	3+
MEA+YE	1.51 <sup>abB</sup>	3+	1.60 <sup>aA</sup>	3+
MEA	1.48 <sup>abB</sup>	3+	1.57 <sup>abA</sup>	3+
SAB+YE	1.19 <sup>dB</sup>	2+	1.45 <sup>bA</sup>	2+
SAB	1.45 <sup>abcA</sup>	1+	1.53 <sup>abA</sup>	1+

The yeast extract was added at 0,5% (w/v). Means followed by the different letter(s), lowercase at column and uppercase at row, are significantly different by Tukey test ( $p \leq 0.05$ )

Table 3. Mycelial biomass, conversion factor of substrate to biomass ( $Y_{x/s}$ ), yield ( $Y_{r/s}$ ) and productivity ( $P_x$ ) by *P. albidus* under different carbon and nitrogen sources

Carbon and nitrogen sources	Mycelial biomass (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{r/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	final pH
Carbon sources					
Sucrose	7.28 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.061 <sup>a</sup>	5.19 <sup>a</sup>
Fructose	7.07 <sup>a</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.059 <sup>a</sup>	5.05 <sup>b</sup>
Lactose	6.23 <sup>c</sup>	0.65 <sup>d</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.052 <sup>c</sup>	5.21 <sup>a</sup>
Maltose	6.99 <sup>a</sup>	0.79 <sup>c</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.058 <sup>a</sup>	5.00 <sup>b</sup>
Glucose (basal)	6.56 <sup>b</sup>	0.43 <sup>e</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.055 <sup>b</sup>	5.06 <sup>b</sup>
Nitrogen sources					
Yeast extract	7.98 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.066 <sup>a</sup>	5.45 <sup>a</sup>
Tryptone	7.19 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.060 <sup>b</sup>	4.70 <sup>c</sup>
Ammonium sulphate	1.39 <sup>d</sup>	0.24 <sup>c</sup>	0.07 <sup>d</sup>	0.012 <sup>d</sup>	3.33 <sup>d</sup>
Sodium nitrate	0.79 <sup>e</sup>	0.11 <sup>d</sup>	0.04 <sup>e</sup>	0.007 <sup>e</sup>	4.62 <sup>c</sup>
Peptone (basal)	6.56 <sup>c</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.33 <sup>c</sup>	0.055 <sup>c</sup>	5.06 <sup>b</sup>

Each value represents an average of three replicates. Averages followed by the same letter(s) are not significantly different by Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

Table 4- Results of the full factorial design  $2^4$  for mycelial biomass production by *P. albidus*

Runs	Sucrose concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Yeast extract concentration (g.L <sup>-1</sup> )	pH	Agitation speed (rpm)	Mycelial biomass (g.L <sup>-1</sup> )
1	10.0	2.5	5.0	120	4.52
2	10.0	2.5	5.0	180	5.47
3	10.0	2.5	7.0	120	3.92
4	10.0	2.5	7.0	180	5.37
5	10.0	10.0	5.0	120	6.7
6	10.0	10.0	5.0	180	5.72
7	10.0	10.0	7.0	120	5.21
8	10.0	10.0	7.0	180	5.11
9	30.0	2.5	5.0	120	6.87
10	30.0	2.5	5.0	180	6.49
11	30.0	2.5	7.0	120	5.24
12	30.0	2.5	7.0	180	9.81
13	30.0	10.0	5.0	120	7.53
14	30.0	10.0	5.0	180	9.26
15	30.0	10.0	7.0	120	6.59
16	30.0	10.0	7.0	180	9.56
17	20	5.0	6.0	150	7.47
18	20	5.0	6.0	150	7.34
19	20	5.0	6.0	150	7.41



Table 5- Contrast values calculated according to the factorial design for mycelial biomass production by *P. albidus*

Variables	Contrasts
(1) Sucrose concentration	$120.75 \pm 1.06^+$
(2) Yeast extract concentration	$49.90 \pm 1.06^+$
(3) pH	$-11.00 \pm 1.06^+$
(4) Agitation speed	$63.75 \pm 1.06^+$
Interaction 1-2	$6.64 \pm 1.06$
Interaction 1-3	$24.03 \pm 1.06^+$
Interaction 1-4	$47.25 \pm 1.06^+$
Interaction 2-3	$-23.34 \pm 1.06^+$
Interaction 2-4	$-18.50 \pm 1.06^+$
Interaction 3-4	$47.26 \pm 1.06^+$
Interaction 1-2-3	$-5.90 \pm 1.06^+$
Interaction 1-2-4	$24.93 \pm 1.06^+$
Interaction 1-3-4	$30.14 \pm 1.06^+$
Interaction 2-3-4	$-20.93 \pm 1.06^+$

<sup>+</sup> Statistically significant values at the 95% confidence level.

The standard errors are estimated from the replicate runs at the central point. The error is descriptive around of the contrast estimate, after symbol  $\pm$

## **CAPÍTULO 2**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL E MICROBIOLÓGICA DA  
BIOMASSA DE *Pleurotus albidus* PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

**Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica da biomassa de *Pleurotus albidus* produzida por fermentação submersa**

Larissa de Souza Kirsch<sup>1</sup>, Raimundo Felipe Cruz<sup>1</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>1(\*)</sup>

<sup>1</sup> Micoteca DPUA/UFAM. Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus, AM, Brazil.

(\*) Autor para correspondência: Micoteca DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000. Cep: 69.077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

Tel/Fax: +55 92 3305 4284

E-mail: [mteixeira@ufam.edu.br](mailto:mteixeira@ufam.edu.br)

## Resumo

Nesta pesquisa foi avaliada a qualidade nutricional e microbiológica da biomassa de *Pleurotus albidus* produzida por fermentação submersa em meio sintético sob agitação durante 5 dias. O rendimento da biomassa foi de 9,04 g.L<sup>-1</sup> e esta não apresentou contaminação microbiana nem toxicidade frente a *Artemia salina*, garantindo a qualidade do produto para consumo humano. Em relação à qualidade nutricional, o produto apresentou elevado teor de proteínas (20,41%), fibras (18,55%) e carboidratos (68,75%) e reduzido conteúdo de lipídios (2,66%). O potássio foi o macromineral mais abundante encontrado na biomassa, seguida de fósforo, sódio e magnésio. Todos os aminoácidos essenciais foram detectados, sendo dentre eles a leucina, lisina e valina observados em maior quantidade, enquanto que ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina e arginina destacaram-se entre os aminoácidos não essenciais.

**Palavra-chave:** *Pleurotus albidus*, biomassa, composição nutricional, fermentação submersa.

## Introdução

Os cogumelos comestíveis são apreciados e consumidos desde a antiguidade pelos povos orientais. Dentre os cogumelos mais comercializados incluem as espécies dos gêneros *Pleurotus*, *Agaricus* e *Lentinus*, e em escala mais reduzida *Auricularia*, *Volvariella*, *Flammulina*, *Tremella* (OMARINI *et al*, 2010).

Em geral, cogumelos são alimentos de alto valor nutricional pelo teor significativo de proteínas (tipicamente 20-30% bs) e vitaminas B, C e D, além disso, são praticamente livres de colesterol e têm reduzida quantidade de lipídios (FORTES; NOVAES, 2006; MOORE; CHIU, 2001). A parede celular composta por quitina, hemicelulose, manana,  $\beta$ -glucana serve de fonte de fibras alimentares, auxilia a motilidade intestinal e o aumento do volume das fezes, proporcionando ação desintoxicante e fator protetor contra o câncer colorretal (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000).

O cultivo de cogumelos comestíveis constitui um sistema de produção-consumo que tem adquirido no mundo relevância social, econômica e ecológica. Esse processo biotecnológico pode ser desenvolvido via fermentação submersa em pequena e grande escala, sendo uma alternativa promissora na produção eficiente de biomassa e metabólitos (MORA; CARRERA, 2007; TANG *et al*, 2007). Diversas pesquisas têm mostrado que a biomassa produzida por esse bioprocessos apresenta composição nutricional de boa qualidade e similar aos basidiomas produzidos em cultivo semi-sólido. Além disso, outros benefícios da fermentação submersa podem ser citados, tais como: elevada produção de biomassa em larga escala e com custos reduzidos, menor tempo de produção, possibilidade de cultivo independente das variações sazonais e controle dos parâmetros físico-químicos (GREGORI *et al* 2007; ZANOTELLI *et al*, 2007).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características nutricionais, físico-químicas e microbiológicas da biomassa de *Pleurotus albidus* produzida por fermentação submersa.

## **Metodologia**

### Organismo e manutenção da cultura

A espécie avaliada neste estudo foi *Pleurotus albidus* sob o registro DPUA 1692 do acervo da Micoteca DPUA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Após reativação do cogumelo preservado em óleo mineral, culturas puras foram mantidas em BDA- ágar Batata Dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v) (KIRSCH *et al*, 2011).

### Fermentação submersa

O meio de cultivo utilizado para produção da biomassa de *P. albidus* foi formulado em g.L<sup>-1</sup> de água destilada: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5), extrato de levedura (2,5) e sacarose (30,0). O pH foi ajustado para 7,0 e o meio esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. Após resfriamento foi adicionada uma suspensão de massa micelial cujo volume foi correspondente a 12% do meio de cultivo (WU *et al*, 2003). A fermentação submersa foi conduzida durante 5 dias, a 25 °C, em agitador orbital de bancada (Certomat U), a 180 rpm. Em seguida, a biomassa foi filtrada a vácuo em tecido de algodão, lavada com água destilada esterilizada, desidratada a 40 °C em estufa de circulação de ar forçada e triturada.

### Preparo do extrato orgânico e teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

A biomassa foi transferida para um frasco Erlenmeyer, seguindo-se a adição de clorofórmio na proporção de 1:25. Após 24 horas sob agitação constante (150 rpm) o extrato foi separado da amostra residual em papel de filtro e concentrado sob vácuo. Nos testes de

toxicidade foram utilizadas diferentes concentrações do extrato (15 a 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em DMSO (10%, v/v).

O teste de toxicidade foi avaliado segundo metodologia de Harwig; Scott (1971), González *et al* (2007) e Atayde *et al* (2008). Os cistos de *A. salina* (0,1% p/v) foram incubados em solução de sal marinho não-iodado (3%, p/v) durante 30 horas sob luminosidade constante em agitador orbital a 30 °C/140 rpm. Em uma microplaca de 24 poços foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do extrato orgânico, 1700  $\mu\text{L}$  de solução de sal marinho e 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de larvas de *A. salina*. A microplaca foi mantida nas mesmas condições de cultivo das larvas. A mortalidade de *A. salina* foi determinada pela ausência da mobilidade interna e externa sob estereomicroscópio.

A porcentagem de toxicidade foi calculada (Equação 1) e classificada da seguinte forma: não tóxico (NT, 0-9%), ligeiramente tóxico (LT, 10-49%), tóxico (T, 50-89%) e altamente tóxico (AT, 90-100%).

$$\text{Toxicidade (\%)} = (\text{Náuplios mortos})/(\text{Total de náuplios}) \quad (\text{Equação 1})$$

#### Determinação da qualidade microbiológica

Para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene da biomassa foi realizada a contagem total de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella* sp., conforme preconizado pela Resolução RDC nº 12 de janeiro/2001 (BRASIL, 2001). As análises microbiológicas da biomassa seguiram as recomendações de Silva *et al* (2001).

#### Determinação da atividade antioxidante

Para determinação da atividade antioxidante 2 g da biomassa foi homogeneizada com 20 mL de etanol. Após 24 horas sob agitação constante (50 rpm) a biomassa foi separada do

extrato por filtração utilizando papel de filtro e o volume do extrato recuperado foi completado para 20 mL. Nos ensaios de atividade antioxidante foram utilizados o extrato recuperado (10%, v/v) e a diluição preparada a 1% (v/v) (CONFORTIN, 2006).

A atividade antioxidante foi avaliada pela porcentagem de inibição de oxidação do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). Em um ambiente escuro, uma alíquota de 0,1 mL de cada extrato foi adicionada a 0,1 mL de solução etanólica de DPPH (0,06 mM) e após 30 minutos à temperatura ambiente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Como controle positivo foi utilizado o ácido gálico (ROESLER *et al*, 2007; VORARAT, *et al*, 2010).

#### Determinação da composição centesimal e valor calórico

As análises de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos foram determinadas de acordo com a AOAC (1997). O teor de umidade da amostra foi determinado por dessecação em estufa a 105 °C, até peso constante. O conteúdo de cinzas foi determinado por calcinação da amostra em mufla, a 550 °C. A determinação de nitrogênio total foi feita pelo método de Kjeldahl e para calcular o fator de conversão em proteínas totais foi utilizada a fórmula  $P (\%) = N \times 4,38$ . Para a determinação do teor de lipídios foi empregado o método de Bligh e Dyer. O teor de fibra bruta foi determinado por digestão ácida seguida por digestão alcalina. O teor de carboidratos da amostra foi determinado pela diferença, utilizando-se a seguinte fórmula:  $C (\%) = 100 - (\text{soma das demais frações da composição centesimal})$ . Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao peso seco da amostra.

Para o cálculo do valor calórico utilizou-se o fator de conversão de Atwater de 4 kcal.g<sup>-1</sup> (proteínas), 4 kcal.g<sup>-1</sup> (carboidratos) e de 9 kcal.g<sup>-1</sup> (lipídios). As análises foram realizadas em triplicata.



#### Determinação do pH e atividade de água

O pH da biomassa foi determinado em potenciômetro, marca Quimis, calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0 e a atividade de água ( $A_w$ ) por higrômetro marca Bras-Eq, a temperatura de 25 °C.

#### Determinação da composição mineral

A biomassa foi submetida à digestão com ácido nítrico (P.A), segundo metodologia descrita por Malavolta *et al* (1989). Os conteúdos de Cobre, Ferro, Manganês, Zinco, Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio foram determinados por Espectrometria de absorção atômica, marca GBC, modelo Avanta Sigma. O teor de fósforo foi determinado em espectrofotômetro UV/Vis da Thermo, modelo Helyos Beta. Os valores dos macrominerais (P, K, Ca, Mg e Na) foram expressos em  $\text{g.kg}^{-1}$  e os microminerais (Fe, Cu, Mn e Zn) em  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

#### Composição em aminoácidos totais

Para a quantificação de aminoácidos totais da biomassa foi utilizada a metodologia modificada de White *et al* (1986), através da hidrólise com HCl durante 24 h a 110 °C. O triptofano foi quantificado segundo Spies (1967) por digestão alcalina com NaOH 5N. Os resultados foram expressos em  $\text{g.100 g}^{-1}$ .

#### Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o software MiniTab 16.

## Resultados e Discussão

Rendimento da biomassa, qualidade microbiológica e toxicidade frente a *A. salina*

O rendimento da biomassa de *P. albidus* em cinco dias de cultivo foi de  $9,04 \text{ g.L}^{-1} \pm 1,84$ , em média. Este valor quando comparado ao encontrado por Confortin *et al* (2008) é aproximadamente 52% superior a biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 cultivada em biorreator de 5 L, em meio de cultivo contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, como fonte de carbono.

Além disso, este produto não apresentou contaminação por coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* sp. e *S. aureus* coagulase positiva, garantindo, portanto, a qualidade higiênico-sanitária da amostra, segundo preconizado pela RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001).

No bioensaio frente a *A. salina* não foi observada a mortalidade das larvas nas concentrações do extrato clorofórmio avaliadas, ou seja, o extrato foi classificado como não tóxico (NT). Há décadas *A. salina* é utilizada como alternativa para determinação de toxicidade, em consideração a sensibilidade desse microcrustáceo frente a compostos tóxicos, a exemplo de metabólitos tóxicos de micro-organismos (LIMA *et al*, 2011).

Atividade antioxidante da biomassa

O extrato etanólico da biomassa preparado a 10% (v/v) mostrou uma capacidade de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 28% e de 15% no extrato a 1% (v/v). Em contraste com os resultados encontrados nesta pesquisa, Confortin *et al* (2008) observaram uma redução de apenas 5% de DPPH em extrato etanólico da biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 produzida em cultivo submerso.

Composição centesimal, valor calórico, pH e atividade de água

A composição da biomassa de *P. albidus* em termos de proteínas, lipídios, carboidratos, fibra bruta e cinzas está mostrada na Tabela 1. O teor de cinzas da biomassa foi de 8,18% e lipídios em níveis menores (2,66%). Carboidratos, proteínas e fibras foram os componentes predominantes na biomassa de *P. albidus*, representando, 68,75%, 20,41% e 18,55%, respectivamente.

Parâmetro (% , bs)	Média ± desvio padrão
Umidade	18,04 ± 0,32
Cinzas	8,18 ± 0,09
Lipídios	2,66 ± 0,80
Proteínas	20,41 ± 1,04
Carboidrato total	68,75 ± 1,55
Fibra bruta	18,55 ± 1,45
Energia (Kcal)	380,59 ± 2,89

Tabela 1- Composição centesimal da biomassa de *P. albidus* [base seca (bs)] e valor calórico.

O conteúdo proteico da biomassa de *P. albidus* (Tabela 1) foi superior em aproximadamente 45,57% e 37,90% em relação aos de Hsu *et al* (2002) e Smirdele *et al* (2012) que reportaram teor proteico de 14,02 % e 14,8% no micélio de *P. pulmonarius* e *Cordyceps sinensis*, respectivamente, produzido por fermentação submersa. Nos estudos de Kurbanoglu *et al* (2004), Smirdele *et al* (2012) e Manu-Tawiah; Martin (1987) o teor de proteínas da biomassa de *A. bisporus*, *P. pulmonarius* e *P. ostreatus* variou de 14,02% a 47,1%, respectivamente, enquanto que em basidiomas de *P. ostreatus* CCB 019 cultivado em resíduo de arroz e *Marasmius oreades* o teor foi de 13% a 52,8%, respectivamente (KALAC, 2009; BONATTI *et al*, 2004). Comparativamente, o teor de proteínas da biomassa desidratada de *P. albidus* foi similar ao de outras fontes proteicas consumidas comumente pelo homem, como a sobrecoxa de frango (15,2%) e queijo minas (17,4%) (NEPA/TACO, 2011).

De acordo com Furlani; Godoy (2005) os cogumelos possuem uma quantidade significativa de compostos nitrogenados não proteicos que não são digeríveis, principalmente na forma de quitina em sua parede celular. Desta forma, para não superestimar o conteúdo proteico dos cogumelos é utilizado o fator de correção de 4,38, considerando que cerca de 70% do conteúdo de nitrogênio total dos cogumelos é digerível pelo organismo humano ( $0,70 \times 6,25 = 4,38$ ).

O conteúdo de lipídios da biomassa de *P. albidus* (Tabela 1) foi similar aos encontrados em *L. edodes* e *P. pulmonarius* cultivados em meios com diferentes fontes de carbono (LOBANOK *et al*, 2003; SMIRDELE *et al*, 2012). No estudo realizado por Confortin *et al* (2008) e Manu-Tawiah; Martin (1987) o teor de lipídios na biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 e *P. ostreatus* foi de 3 e 10,2%, em base seca, respectivamente.

O teor de carboidratos da biomassa (Tabela 1) foi superior ao obtido por Hsu *et al* (2002) em *Cordyceps sinensis*, de 39,4%. Na revisão apresentada de Kalac (2009) o autor cita que os carboidratos constituem um dos principais componentes dos cogumelos e que diversas pesquisas realizadas mostraram que o seu teor pode variar de 16,4% até 74,3%. O conhecimento relativo à caracterização desse componente ainda é reduzido para diversas espécies de cogumelos. No entanto, nos últimos anos tem sido dada uma atenção especial quanto ao tipo da estrutura e a atividade biológica destes carboidratos, tendo em vista que muitos deles já foram isolados a partir do micélio e basidiomas e têm expressado, por exemplo, atividades antioxidante, hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, e outras (HSU *et al*, 2002; KALAC, 2009).

Em relação à fibra bruta, o teor obtido na biomassa (Tabela 1) foi maior que o reportado na literatura (5,9% e 5,0%) para *P. ostreatus* cultivado em meio a base de turfa e em meio contendo glicose ( $45 \text{ g.L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, respectivamente (MANU-TAWIAH; MARTIN, 1987).

O conteúdo de cinzas da biomassa de *P. albidus* (Tabela 1) foi semelhante aos determinados em *Lyophyllum ulmarius* (CHEUNG, 1997), *P. sajor-caju* PS-2001 (CONFORTIN *et al*, 2008) de 8,66% e 7,14%, respectivamente. Já no trabalho de Wu; Hansen (2006) o micélio de *L. edodes* obtido no meio formulado com soro de queijo apresentou o dobro do teor de cinzas, cerca de 18%.

A média do pH da biomassa foi de 5,5 e a atividade de água ( $A_w$ ) de 0,38. A  $A_w$  é um parâmetro importante na conservação dos alimentos em geral. Em valores muito reduzidos de  $A_w$  pode ocorrer o escurecimento por reação de Maillard e a oxidação de lipídios, contudo esse processo é variado para diferentes alimentos, no entanto, em  $A_w$  mais alta o escurecimento é máximo. A deterioração dos alimentos pelo crescimento microbiano é inibida abaixo de  $A_w = 0,55$  (FELLOWS, 2006).

#### Composição mineral

De todos os macrominerais avaliados, o potássio foi o elemento mais abundante na biomassa de *P. albidus* (Tabela 2), seguido por P, Na, Mg e Ca. De acordo com Chang; Miles (2004) os teores de K, P, Na, Ca e Mg constituem cerca de 56 a 70% do total de minerais em cogumelos e dentre eles o K é o mais abundante, perfazendo cerca de 45% dos minerais. Em estudo realizado por Wu; Hansen (2006) os autores verificaram que a biomassa de *L. edodes* cultivada durante cinco dias em meio líquido contendo soro de queijo e em meio sintético (glicose, peptona e extrato de levedura) apresentou teor de K correspondendo a  $16,06 \text{ g.Kg}^{-1}$  e  $13,14 \text{ g.Kg}^{-1}$ , respectivamente.

O teor de P (Tabela 2) foi o segundo maior em quantidade na biomassa. Valores semelhantes também foram determinados por Wu; Hansen (2006) na biomassa de *L. edodes* produzida por fermentação submersa. No estudo de Matilla *et al* (2001) os teores de P

encontrados nos basidiomas de *L. edodes* e *P. ostreatus* variaram de 8,7 g.Kg<sup>-1</sup> a 13,9 g.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Minerais		Média ± desvio padrão
Macrominerais (g.Kg <sup>-1</sup> )	P	12,31 ± 0,13
	K	17,13 ± 0,68
	Ca	0,08 ± 0,0
	Mg	2,06 ± 0,05
	Na	3,52 ± 0,22
Microminerais (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Cu	3,97 ± 0,01
	Fe	28,82 ± 0,98
	Mn	Nd
	Zn	57,99 ± 1,21

Tabela 2. Teor de minerais presentes na biomassa de *P. albidus*, em base seca. Nd-não detectado

Chang; Miles (2004) citam que, em geral, os teores de Na e Ca nos cogumelos se assemelham. No entanto, no estudo com *P. albidus* o conteúdo de Ca foi reduzido (0,08 g.Kg<sup>-1</sup>) e cerca de três vezes menor que o de Na (3,52 g.Kg<sup>-1</sup>). Comparativamente, o teor de Na presente na biomassa de *P. albidus* foi menor que os reportados por Lobanok *et al* (2003) e Wu; Hansen (2006) cujos teores variaram de 4,03 g.Kg<sup>-1</sup> a 7,5-8,0 g.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, na biomassa de *L. edodes*.

O teor de magnésio determinado nessa pesquisa (2,06 g.Kg<sup>-1</sup>) foi maior quando comparado a basidiomas de cogumelos selvagens da Europa, cujo teor foi reportado variando de 0,8 a 1,8 g.Kg<sup>-1</sup> (KALAC, 2009).

O conteúdo dos microminerais avaliados (Tabela 2) em ordem decrescente de abundância foi Zn (57,99 mg.Kg<sup>-1</sup>), Fe (28,82 mg.Kg<sup>-1</sup>) e Cu (3,97 mg.Kg<sup>-1</sup>). Não foi detectada a presença de Mn na amostra. No trabalho de Wu; Hansen (2006) o teor de Zn encontrado na biomassa de *L. edodes* produzida em meio natural e sintético foi de 30 mg.Kg<sup>-1</sup> e 17 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Na pesquisa de Matilla *et al* (2001) os autores verificaram que o zinco foi o micromineral encontrado em maior quantidade nos basidiomas de *P. ostreatus*, *L. edodes* e *Agaricus bisporus*. O teor de ferro presente na biomassa foi reduzido, semelhante

ao encontrado nas frutas e vegetais em geral (CECCHI, 2009), contudo, Lobanok *et al* (2003) encontrou altos teores desse micromineral ( $650 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) na biomassa de *L. edodes*.

#### Composição em aminoácidos

Na Tabela 3 está citado o perfil dos aminoácidos essenciais e não essenciais da biomassa de *P. albidus*. Os resultados mostraram que dos aminoácidos totais, 37,60% correspondem aos aminoácidos essenciais. Leucina ( $0,91 \text{ g.100 g}^{-1}$ ), lisina ( $0,78 \text{ g.100 g}^{-1}$ ) e valina ( $0,73 \text{ g.100 g}^{-1}$ ) foram os encontrados em maior quantidade. O teor de aminoácidos não essenciais foi equivalente a 62,40%, destacando-se o ácido glutâmico ( $1,31 \text{ g.100 g}^{-1}$ ), ácido aspártico ( $1,14 \text{ g.100 g}^{-1}$ ), alanina ( $1,12 \text{ g.100 g}^{-1}$ ) e arginina ( $1,01 \text{ g.100 g}^{-1}$ ).

Nos dados apresentados por Manzi *et al* (1999) e Wang *et al* (2001) dentre os aminoácidos essenciais, a leucina foi observada em maior quantidade nos basidiomas de espécies de *Pleurotus*. Na citação de Chang; Miles (2004) está constando que lisina é mais abundante nos basidiomas de diversas espécies de cogumelos, enquanto que metionina e triptofano estão presentes em quantidade mais reduzida.

O conteúdo de aminoácidos na biomassa de cogumelos varia entre as espécies, e tal variação provavelmente esteja relacionada ao meio de crescimento e às características genéticas do cogumelo. (CHEUNG, 1996; CHIRINANG; INTARAPICHET, 2009). Por exemplo, em estudo realizado por Manu-Tawiah; Martin (1987) os autores verificaram que na biomassa de *P. ostreatus* produzida em meio de cultivo à base de turfa a concentração de aminoácidos foi bem maior em relação ao micélio cultivado em meio sintético.

No estudo realizado com a biomassa de *Cordyceps sinensis* cultivada em caldo de batata com dextrose a lisina foi o aminoácido essencial mais abundante (HSU *et al* 2002). Hadar; Cohen-Arazi (1986) verificaram que na biomassa de *P. ostreatus* produzida em meio sintético, os teores de ácido aspártico e ácido glutâmico foram maiores, em relação aos

demais aminoácidos, enquanto que Cheung (1996) verificou valores mais elevados de ácido aspártico e cisteína na biomassa de *P. citrinopileatus*.

Aminoácidos	g.100 g <sup>-1</sup>
Treonina	0,63
Valina	0,73
Metionina	0,37
Isoleucina	0,58
Leucina	0,91
Fenilalanina	0,52
Lisina	0,78
Triptofano	0,09
Total de aminoácidos essenciais	4,61
Ácido aspártico	1,14
Ácido glutâmico	1,31
Serina	0,9
Glicina	0,7
Cisteína	0,12
Histidina	0,23
Alanina	1,12
Prolina	0,65
Tirosina	0,47
Arginina	1,01
Total de aminoácidos não essenciais	7,65
<b>Total de aminoácidos</b>	<b>12,26</b>

Tabela 3. Composição de aminoácidos da biomassa de *P. albidus*

## Conclusão

Este estudo reporta de modo pioneiro as características nutricionais da biomassa de *P. albidus* produzida por fermentação submersa. A biomassa produzida em meio de cultura sintético é isenta de contaminantes e toxicidade, tem elevado teor de proteínas, fibra, minerais, reduzido teor de lipídios e apresenta todos os aminoácidos essenciais, características estas que potencializam a utilização desta biomassa como produto alimentício.



## Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e técnico da Micoteca DPUA/UFAM, do Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas, Laboratório de Análises Solos e Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental e Laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

## Referências

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 ed .Washington: Gaithersburg, 1997, 850 p.
- ATAYDE, H.M. Potencial de toxicidade de microfungos isolados de ração para peixes fabricada no Estado do Amazonas. 2008. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- BONATTI, M. *et al.* Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. Food Chemistry, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução RDC n.12, de 03 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, seção 1. Brasília, DF.
- CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos de análise de alimentos. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003, 207p.
- CHANG, S.T.; MILES, P.G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, 451 p.
- CHEUNG, P.C.K. Chemical evaluation of some lesser known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soy milk waste. Food Chemistry, v. 60, n. 1, p. 61-65, 1997.

CHIRINANG, P.; INTARAPICHET, K.O. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *ScienceAsia*, v. 35, p. 326-331, 2009.

CONFORTIN, F.G. Produção de biomassa fúngica da linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing em cultura submersa. 2006. 95 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

CONFORTIN, F.G. *et al.* Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 10, p. 1149-1155, 2008.

FELLOW, P.J. Propriedades dos alimentos e teoria do processamento. In: FELLOW, P.J. *Tecnologia e processamento de alimentos: princípios e práticas*. 2 ed Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 25-74.

FORTES; R.C.; NOVAES, M.R.C.G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 52, n. 4, 2006.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p.154-157, 2005.

GONZÁLEZ, A.M. *et al.* Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, n. 1, p. 59-61, 2007.

GREGORI, A. *et al.* Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, n. 3, p. 236-247, 2007.

HADAR, W.; COHEN-ARAZI, E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied Environment Microbiology*, v. 51, n. 6, p. 1352-1354, 1986.

HARWIG, J.; SCOTT, P.M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied Microbiology*, v. 21, n. 6, p.1011-06, 1971.

HSU, T.H. *et al.* A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaoCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Chemistry*, v. 78, n. 4, p. 463-469, 2002.

KALAC, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review. *Food Chemistry*, v. 113, n. 1, p. 9-16, 2009.

KIRSCH, L.S. *et al.* The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 13, n. 2, p. 185-192, 2011.

KURBANOGLU, E.B. *et al.* Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate. *Industrial Crops and products*, v. 19, n. 3, p. 225-230, 2004.

LIMA, C.P. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. *Acta Botanica Brasilica*, v. 25, n. 2, p. 331-336, 2011.

LOBANOK, A.G. *et al.* Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 60-64, 2003.

MALAVOLTA, E *et al.* Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Editora Gráfica Nagy, 1989, 201 p.

MANU-TAWIAH, W.; MARTIN, A.M. Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiology*, v. 4, n. 4, p. 303-310, 1987.

MANZI, P. *et al.* Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

MATTILA, P. *et al.* Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 49, n. 5, p.2243-2348, 2001.

MOORE, D.; CHIU, S.W. Fungal products as food. In: *Bio-exploitation of Filamentous Fungi*. Hong Kong, 2001, p. 223-251.

MORA, V.M.; CARRERA, D.M. Investigaciones básicas, aplicadas e socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus* spp. em Mexico. In: VÁSQUEZ, J.E.S.; CARRERA, D.M.; MATA, G.; LARA, H.L. (Ed.). El cultivo de setas *Pleurotus* spp em México. Ecosur, 2007, p.7-27.

NEPA/TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA. Campinas, 4ed. 161p., 2011. Disponível em : <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>> Acesso em abril 2011.

OMARINI, A. *et al.* Sensory analysis and fruiting bodies characterization of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, n. 3, p. 466-474, 2010.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SMIRDELE, F.R. *et al.* Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, p.368-376, 2012.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 12, p.1412-1415, 1967.

TANG, Y.L. *et al.* Submerged culture of mushrooms in bioreactors-challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, n. 3, p.221-229, 2007.

VORARAT, S. *et al.* Examination of antioxidant activity and development of rice bran oil and gamma-oryzanol microemulsion. *Journal of Health Research*, v. 24, n. 2, p. 67-72, 2010.

WANG, D. *et al.* Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, v. 78, n. 3, p. 293-300, 2001.

WHITE, J.A. *et al.* An Evaluation of the Waters Pico-Tag System for the Amino-Acid-Analysis of Food Materials. *Journal of Automatic Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WU, J.Z. *et al.* Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer-Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry*, v. 81, n. 3, p. 389-393, 2003.

WU, X. J.; HANSEN, C. Effects of whey permeate-based medium on the proximate composition of *Lentinus edodes* in the submerged culture. *Journal of Food Science*, v. 71, n. 6, p. 174-179, 2006.

ZANOTELLI, C.T. *et al.* Avaliação do modelo de Monod na produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 8, n. 2, p. 14-18, 2007.

## **CAPÍTULO 3**

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ACEITABILIDADE DE BARRAS DE CEREAIS ELABORADAS COM BIOMASSA DE *Pleurotus albidus*, UM COGUMELO DA AMAZÔNIA**

**Caracterização nutricional e aceitabilidade de barras de cereais elaboradas com biomassa de *Pleurotus albidus*, um cogumelo da Amazônia**

Larissa de Souza Kirsch<sup>1</sup>, Raimundo Felipe Cruz<sup>1</sup>, Mircella Marialva Alecrim<sup>1</sup>, Ana Rita Gaia Machado<sup>1</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>1(\*)</sup>

<sup>1</sup> Micoteca DPUA/UFAM. Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus, AM, Brazil.

(\*) Autor para correspondência: Coleção de Culturas DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000. Cep: 69.077-000, Manaus, Amazonas, Brasil. Tel/Fax: +55 92 3305 4284

E-mail: [mteixeira@ufam.edu.br](mailto:mteixeira@ufam.edu.br)

**Resumo**

Os cogumelos são alimentos apreciados pelo homem desde a antiguidade e se destacam pelas suas características nutricionais, além da importância medicinal ou terapêutica atribuídas a eles. O objetivo deste trabalho foi produzir barras de cereais contendo a biomassa de *Pleurotus albidus*, um cogumelo encontrado na Amazônia brasileira, bem como avaliar suas características nutricionais e sensoriais. Três formulações de barras de cereais foram preparadas utilizando proporções diferentes da biomassa do cogumelo (0%, 4% e 8%). As barras de cereais foram avaliadas quanto à qualidade microbiológica, composição centesimal e mineral, pH, acidez e análise sensorial. Todas as amostras estavam de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para alimentos. As barras de cereais formuladas com a biomassa de *P. albidus* apresentaram elevado teor de proteínas e minerais e apresentaram índice de aceitabilidade acima de 70% em todos os atributos avaliados.

**Palavras-chave:** *Pleurotus albidus*, barras de cereais, composição nutricional, aceitabilidade



## **Introdução**

Nas últimas décadas a dieta alimentar tem mudado consideravelmente em função da conscientização dos consumidores sobre o impacto que os alimentos podem causar na saúde, ou seja, não se destinam apenas a satisfazer a fome e fornecer nutrientes para suprir as necessidades do ser humano, mas também para prevenir doenças relacionadas à nutrição, melhorar o físico e o bem-estar mental (SIRÓ *et al*, 2008).

Nesse sentido, as barras de cereais são consideradas alimentos complementares à base de proteínas, fibras e carboidratos. Introduzidas no mercado mundial há mais de duas décadas como um produto alternativo saudável, as barras de cereais são resultado da busca crescente dos consumidores por uma alimentação rápida e mais adequada, com a finalidade de evitar ou corrigir problemas diversos na saúde humana. Além disto, são fáceis de encontrar, transportar e podem ser ingeridas como uma forma de repor as energias gastas durante as atividades diárias (CARVALHO, 2008; FREITAS; MORETTI, 2006).

Os cereais em barras são considerados uma classe de produtos de confeitaria, que vendidos na forma retangular em embalagens individuais tem apresentado um crescimento rápido no mercado mundial. Estimativas apontam para um consumo de cerca de 2,9 bilhões de dólares/ano de barras de cereais somente nos Estados Unidos, enquanto no Brasil esse valor é de aproximadamente 4 milhões de dólares (CARVALHO, 2008).

A associação de barras de cereais e alimentos saudáveis representa uma crescente tendência no mercado de alimentos. Com isso, um desses alimentos reconhecidos como importantes produtos de valor nutricional e econômico são os cogumelos. Mundialmente, esses macrofungos são cultivados e comercializados como produto para serem consumidos por indivíduos de qualquer idade e em todas as condições de saúde (MEHTA *et al*, 2011; UDDIN *et al*, 2011).

Os cogumelos comestíveis são alimentos de elevado valor nutricional, contendo quantidades significativas de proteínas, vitaminas, fibras, e reduzidos teores de lipídios. Além dessas propriedades nutricionais, algumas espécies têm sido apontadas como importantes do ponto de vista medicinal, por expressar certas atividades terapêuticas, como antibiótica, antitumoral, hipocolesterolêmica e outras (MANJUNATHAN; KAVIYARASAN, 2011; RAGUNATHAN; SWAMINATHAN, 2003;).

Entre os cogumelos comestíveis que estão sendo recentemente explorados quanto ao seu potencial de produção está *Pleurotus albidus*, uma espécie selvagem (LECHNER; ALBERTÓ, 2011). Esta já foi reportada em países como Argentina (LECHNER *et al*, 2004), México (FUENTES; NAVA, 2006) e no Brasil, mais recentemente no Estado do Amazonas (TEIXEIRA *et al*, 2009).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo elaborar barras de cereais utilizando como ingrediente principal a biomassa de *P. albidus*, bem como avaliar as características nutricionais e sensoriais.

## **Metodologia**

### Matéria-prima

A biomassa desidratada de *P. albidus* DPUA 1692 utilizada na formulação das barras de cereais foi produzida por fermentação submersa na Micoteca DPUA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em meio sintético contendo sacarose ( $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) e  $\text{MgSO}_4$  ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### Elaboração das barras de cereais

Os ingredientes utilizados para a formulação das barras de cereais foram obtidos em supermercados e lojas de produtos naturais da cidade de Manaus, Amazonas. As barras de

cereais foram formuladas variando a concentração da biomassa de *P. albidus* para cada 100 g de produto (Tabela 1). Os ingredientes secos foram pesados e misturados até distribuição homogênea, acondicionados em uma forma de aço inox e aquecidos em forno por aproximadamente 15 minutos a 100 °C.

Ingredientes	Formulação (%)		
	BC	B4%	B8%
Ingredientes secos			
Biomassa de <i>P. albidus</i>	0	4	8
Flocos de arroz	10	8	6
Flocos de aveia	20	18	16
Farinha de linhaça	6	6	6
Farelo de aveia	8	8	8
Leite em pó desnatado	8	8	8
Castanha-do-Brasil	3	3	3
Xarope de aglutinação			
Xarope de glicose	25	25	25
Açúcar mascavo	20	20	20

Tabela 1- Formulações utilizadas para o preparo das barras de cereais

BC= barra controle; B4%=Barra de cereal com 4% de biomassa; B8%=Barra de cereal com 8% de biomassa

O xarope de aglutinação foi preparado homogeneizando-se o xarope de glicose e o açúcar mascavo em banho-maria por 5 minutos. Em seguida, as duas frações foram homogeneizadas até atingirem uma massa uniforme que foi posteriormente distribuída em uma forma de aço inox forrada com papel manteiga. A massa foi mantida em repouso à temperatura ambiente até o seu resfriamento e com o auxílio de uma espátula foram feitos cortes retangulares no formato de uma barra de cereal comercial pesando aproximadamente 25 g. As barras de cereais foram embaladas em papel laminado e armazenadas em temperatura ambiente até o início dos testes sensoriais.

Análise microbiológica

Para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene das barras de cereais foi realizada a determinação de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella* sp. e *Bacillus cereus*, conforme preconizado pela Resolução RDC nº 12 de janeiro/2001 (BRASIL, 2001).

#### Análise da composição centesimal, pH e acidez total

As análises para determinação de umidade, cinzas, carboidratos totais, fibras, lipídios, e proteínas foram realizadas segundo metodologia descrita pela AOAC (1997). A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105 °C. O teor de lipídios foi obtido por extração a frio. O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C. O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl. Para a determinação do teor de fibras foi utilizada digestão ácida e alcalina. O valor calórico foi determinado utilizando-se fatores de conversão de Atwater: 4 kcal.g<sup>-1</sup> (proteína), 4 kcal.g<sup>-1</sup> (carboidratos) e 9 kcal.g<sup>-1</sup> (lipídios).

O pH das barras de cereais foi analisado pelo método potenciométrico, e a acidez total titulável usando como indicador a fenolftaleína, segundo padronizado pelas Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2006).

#### Análise da composição mineral

A composição mineral foi determinada segundo Silva (2009). As amostras desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C foram submetidas à digestão úmida com HNO<sub>3</sub> + HCl O<sub>4</sub> (3:1). O teor de cálcio, magnésio, potássio, cobre, ferro, manganês e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) e fósforo por espectrofotometria com azul de molibdênio. Os macrominerais (P, K, Ca, Mg e Na) foram expressos em g.kg<sup>-1</sup> e os microminerais (Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg<sup>-1</sup>.

### Análise texturométrica

As barras de cereais foram submetidas à determinação de textura utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System) com uma sonda cilíndrica SMS P/4. As condições operacionais foram as seguintes: velocidade de pré-teste 1,5 mm/s, velocidade de teste 2,0 mm/s, velocidade pós-teste 10 mm/s, com distância de penetração de 3 mm.

### Análise sensorial

A análise sensorial das barras de cereais foi realizada na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas através de um teste afetivo de aceitabilidade.

O painel sensorial foi formado por 44 provadores não treinados na faixa etária de 20 a 60 anos, de ambos os sexos, incluindo discentes, docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM. Após preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAM (Parecer 137.288) os julgadores foram submetidos ao teste de aceitabilidade das barras de cereais utilizando-se uma escala hedônica estruturada de 5 pontos, variando de 1 (desgostei muito) a 5 (gostei muito) onde foram avaliados os seguintes atributos: aparência, aroma, sabor, cor e aceitação geral. A intenção de compra das barras de cereais também foi avaliada (DUTCOSKY, 2011).

Os dados obtidos para cada uma das três preparações das barras de cereais foram utilizados para calcular o índice de aceitabilidade (DUTCOSKY, 2011):

$$IA (\%) = A \times 100 / B$$

Onde: A = nota média obtida para o produto; B = nota máxima dada ao produto

### Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o software MiniTab 16.

## Resultados e discussão

### Qualidade microbiológica

Os resultados relativos à análise da qualidade microbiológica indicaram ausência de micro-organismos contaminantes (*Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *S. aureus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes) nas três amostras de barras de cereais avaliadas, garantindo a qualidade higiênico-sanitária e a segurança microbiológica das amostras estabelecida pela legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), sendo, portanto, consideradas aptas para o consumo humano.

### Caracterização físico-química das barras de cereais

Na Tabela 2 estão indicados os valores da composição centesimal e valor calórico das barras de cereais. Os resultados médios diferiram estatisticamente entre as barras de cereais quanto à umidade, cujos valores variaram de 10,16 a 15,95%. A umidade é um parâmetro importante na conservação dos alimentos, pois teores reduzidos garantem o aumento da vida de prateleira e a manutenção das características sensoriais do produto (FELLOW, 2006).

Parâmetro (%)	Controle (0%)	<i>(P. albidus)</i>	
		4%	8%
Umidade	10,16 ± 0,09 <sup>c</sup>	14,86 ± 0,01 <sup>b</sup>	15,95 ± 0,60 <sup>a</sup>
Cinzas	2,19 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,26 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,47 ± 0,07 <sup>a</sup>
Lipídios	7,27 ± 0,36 <sup>ab</sup>	7,68 ± 0,14 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,04 <sup>b</sup>
Proteínas	11,37 ± 0,37 <sup>a</sup>	10,89 ± 0,38 <sup>a</sup>	10,76 ± 0,44 <sup>a</sup>
Carboidratos totais	69,01 ± 0,06 <sup>a</sup>	64,32 ± 0,52 <sup>b</sup>	63,80 ± 0,09 <sup>b</sup>
Fibra	1,37 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,77 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,12 <sup>a</sup>
Energia (kcal)	409,47 ± 1,74 <sup>a</sup>	385,97 ± 0,85 <sup>b</sup>	308,16 ± 1,93 <sup>c</sup>

Tabela 2. Composição centesimal e valor calórico das barras de cereais.

Os carboidratos foram os macronutrientes encontrados em maior quantidade nas barras de cereais, cujos teores variaram de 63,80 até 69,01%, com diferença significativa entre as barras teste e a controle. Os valores encontrados neste trabalho estão próximos aos encontrados por outros pesquisadores, em barras de cereais formuladas com geléia de casca

de abacaxi (69,98%) e inferiores quando comparados às barras de cereais contendo 15% de farinha de bagaço de maçã (75,85%) (FONSECA *et al*, 2011; CICHACZEWSKI, 2012).

As barras de cereais formuladas com a biomassa apresentaram teor de fibra bruta significativamente superior em relação à barra controle (1,37%), resultados esses maiores que os verificados por Peuckert *et al* (2010) para as barras formuladas com proteína texturizada de soja e camu-camu (1,72%).

Segundo a Portaria n. 27 (BRASIL, 1998) para um alimento ser considerado fonte de fibra, ele deve ter no mínimo 3%. Como o valor encontrado nas três formulações das barras de cereais ficou um pouco acima da metade desse valor recomendado, as barras de cereais apesar de conter fibra não podem ser classificadas como fonte desse macronutriente.

As proteínas são macronutrientes importantes na nutrição humana e dentre as funções que desempenha no organismo incluem a síntese de energia e de compostos de pequeno peso molecular, além de manterem o equilíbrio osmótico entre os diferentes fluidos do organismo (DUTRA DE OLIVEIRA; MARCHINI, 2003). O teor de proteínas não variou de forma significativa entre as três formulações avaliadas das barras de cereais (Tabela 2), ficando em média 11%. A barra teste 8% (10,76%) apresentou valor de proteína superior ao encontrado nos trabalhos de Silva *et al* (2009), Brito *et al* (2004) e Silva *et al* (2011), cujos teores foram, respectivamente 4,3%, 6,27% e 7,7%. Os valores de proteína encontrados neste trabalho com biomassa de *P. albidus* são considerados superiores em relação aos produtos encontrados no mercado, que têm em média 4% de proteínas (SAMPAIO *et al*, 2009).

O conteúdo de lipídios na amostra controle não apresentou diferença estatística em relação às amostras teste (Tabela 2), em média de 7,27%, contudo os resultados das amostras teste variaram entre si. O valor de lipídios encontrado nas três amostras pode ser explicado pela presença dos ingredientes integrantes das barras de cereais (linhaça e castanha-do-Brasil) que têm em média 32,3% e 63,5% de lipídios, respectivamente (NEPA/TACO, 2011).

Resultados mais elevados de lipídeos foram encontrados por Lima *et al* (2010) e Fonseca *et al* (2011) em barras de cereais elaboradas com polpa e amêndoa de baru (10,5%) e com casca de abacaxi (9,86%), respectivamente. A adição da farinha de linhaça e de castanha-do-Brasil agrega lipídios de boa qualidade às barras de cereais, uma vez que estes ingredientes possuem ácidos graxos mono e poli-insaturados, com destaque para ácidos graxos linoleicos e oleicos (LICHTENTHÄLER, 2009; SILVA *et al*, 2010).

O valor calórico (Tabela 2) está relacionado aos altos teores de carboidratos e lipídios, quando comparado com resultados de outras formulações de barras de cereais (LIMA *et al*, 2010; PEUCKERT, 2010). Houve redução significativa no valor calórico entre as três formulações de barras de cereais e isso pode ser atribuído à diminuição do teor de carboidratos nas formulações testes em relação a controle.

A determinação de cinzas fornece uma indicação do teor de minerais presentes na amostra. Sendo assim, as barras de cereais elaboradas com a biomassa do cogumelo apresentaram teor de cinzas superior a 2%, com destaque para a barra teste 8% (2,47%) que diferiu significativamente em relação as demais formulações. Esses resultados são superiores aos de Silva *et al* (2009) e Lima *et al* (2010) que ao produzirem barras de cereais formuladas com resíduo de maracujá e com polpa e semente de baru encontraram teor de aproximadamente 1,4%.

Dentre os macrominerais avaliados (Tabela 3) o K foi o mais abundante, seguido de P, Ca e Mg, nas três formulações. Os resultados desta pesquisa são superiores quando comparados aos de Fonseca *et al* (2011) que ao elaborar barra de cereais casca de abacaxi encontraram teores de 2,18 g.kg<sup>-1</sup>, 2,63 g.kg<sup>-1</sup>, 1,03 g.kg<sup>-1</sup> e 0,68 g.kg<sup>-1</sup>, para P, K, Mg e Ca, respectivamente.

Algumas funções que o potássio desempenha no organismo incluem o balanceamento e distribuição de água no organismo, relaxamento muscular e regulação das atividades



neuromusculares. O fósforo tem papel importante no metabolismo energético, absorção e transporte de nutrientes e regulação da atividade proteica. O magnésio é um macromineral essencial para o metabolismo dos carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. O cálcio atua na formação estrutural dos ossos e dentes.

Minerais	Controle (0%)	<i>(P. albidus)</i>	
		4%	8%
P (g.kg <sup>-1</sup> )	3,26 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,48 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,96 ± 0,18 <sup>a</sup>
K (g.kg <sup>-1</sup> )	4,96 ± 0 <sup>c</sup>	6,55 ± 0,08 <sup>b</sup>	7,36 ± 0,42 <sup>a</sup>
Ca (g.kg <sup>-1</sup> )	2,65 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,05 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,12 <sup>a</sup>
Mg (g.kg <sup>-1</sup> )	0,93 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,12 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,25 ± 0,03 <sup>a</sup>
Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )	4,26 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,54 ± 0,16 <sup>a</sup>	4,52 ± 0,14 <sup>a</sup>
Fe (mg.kg <sup>-1</sup> )	45,2 ± 1,58 <sup>a</sup>	45,56 ± 2,35 <sup>a</sup>	43,26 ± 1 <sup>a</sup>
Mn (mg.kg <sup>-1</sup> )	20,03 ± 0,38 <sup>a</sup>	19,64 ± 0,90 <sup>a</sup>	18,71 ± 0,08 <sup>a</sup>
Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	20,46 ± 0,61 <sup>c</sup>	23,00 ± 0,5 <sup>b</sup>	26,91 ± 0,98 <sup>a</sup>

Tabela 3- Composição mineral das barras de cereais.

O micromineral Fe (Tabela 3) foi o mais abundante em todas as formulações das barras de cereais, seguido pelo Zn e com teor superior ao encontrado por Fonseca *et al* (2011). O teor de Zn desta pesquisa se assemelha ao de Córdova (2012) em barras de cereais com trigo fermentado contendo micélio de *Agaricus brasiliensis*. Em estudo de Freitas; Moretti (2006) os valores de Fe e Zn se aproximaram ao da barra de cereais deste estudo, sendo respectivamente, 51,5 mg.kg<sup>-1</sup> e 29,5 mg.kg<sup>-1</sup> em barras de cereais funcionais com sabor de banana.

O teor de Mn não variou significativamente entre as formulações e foi o micromineral menos abundante, cujos valores foram inferiores quando comparado a barras formuladas com amêndoa de sapucaia e castanha-do-gurguéia (CARVALHO, 2008).

No organismo, o ferro atua no transporte de oxigênio, síntese de neurotransmissores e funcionamento do sistema imunológico, enquanto o manganês é um importante ativador enzimático (DUTRA DE OLIVEIRA; MARCHINI, 2003). O zinco auxilia na melhora da imunidade, do olfato e paladar, atua na síntese de proteínas e juntamente com o cobre tem papel antioxidante e na cicatrização.

Segundo a Portaria n.27 da Anvisa de 1998 é possível classificar os alimentos como sendo “fonte” de algum mineral quando ele perfaz o mínimo de 15% do Índice Diário Recomendado (IDR) (BRASIL, 2005) do mineral para cada 100 g de alimento sólido. Já para o alimento que fornece um mínimo de 30% do IDR para um determinado nutriente, diz-se que ele tem “alto teor” deste nutriente para cada 100 g de alimento sólido. Desta forma, considerando a ingestão diária de 1 barra de cereal de 25 g a barra controle pode ser considerada fonte de P, K, e Mg, já que atende a 17,71% , 11,83% 3 21,77% do IDR, respectivamente. As barras de cereal teste contendo 4% e 8% de biomassa são fontes de P (23,39%) e Mn (21,34%) e P (26,28%) e Mn (20,33%), respectivamente.

A média dos valores de pH variou de 6,66, a 6,86 com diferença estatística entre as barras de cereais (Tabela 4). Córdova (2012) encontraram valor médio de 6,33 nas barras de cereais elaboradas com *Agaricus brasiliensis*. A medida de acidez total não mostrou diferença estatística entre as formulações das barras de cereais, sendo que os valores médios foram de 2,03, 2,01 e 2,00 para as barras controle, teste 4% e 8%, respectivamente. Esses valores de acidez se assemelham aos encontrados por Mourão *et al* (2008) em barras de cereais com caju-ameixa (1,97 a 3,33 %).

Formulação	pH	Acidez total titulável (%)	Dureza (gF)
Controle	6,86 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	1091,83 ± 144,78 <sup>b</sup>
Teste (4%)	6,76 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	2260,2 ± 432,30 <sup>a</sup>
Teste (8%)	6,66 ± 0,05 <sup>c</sup>	2,00 ± 0,02 <sup>a</sup>	2531,07 ± 299,20 <sup>a</sup>

Tabela 4- pH, acidez total titulável e dureza das barras de cereais formuladas com biomassa de *P. albidus*

Em relação à análise instrumental de textura das barras de cereais (Tabela 4) observou-se que houve variação entre os valores médios de força exercidos pelo texturômetro. Este equipamento imita o processo de mastigação humana e é um atributo importante quando se quer avaliar a maciez ou não de um determinado alimento. Desta forma, na barra de cereal controle, o valor da dureza (gF) foi inferior aos encontrados nas barras teste. Resultados

semelhantes também foram encontrados por Silva *et al* (2009) que verificaram um aumento proporcional no parâmetro dureza à medida que a elevou-se a concentração de resíduo de maracujá na formulação das barras de cereais, favorecendo a compactação das mesmas.

#### Análise sensorial

A média das notas atribuídas pelos provadores referente às formulações das barras de cereais está apresentada na Tabela 5. De um modo geral, as barras de cereais elaboradas com a biomassa de *P. albidus* tiveram boa aceitação em todos os atributos. Os valores médios para o atributo cor nas barras teste foi maior que na formulação controle, embora esses dados não tenham diferido estatisticamente entre si. Cerca de 52,27% e 43,18% dos provadores referiram-se a “gostei” e 22,73% e 29,55% (Figura 1) a “gostei muito”, para as barras teste 4% e 8% , respectivamente.

A pontuação média da aparência das barras de cereais foi semelhante para as barras teste (Tabela 5) e revelou um índice de aceitabilidade de 79,55%, embora não tenha sido verificada diferença significativa em relação à barra controle. Segundo citado por Dutcosky, (2006) o primeiro atributo avaliado pelo homem quando da decisão de um determinado alimento é a aparência, seguido pelo odor, consistência, textura e sabor.

Formulação	Atributos					Intenção de compra
	Cor	Aparência	Aroma	Sabor	Aceitabilidade geral	
Controle	3,82 <sup>a</sup>	3,89 <sup>a</sup>	4,02 <sup>a</sup>	4,20 <sup>a</sup>	4,11 <sup>a</sup>	4,09 <sup>a</sup>
Teste (4%)	3,86 <sup>a</sup>	3,98 <sup>a</sup>	3,82 <sup>a</sup>	3,91 <sup>a</sup>	4,05 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>
Teste (8%)	3,98 <sup>a</sup>	3,98 <sup>a</sup>	3,80 <sup>a</sup>	3,95 <sup>a</sup>	3,91 <sup>a</sup>	3,98 <sup>a</sup>

Tabela 5- Média das notas atribuídas pelos provadores e intenção de compra das barras de cereais  
Médias seguidas pela mesma letra (s) não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Em relação à aceitabilidade geral este foi um dos atributos mais bem aceitos pelos provadores, cujos valores médios foram de 4,05 e 3,91 para as barras teste 4% e 8%,

respectivamente. Na Figura 1 pode-se observar que a frequência obtida das barras de cereais referindo-se a “gostei muito” e “gostei” foram a controle e a teste 4% (81,82%) seguida pela barra teste 8% (77,26%).

O aroma foi o que obteve menor pontuação nas barras formuladas com a biomassa de *P. albidus*, em relação aos demais atributos. A preferência pela barra controle pode estar relacionada ao fato da biomassa desidratada adicionada apresentar um aroma naturalmente doce e frutado e tal característica não deve ter sido apreciada pelos provadores. No estudo realizado por Gomes *et al* (2010) para avaliar a utilização de albedo de maracujá amarelo em barras de cereais verificaram que para o atributo aroma a adição de diferentes concentrações de albedo de maracujá reduziu a média das notas em relação a formulação controle.

A avaliação sensorial realizada demonstrou que as barras de cereais formuladas com a biomassa de *P. albidus* apresentaram um bom potencial para consumo, pois para um produto ser considerado aceito é necessário que os valores do Índice de Aceitabilidade (%) para os atributos avaliados fiquem acima de 70% (DUTCOSKY, 2011).

Em relação à intenção de compra todas as três barras de cereais tiveram nota média de aproximadamente 4,0. Além disso, 40,9% e 38,6% dos provadores disseram que com certeza comprariam as barras controle e a teste (4%), respectivamente, enquanto que 40,9% das pessoas afirmaram que provavelmente comprariam a barra teste (8%).

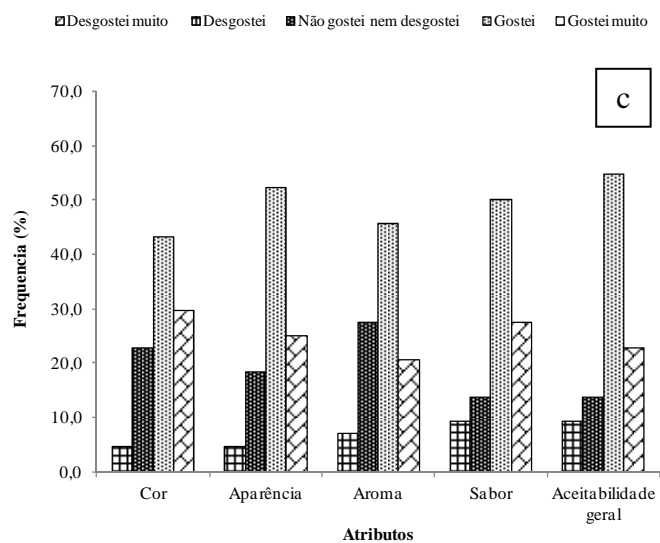
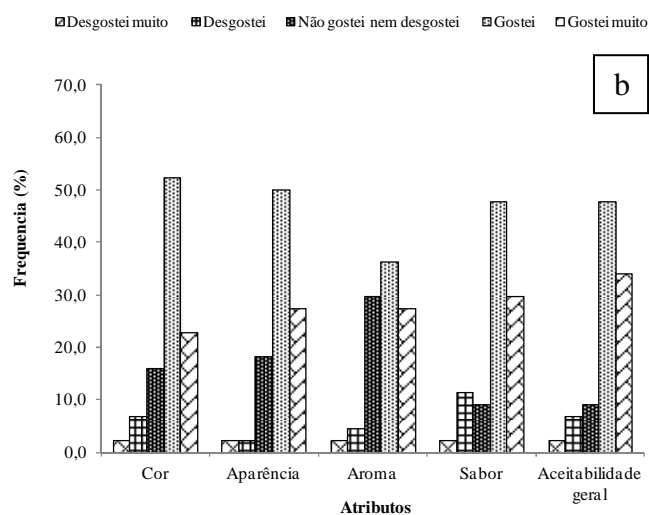
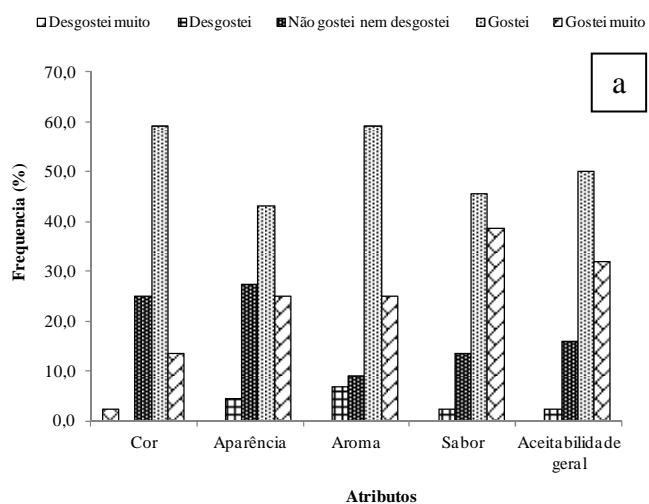


Figura 1. Frequência das notas das barras de cereais controle (a), teste 4% (b) e 8% (c) para os atributos avaliados

## **Conclusão**

Com os resultados obtidos conclui-se que a adição da biomassa de *P. albidus* em substituição a aveia em flocos e flocos de arroz melhora o valor nutricional das barras de cereais, elevando o teor de fibras e minerais e reduz o conteúdo energético. Embora não tenha sido verificada diferença significativa em relação à barra controle, as barras contendo biomassa do cogumelo comestível são fonte de proteína. As barras de cereais, de uma forma geral, tiveram boa aceitabilidade sensorial, podendo ser consideradas uma nova alternativa dentro dos produtos de confeitaria para os consumidores que buscam alimentos mais saudáveis.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e técnico da Micoteca DPUA/UFAM, do Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas e Laboratório de Análises Solos e Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental.

## **Referências**

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 ed .Washington: Gaithersburg, 1997, 850 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. Brasília, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução RDC n.12, de 03 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, seção 1. Brasília, DF.

BRITO, I.P. *et al.* Elaboração e avaliação global de barra de cereais caseira. Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos, v. 22, n. 1 p. 35-50, 2004.

CARVALHO, M.G. Barras de cereais com amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-dogurguéia, complementadas com casca de abacaxi. 2008. 93 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CICHACZEWSKI, A. Desenvolvimento de uma barra de cereal rica em fibras, a partir do subproduto da extração do suco de maçã. 2012. 55 f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

CÓRDOVA, K.R.V. Barras de cereais com *Agaricus brasiliensis* e minerais: elaboração, caracterização física, química e sensorial. 2012, 171f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. 3 ed. Curitiba: Editora Champagnat, 2011. 426 p.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. Ciências Nutricionais – Aprendendo a Aprender. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2008. 670p.

FELLOW, P.J. Propriedades dos alimentos e teoria do processamento. In: FELLOW, P.J. Tecnologia e processamento de alimentos: princípios e práticas. 2 ed Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 25-74.

FONSECA, R.S. *et al.* Elaboração de barra de cereais com casca de abacaxi. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 61, n. 2, p. 216-223, 2011.

FREITAS, D.G.C.; MORETTI, R.H. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 2, p. 318-324, 2006.

FUENTES, A.M.; NAVA, E.B.; El “hongo blanco patón” *Pleurotus albidus*, em Hidalgo. Su primer registro em México. Revista Mexicana de Micología, v. 22, p. 41-47, 2006.

GOMES, F.L. *et al.* Desenvolvimento de barras de cereais à base de farinha de albedo de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*). Revista Acta Tecnológica, v. 5, n. 2, p.115-125, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2006.

LECHNER, B. E *et al.* The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, v. 96, n. 4, p. 845-858, 2004.

LECHNER, B.E.; ALBERTÓ, E. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista Iberoamericana de Mycologia*, v. 28, n. 4, p. 148-154, 2011.

LICHTENTHÄLER, A.G. Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça marrom e dourada no câncer de mama. São Paulo, 2009, 77f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LIMA, J.C.R. *et al.* Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa e baru. *Boletim Ceppa*, v. 28, n. 2, p.331-343, 2010.

MANJUNATHAN, J.; KAVIYARASAN, V. Nutrient composition in wild and cultivated edible mushroom, *Lentinus tuberregium* (Fr.) Tamil Nadu., India. *International Food Research Journal*, v. 18, p. 784-786, 2011.

MEHTA, B.K. *et al.* Cultivation of button mushroom and its processing: an techno-economic feasibility. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, v. 2, n. 1, p. 201-207.

MOURÃO, L.H.E. *et al.* Avaliação sensorial de barras de cereais de caju ameixa com alto teor de fibras. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 2, p. 287-295, 2012.

NEPA/TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA. Campinas, 4ed. 161p., 2011. Disponível em : <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>> Acesso em abril 2011.

PEUCKERT, Y.P. *et al.* Caracterização e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de proteína texturizada de soja e camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Alimentação e nutrição*, v. 21, n. 1, p. 149-154, 2010.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* sp. grown on various agro-wates. *Food Chemistry*, v. 80, p. 371-375, 2003



SAMPAIO, C.R.P. *et al.* Perfil sensorial e aceitabilidade de barras de cereais fortificadas com ferro. *Alimentos e Nutrição*, v. 20, n. 1, p. 95-106, 2009.

SILVA, F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília-DF, Informação Tecnológica, 2009. 628p.

SILVA, F.D. *et al.* Elaboração de uma barra de cereal de quinoa e suas propriedades sensoriais e nutricionais. *Alimentos e Nutrição*, v. 22, n. 1, p. 63-69, 2011.

SILVA, I.Q. *et al.* Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. *Alimentos e Nutrição*, v. 20, n. 2, p. 321-329, 2009.

SILVA, R.F. *et al.* Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 2, p. 445-450, 2010.

SIRÓ, I. *et al.* Functional foods. Product development, marketing and consumer acceptance – a review. *Appetite*, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

TEIXEIRA, M.F.S. *et al.* Herbário micológico: patrimônio de cogumelos da Amazônia. In: 61ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2009, Manaus. Anais da 61ª Reunião anual da SBPC: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2009.

UDDIN, M.S. *et al.* Production of oyster mushrooms in different seasonal conditions of Bangladesh. *Journal of Scientific Research*, v. 3, n. 1, p. 161-167, 2011.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho permitiram concluir que:

- Dentre as condições *in vitro* avaliadas os meios de cultivo ágar batata dextrose com extrato de levedura e ágar extrato de malte com extrato de levedura e a ausência de luz promovem o crescimento micelial de *P. albidus*, expressando maior densidade micelial.
- A utilização de elevados volume de inóculo, da sacarose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, é adequada para a produção da biomassa de *P. albidus* por fermentação submersa;
- Os parâmetros físico-químicos, como concentração de sacarose e extrato de levedura, pH inicial do meio de cultivo, velocidade de agitação influenciam de forma significativa a produção da biomassa micelial de *P. albidus* por fermentação submersa;
- A biomassa micelial de *P. albidus* produzida por fermentação submersa nas condições de cultivo avaliadas tem qualidade microbiológica e nutricional adequadas para o consumo humano;
- As barras de cereais elaboradas com a biomassa de *P. albidus* tem qualidade microbiológica, nutricional e sensorial e podem ser consideradas como uma nova alternativa para o consumo humano.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOTECNOLOGIA



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar do Projeto de Pesquisa “**Produção de suplemento alimentar utilizando cogumelo comestível da Amazônia**” sob a responsabilidade das pesquisadoras Msc Larissa de Souza Kirsch e Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira que tem como objetivo elaborar barras de cereais utilizando como um dos ingredientes biomassa desidratada de *Pleurotus albidus*, um cogumelo comestível nativo da região Amazônica.

A sua participação é voluntária, ou seja, o Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhum valor econômico, contudo a sua participação é muito importante para o avanço desta pesquisa. Se não quiser participar, tem o direito e a liberdade de se recusar, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem precisar se justificar, nem sofrer qualquer dano.

A sua colaboração consistirá na degustação de uma pequena quantidade das amostras de barras de cereais e preenchimento de uma ficha de avaliação sensorial das mesmas. As amostras foram preparadas de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, além disso, realizaram-se as análises físico-químicas e microbiológicas, garantindo que o referido produto alimentício não ofereça risco iminente ao participante.

Os resultados obtidos serão utilizados exclusivamente para a referida pesquisa, garantindo a total confidencialidade dos julgadores. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora pelos telefones (92) 3305-4284, (92) 8123-6569, pelo e-mail: l\_kirsch@hotmail.com ou ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via comigo e outra com o pesquisador.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_-\_\_\_\_\_-\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Pesquisadora Responsável

\_\_\_\_\_-\_\_\_\_\_-\_\_\_\_\_  
Data

## ANEXO 2


**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**
**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Produção de suplemento alimentar utilizando cogumelo comestível da Amazônia

**Pesquisador:** Larissa de Souza Kirsch

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 08179612.1.0000.5020

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Amazonas

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 137.288

**Data da Relatoria:** 31/10/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um trabalho que busca avaliar as condições in vitro de produção de biomassa micelial e as propriedades nutricionais de *P. albidus* DPUA 1692, visando a elaboração de um produto de confeitaria suplementado com a biomassa desse cogumelo. Os dados relativos à produção de biomassa de *P. albidus* em meio líquido bem como as suas características físico-químicas e nutricionais serão submetidos a análise de Variância (ANOVA) para detectar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras e os valores médios significativos serão avaliados pelo Teste de Tukey, utilizando-se o software Minitab 16. A partir dos dados obtidos para cada uma das três preparações das barras de cereais contendo a biomassa de *P. albidus* será calculado o índice de aceitabilidade segundo Peucker et al, (2010). Em seguida, a análise de aceitabilidade das amostras das barras de cereais produzidas bem como os dados relativos à intenção de compra das três amostras serão avaliados. Orçado em R\$ 244,45 custeado pelo pesquisador. por análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa Minitab 16.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar in vitro as condições de produção e as propriedades nutricionais de *Pleurotus albidus* DPUA 1692 com a finalidade de elaborar barras de cereais suplementadas com a biomassa desse cogumelo comestível selvagem da Amazônia

Objetivo Secundário:

**Endereço:** Rua Teresina, 4950

**Bairro:** Adrianópolis

**CEP:** 69.057-070

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3305-5130

**Fax:** (92)3305-5130

**E-mail:** cep@ufam.edu.br



- 1 - Verificar a produção de biomassa de *P. albidus* em meio líquido utilizando diferentes fontes sintéticas e naturais de carbono e nitrogênio;
- 2 - Avaliar a influência de diferentes parâmetros físico-químicos, como concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH e frequência de agitação, na produção de biomassa de *P. albidus* em meio líquido;
- 3 - Avaliar o potencial nutricional da biomassa de *P. albidus*;
- 4 - Elaborar barras de cereais com a biomassa de *P. albidus*;
- 5 - Caracterizar as barras de cereais quanto a sua composição centesimal, suas características físicas, químicas e sensoriais.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

Informa que os riscos contidos nesta pesquisa são os inerentes aos projetos dessa natureza. Por se tratar de um produto que será elaborado artesanalmente, as etapas de preparação do mesmo atenderão os padrões higiênico-sanitários em conformidade com as determinações da Portaria CVS 6/99 de 10/3/99, que estabelece os Parâmetros e Critérios para o Controle Higiênico-Sanitário em Estabelecimentos de Alimentos (ANVISA, 1999),

garantindo que o referido produto alimentício não ofereça risco iminente ao grupo de provadores.

##### **Benefícios:**

Os benefícios associados aos resultados obtidos com este projeto de pesquisa irão contribuir para o conhecimento dos atributos sensoriais das barras de cereais e a possibilidade de introdução de um novo produto no mercado formulado com uma espécie de cogumelo comestível nativo da região Amazônica.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de relevância científica e social, com projeto elaborado em conformidade com as normas éticas brasileiras para pesquisa.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos de anuência e TCLE adequados.

#### **Recomendações:**

não se aplica.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto devidamente escrito, tanto metodologicamente quanto ao componente ético.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Teresina, 4950

**Bairro:** Adrianópolis

**CEP:** 69.057-070

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3305-5130

**Fax:** (92)3305-5130

**E-mail:** cep@ufam.edu.br



**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MANAUS, 01 de Novembro de 2012

---

**Assinador por:**  
**Pedro Rodolfo Fernandes da Silva**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Teresina, 4950

**Bairro:** Adrianópolis

**CEP:** 69.057-070

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3305-5130

**Fax:** (92)3305-5130

**E-mail:** cep@ufam.edu.br