

PAULO ROBERTO CANTARELLI

Engenheiro Agrônomo - "Master of Science"

Auxiliar de Ensino do Departamento de Tecnologia Rural da
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" U.S.P.

PRODUÇÃO DE MICÉLIO DE COGUMELOS COMO
FONTE DE PROTEÍNA.

Orientador: Dr. Hércio Falanghe

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", para obtenção
do Título de Doutor em Agronomia.

PIRACICABA

— 1972 —

A Glycínia,
Márcio,
e Mariela

AGRADECIMENTOS

Apresentamos os nossos agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho e em especial, às seguintes pessoas:

Dr. Hércio Falanghe, pela sua dedicação, orientação e apoio. Seus conselhos, suas críticas e amizade foram, sem dúvida, elementos de importância para a concretização deste trabalho.

Dra. Rhame Nelly Neder pelas fundamentadas críticas e sugestões.

Dr. Cyro Teixeira, pela utilização dos laboratórios do Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos.

Engenheiros Agrônomos J.G.B. Caruso, L.E. Gutierrez e C.S.M. Crestana, pela valiosa colaboração técnica.

Expressamos também nossos agradecimentos à Drury's S.A., pelo fornecimento da vinhaça utilizada.

Í N D I C E

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
3. MATERIAL	16
3.1. Microrganismos	16
3.2. Meios de cultura para o desenvolvimento do micélio .	16
4. MÉTODOS	19
4.1. Produção de micélio	19
4.2. Métodos Analíticos	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Seleção dos microrganismos	22
5.2. Efeito da concentração de nitrogênio, fósforo e mag- nésio no desenvolvimento de micélio de <u>Agaricus cam-</u> <u>pestris</u> , <u>Tricholoma nudum</u> e <u>Pleurotus ostreatus</u> , em cultura submersa	27
5.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no desen- volvimento de micélio de <u>Agaricus campestris</u> , <u>Tri-</u> <u>choloma nudum</u> e <u>Pleurotus ostreatus</u> , em cultura sub- mersa	27
5.4. Efeito da concentração da diluição da vinhaça na va- riação da produção de micélio de <u>Agaricus campestris</u> , <u>Tricholoma nudum</u> e <u>Pleurotus ostreatus</u>	28
5.5. Efeito do inóculo desenvolvido em vinhaça no desen- volvimento de <u>Agaricus campestris</u> , <u>Tricholoma nudum</u> e <u>Pleurotus ostreatus</u>	29

5.6. Consumo de "não açúcares", presentes no meio de vinhaça, por <u>Agaricus campestris</u> , <u>Tricholoma nudum</u> e <u>Pleurotus ostreatus</u>	30
5.7. Determinação da demanda bioquímica de oxigênio nos líquidos residuais do desenvolvimento de micélio de cogumelos em meio de vinhaça	31
5.8. Aminoácidos dos micélios de <u>Agaricus campestris</u> , <u>Tricholoma nudum</u> e <u>Pleurotus ostreatus</u>	32
5.9. Conteúdo de gorduras e dos seus ácidos graxos no micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa.	33
5.10. Ocorrência de esporos secundários nas culturas dos microrganismos	33
5.11. Produção de micélio e proteína por cogumelos desenvolvidos em cultura submersa	34
6. CONCLUSÕES	54
7. RESUMO	56
8. SUMMARY	57
9. BIBLIOGRAFIA	58

LISTA DAS TABELAS

Tabela		Pág.
I	Espécies de cogumelos testadas em meio de vinhaça	35
II	Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento e composição do micélio de <u>Agaricus campestris</u>	36
III	Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento e composição do micélio de <u>Tricholoma nudum</u> ..	37
IV	Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento e composição do micélio de <u>Pleurotus ostreatus</u>	38
V	Efeito da concentração de fósforo no crescimento e composição do micélio de <u>Agaricus campestris</u> ..	39
VI	Efeito da concentração de fósforo no crescimento e composição do micélio de <u>Tricholoma nudum</u>	40
VII	Efeito da concentração de fósforo no crescimento e composição do micélio de <u>Pleurotus ostreatus</u> ..	41
VIII	Efeito da concentração de magnésio no crescimento e composição do micélio de <u>Agaricus campestris</u> ..	42
IX	Efeito da concentração de magnésio no crescimento e composição do micélio de <u>Tricholoma nudum</u>	43

Tabela		Pág.
X	Efeito da concentração de magnésio no crescimento e composição do micélio de <u>Pleurotus ostreatus</u> ..	44
XI	Efeito da fonte de nitrogênio na produção e composição do micélio dos cogumelos	45
XII	Crescimento de cogumelos em meios com quantidades variáveis de vinhaça	46
XIII	Crescimento de cogumelos em meios com vinhaça diluída	47
XIV	Efeito do inóculo produzido em meio de vinhaça no desenvolvimento de cogumelos	48
XV	Utilização de ácidos orgânicos por micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa	49
XVI	Consumo de polióis por micélio de cogumelo	50
XVII	Demanda bioquímica de oxigênio nos líquidos residuais do desenvolvimento do micélio de cogumelos em meio de vinhaça	50
XVIII	Aminoácidos dos micélios de cogumelos	51
XIX	Composição em ácidos graxos da fração lipídica do micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa	52
XX	Produção de micélio e proteína por cogumelos desenvolvidos em vários resíduos industriais	53

1. INTRODUÇÃO

A produção de microrganismos como fonte de proteína tem sido considerada uma potencial contribuição para o aumento da disponibilidade de alimentos protéicos, visando amenizar a carência de proteína a que estão submetidos grandes contingentes de população. Essa produção apresenta incontestáveis vantagens em confronto com as formas convencionais de obtenção de alimentos protéicos, pois os microrganismos independem de condições climáticas para seu desenvolvimento, crescem com grande rapidez e produzem com incomparável eficiência proteína de boa qualidade, requerendo para isso apenas instalações industriais, cujas áreas ocupadas são negligenciáveis no confronto com as necessárias para a produção convencional de alimentos protéicos.

Desde a Segunda Guerra Mundial, leveduras vêm sendo utilizadas na suplementação de alimentos. Mais recentemente, investigando-se a possibilidade de substituir-se, no preparo de alguns alimentos, o corpo de frutificação de cogumelos por seu micélio, desenvolvido em cultura submersa, revelou-se a grande capacidade destes microrganismos em produzir proteína micelial, em inúmeros resíduos industriais.

Atentando para o importante problema do descarte de vinhaça das indústrias produtoras de álcool de milho, procuramos, neste trabalho, investigar a adequacidade desse resíduo no desenvolvimento de micélio de cogumelos, com vistas a sua potencialidade como fonte de proteína.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O crescimento de micélio de cogumelos, em cultura submersa, foi obtido pela primeira vez por LAMBERT (1938) estudando o cultivo de Agaricus campestris, na forma de corpo de frutificação. HUMFELD (1948), atentando para o potencial econômico que representaria o micélio de cogumelos como substituto do corpo de frutificação, considerou a conveniência da utilização de resíduos industriais como substrato para o crescimento de micélio de cogumelos em cultura submersa. Utilizando uma variedade de Agaricus campestris, usada na produção comercial do corpo de frutificação, o autor obteve rendimentos de até 60% por peso de açúcar consumido, em meios de cultura contendo suco de talos de aspargos ou suco de resíduo de indústria de peras. Confrontando a composição química do micélio assim obtido, com amostras de cogumelos comercializados, verificou teores de proteína e gordura maiores no micélio de cogumelo do que no corpo de frutificação.

Em trabalho posterior, HUMFELD e SUGIHARA (1949) procuraram obter dados mais completos sobre as exigências nutricionais do micélio de Agaricus campestris, utilizando meio sintético contendo glicose como fonte de carbono. Uma produção de aproximadamente 20 gramas de micélio por litro, foi obtida após 4-5 dias de desenvolvimento, em cultura submersa. Fontes de nitrogênio, tais como suco da prensagem de alfafa, glutamato de sódio, peptona, aminoácidos, uréia e hidróxido de amônio, foram consideradas satisfatórias para o desenvolvimento do fungo. Empregando uréia, os autores verificaram que além de glicose, outros carboidratos como galactose, manose, frutose, maltose, xilose, arabinose, dextrina, sacarose, manitol e amido solúvel, proporcionaram bons rendimentos, enquanto

que lactose e sódio carboximetil celulose não foram utilizadas pelo microrganismo. Vários métodos para o processamento do micélio foram relatados e seu potencial na alimentação foi discutido.

Em 1951, HUMFELD isolou e estudou 40 linhagens de Agaricus campestris. Entre elas, encontrou três capazes de crescer em meio líquido aerado e agitado, tendo características organoléticas do corpo de frutificação de cogumelo. Cada uma delas podia, entretanto, ser distinguida das outras por uma diferença em suas características organoléticas individuais. Essas três linhagens, em meio líquido, apresentavam "esporos secundários", semelhantes aos descritos por KLIGMAN (1942), os quais estariam relacionados com a capacidade dessas culturas de se adaptarem em cultivo submerso. Por haver observado a incapacidade dessas culturas de se desenvolverem no composto para produção comercial de corpo de frutificação, sugeriu serem as mesmas mutantes espontâneas capazes de se desenvolverem apenas na forma micelial em cultura pura.

Estudos quantitativos das exigências nutricionais do micélio de Agaricus campestris foram realizados por HUMFELD e SUGIHARA (1952), em meio sintético contendo 5% de glicose, em cultura submersa. Neste trabalho foram indicadas as concentrações mais adequadas de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, ferro e zinco a serem adicionadas ao meio de cultura, para a máxima produção de micélio com características organoléticas semelhantes às do cogumelo comercializado. Chamou a atenção dos autores a rapidez de assimilação do fósforo, potássio, magnésio e enxofre pelo micélio. Observaram após o primeiro dia de desenvolvimento, que todo o fósforo, adicionado nas concentrações consideradas ideais, foi completamente assimilado pelo micélio, e armazenado para posterior utilização durante o desenvolvimento. No caso do potássio, magnésio e enxofre verificaram que o mesmo não acontecia, desde que ao final do desenvolvimento estes nutrientes foram detectados no meio de cultura em concentrações apreciáveis.

BLOCK e col. (1953), estudando uma mutação espontânea de uma linhagem de Agaricus blazei que diferia da linhagem original pela rapidez de crescimento e pela produção de micélio em cultura submersa, verificaram tratar-se de uma linhagem apresentando "esporos secundários" semelhantes aos descritos por KLIGMAN (1942). Tais esporos germinavam em 48 horas, evoluindo após 72 horas para o que os autores denominaram de "fragmentos de micélio", os quais evoluindo para uma nova hifa contribuíam para uma maior produção de massa micelial, em confronto com a linhagem original. Estudando a utilização de resíduos de citros como substrato para esse mutante, os autores verificaram, preliminarmente, que a água de prensagem de citros não favorecia o desenvolvimento do microrganismo. Entretanto, posteriormente concluíram que substâncias tóxicas formadas durante a armazenagem desse resíduo sob refrigeração, e não uma deficiência em elementos nutricionais do mesmo, eram as responsáveis pela inibição parcial do desenvolvimento. Apesar de não identificarem os fatores tóxicos, conseguiram uma produção satisfatória quando utilizaram aquele substrato diluído. A formação dos fatores tóxicos durante a armazenagem sob refrigeração foi comprovada, quando utilizando água de prensagem recém obtida ou conservada sob congelamento, obtiveram um crescimento da ordem de 18,8 gramas por litro, comparável ao obtido em outros meios de cultura, comumente utilizados, tais como extrato de malte, água de maceração de milho, etc. Com relação à presença de características organolépticas em micélio de cogumelos, os autores consideraram um problema aguardando solução, uma vez que relacionaram o aparecimento dessas características, a precursosres encontrados nos compostos para produção de corpos de frutificação porém ausentes nos meios líquidos para produção de micélio.

Estudando um total de 20 espécies de cogumelos, desenvolvidos em cultura submersa, em meio sintético, SUGIHARA e HUMFELD (1954) observaram que algumas dessas culturas cuja forma de desen-

volvimento era filamentosa, cresciam mais rapidamente do que aquelas que se desenvolviam na forma de aglomerados esféricos de micélio. Os autores observaram também, que apenas nas culturas de desenvolvimento filamentoso ocorria a produção de "esporos secundários", e correlacionaram o rápido crescimento apresentados por essas culturas com a presença desse tipo de esporos, como previamente correlacionado por BLOCK e col. (1953).

HALBINGER (1954) classificou de excelentes os resultados obtidos em seus experimentos, quando utilizou o meio sintético recomendado por HUMFELD e SUGIHARA (1952) para o crescimento de linhagens de Agaricus campestris em cultura submersa. Entretanto, visando o aproveitamento de resíduos de destilarias, tais como vinhaça de sorgo ou de milho, o autor não obteve qualquer desenvolvimento das mesmas linhagens.

SZUECS (1954) patenteou um processo para melhorar as características organolépticas de micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa. Este processo consiste na adição de 2 a 25% (preferivelmente 4%) de cloreto de sódio ao micélio lavado e seco até um conteúdo de 10 a 20% de matéria seca, seguida de posterior armazenagem a 4°C, por 8 dias. O processo foi considerado independente da ação de oxigênio, visto ocorrer tanto em aerobiose como em anaerobiose. As transformações ocorridas foram consideradas de natureza enzimática.

Um processo para produção de micélio de Morchella esculenta, cogumelo não adaptável aos métodos usuais de exploração comercial para obtenção do corpo de frutificação, que possui características organolépticas e de textura superiores àquelas dos cogumelos cultivados comercialmente, foi patenteado por SZUECS (1956). O processo inclui a possibilidade de utilização de fontes de carboidratos tais como melaço de beterraba, melaço de cana, melaço de citros, melaço de madeira e extrato aquoso de alcachofras. Foi sa-

lientada pelo autor a importância da presença de partículas de carbonato ou sulfato de cálcio, as quais ele denominou de "material suporte". Em torno delas o tecido micelial aglomerava-se na forma de esferas. A presença do referido "material suporte" permitiu uma produção de micélio, que ultrapassou em dobro àquela obtida na ausência do mesmo. O autor relatou ainda, a capacidade do micélio de Morchella esculenta de sintetizar as substâncias promotoras de seu próprio crescimento, característica não observada em outros cogumelos. Uma análise do material micelial revelou a presença de vitaminas do complexo B e de ácido fólico.

Estudando o crescimento de 10 culturas de cogumelos, desenvolvidas em meio sintético, meio de melaço de beterraba e meio de licor sulfítico, REUSSER e col. (1958 a) observaram que a composição do micélio foi consideravelmente afetada pela natureza do meio de cultura. O micélio de Tricholoma nudum, por exemplo, desenvolvido em meio sintético apresentou 15% de proteína e 32% de gordura, enquanto que em meio de melaço e em meio de licor sulfítico apresentou para proteína e gordura teores de 54,4 e 38,7%, e 1,8 e 3,9%, respectivamente. As culturas que apresentaram os mais altos teores protéicos no meio de melaço, não produziram os maiores pesos de micélio e nem foram capazes de uma alta utilização de açúcares. Relataram os autores que altas concentrações de nitrogênio favoreceram a síntese de proteínas, enquanto que as mais baixas induziram à formação de gorduras. Salientaram ainda, que todas as culturas utilizaram-se da fração "não açúcar" do licor sulfítico, mais notadamente, o Boletus indecisus.

Posteriormente, os mesmos autores (1958 b), estudaram mais detalhadamente a influência de vários fatores sobre o crescimento, rendimento em proteína e valor nutritivo do micélio de Tricholoma nudum. Observando a influência das várias fontes de carbono na produção de micélio relacionaram piruvato, xilana, sacarose, maltose, manose, rafinose, etc., em ordem decrescente de eficiên-

cia. Consideraram digno de menção o fato de substâncias normalmente presentes em hidrolizados de lignina não serem utilizadas pelo microrganismo, embora o corpo de frutificação de Tricholoma nudum seja normalmente encontrado em madeira em decomposição. Entre as fontes de nitrogênio estudadas, o tartarato de amônio mostrou-se a mais satisfatória, enquanto que nitratos e uréia causaram um decréscimo no conteúdo de proteína no micélio, alterando também sua morfologia. Com relação à concentração de fósforo e aos níveis de aeração estudados, verificaram que esses fatores tiveram efeito mínimo sobre a produção de micélio. A faixa ideal de pH foi situada pelos autores entre 3,5 e 4,5. Os conteúdos em aminoácidos da proteína micelial produzida em licor sulfítico e em melão de beterraba mostraram-se equivalentes àqueles da levedura alimentar, exceto o de triptofano, que se apresentou em concentrações consideravelmente mais elevadas na proteína micelial. Os autores relataram um nível de vitamina B no micélio de Tricholoma nudum, suficiente para substituir a fonte dessa vitamina na ração sintética de ratos, quando empregado na concentração de 5%.

Um processo para produção de micélio de Agaricus campestris, como substituto de seu corpo de frutificação, utilizando meio de cultura constituído de sais minerais, de xarope de milho como única fonte de carbono ou como fonte parcial do mesmo, e extrato de levedura ou água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, foi patenteado por SZUECS (1958). Constam ainda da patente sugestões para o uso de outras espécies de Agaricus e outros gêneros de cogumelos. Para a obtenção de micélio na forma desejada de aglomerados esféricos o autor indicou novamente o emprego de sais de cálcio e de fósforo no meio de cultura, como "material suporte". O emprego de outras substâncias também foi indicado para a mesma finalidade. A utilização de lecitina, e óleos e gorduras comestíveis, segundo o autor, realçariam no micélio, as mesmas características de aroma e sabor encontradas no cogumelo comercializado. O

consumo do micélio ao natural, sua liofilização e utilização na composição de sopas ou molhos foram sugeridas no trabalho, assim como a obtenção e utilização da essência de cogumelo, a partir do micélio.

Particularmente interessado no desenvolvimento de micélio com características organoléticas encontradas no cogumelo comercializado, EDDY (1959) observou que entre 10 culturas de cogumelos cultivadas na forma de micélio, tanto em cultura submersa, como estacionária, 9 foram incapazes de apresentar aquelas características. Somente Coprinus comatus, cultivado durante 3 semanas em cultura estacionária em meio contendo fonte complexa de nitrogênio, apresentou um forte e típico odor de cogumelo, o qual persistia mesmo após liofilização. Seus resultados discordam dos relatados por HUMFELD e SUGIHARA (1949) e SZUECS (1954), pois usando os mesmos microrganismos e idênticas condições de trabalho aplicadas por estes autores, não obteve no micélio as características organoléticas que afirmaram ter conseguido. Procurando comprovar sugestões que lhe ocorreram para explicar a formação de características organoléticas em Coprinus comatus, não alcançou resultados que considerasse satisfatórios. Preferiu considerar que o desenvolvimento dessas características estaria, de alguma forma, ligado com a produção do corpo de frutificação e que a solução deste problema só se concretizará quando, identificadas as substâncias responsáveis por tais características, e condições de cultura forem estabelecidas para que as mesmas apareçam no micélio. Até que isso seja conseguido, considerou a potencialidade do uso de micélio de cogumelo apenas como fonte de proteína de excelente qualidade. Embora tenha conseguido micélio de Coprinus comatus com odor característico de cogumelo, concluiu que a sua produção industrial seria de elevado custo, não só devido à especificidade do meio de cultura, como também à baixa produção de massa micelial.

Com vistas ao problema de descarte de licor sulfítico, resíduo das indústrias de celulose, CIRILLO e col. (1960) idealizaram um processo no qual micélio de cogumelo podia ser produzido em cultura submersa. Neste processo o referido resíduo é utilizado como substrato, tendo como tratamento prévio, apenas a eliminação do dióxido de enxofre, o que é considerado vantajoso em confronto com o tratamento a que é necessário se submeter o resíduo para a produção de levedura e álcool. Outras vantagens, reivindicadas pelos autores consistem, na possibilidade da utilização do licor sulfítico sem a necessidade de uma completa esterilização, na possibilidade da recuperação rápida do micélio de cogumelo no meio de cultura, e na sua fácil secagem. As condições ideais de crescimento do micélio estabelecidas pelos autores ensejaram a possibilidade de uma fermentação contínua. A ausência de características organolépticas no micélio obtido foi considerada como vantajosa, uma vez que a suplementação de outros alimentos com este material não resultaria em alterações de características de sabor e aroma. De nove espécies de cogumelos estudadas, Tricholoma nudum, Collybia velutipes, Agaricus blazei, e Lepiota naucina foram as que se mostraram capazes de desenvolvimento, sobressaindo-se as duas primeiras. Os autores afirmaram haver determinado um conteúdo de 53,8% de proteína de boa qualidade, em massa micelial obtida à razão de 11 g/l de substrato após 8 horas de desenvolvimento, em fermentação cujo inóculo foi obtido a partir de um fragmento do corpo de frutificação.

O processo para produção comercial de Morchella em meio de cultura líquida, aerado, patenteado por SZUECS (1956) dirigiu o interesse de GILBERT (1960) ao estudo comparativo das características de nove diferentes espécies de Morchella e várias linhagens dessas espécies, debaixo das mesmas condições de cultura. O autor relatou várias diferenças concernentes à velocidade e temperatura ideal para o crescimento, forma de desenvolvimento, coloração do

micélio, coloração do líquido sobrenadante, características organoléticas e sua intensidade. O confronto entre a linhagem usada por SZUECS (1956), presumivelmente uma Morchella hortensis e a linhagem de Morchella hortensis estudada neste trabalho não revelou nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento de características organoléticas, a forma do micélio e a velocidade de crescimento. Diferenças de capacidade de produção de massa micelial entre as morchelas, foram relacionadas às espécies e linhagens e à composição do meio de cultura. As características organoléticas do corpo de frutificação sempre presentes no micélio obtido por cultura submersa, segundo sugestão do autor, seriam geneticamente controladas em morchelas, sendo presentes em intensidade variável no micélio de todas as espécies e linhagens, independentemente do meio de cultura usado para o desenvolvimento. Os resultados apresentados neste trabalho em relação à produção de massa micelial, foram ligeiramente desfavoráveis quando confrontados com os obtidos por SUGIHARA e HUMFELD (1954) e EDDY (1958). A ausência de esporos secundários, revelados no cultivo de micélio de outros cogumelos, os quais foram considerados por outros autores (BLOCK e col, 1953; SUGIHARA e HUMFELD, 1954) como responsáveis por aumento de massa micelial, foi apresentada pelo autor como vantajosa em Morchella hortensis por permitir homogeneidade do produto final.

Para diminuir a duração da fase inicial de crescimento, que no meio sintético de HUMFELD e SUGIHARA (1952) era de 4 a 5 dias, MOUSTAFA (1960) dirigiu sua pesquisa para o uso de meios de cultura naturais no desenvolvimento de micélio de Agaricus campestris. Os resultados obtidos com a utilização de melação de cana como meio de cultura, revelaram sua ineficácia na diminuição da referida fase. Paralelamente, a ausência de características organoléticas desejáveis, associada ao desenvolvimento de uma coloração inconveniente no micélio, não o recomendava como substrato adequado. Mesmo a suplementação de melação com extrato de levedura, ou

xarope de malte, capaz de aumentar a produção micelial significativamente, com desenvolvimento de características organolépticas, não permitiu a pretendida diminuição da fase inicial de crescimento. Num ensaio no qual Agaricus campestris foi desenvolvido em meio de malte suplementado com extrato de levedura e glucose, o crescimento inicial pôde ser reduzido para 36 horas, porém com prejuízo da produção de micélio. Deduzindo ser, a pouca produção de micélio, resultado de um desbalanceamento de nutrientes no meio, estudou a relação C:N, concluindo que quando esta era de 19:1 e 29:1, um crescimento substancial era obtido dentro de 24 e 48 horas, respectivamente, quando a concentração de açúcar no meio se situava entre 2 e 2,5%.

Atentando para o importante problema industrial do descarte de vinhaças, resultantes dos processos fermentativos para produção de aguardente e de álcool de melaço, FALANGHE (1962) investigou a adequacidade de vinhaça de aguardente para produção, em cultura submersa, de micélio de cogumelo como fonte potencial de proteína e gorduras. Estudando dez culturas de cogumelos, verificou que Agaricus campestris atingia seu maior crescimento micelial, após 288 horas de desenvolvimento, quando então, seu conteúdo de proteína era máximo (44,5%) e seu conteúdo em gordura era mínimo (8,5%). Boletus indecisis e Tricholoma nudum mostraram um peso de micélio mais elevado, em confronto com Agaricus campestris, porém com conteúdo protéico mais baixo. O conteúdo em gordura do micélio dos três microrganismos mostrou-se comparável. A produção de proteína de Boletus indecisis foi semelhante a de Agaricus campestris, pois, embora o conteúdo em proteína do micélio daquele microrganismo fosse a metade do conteúdo deste último, sua massa micelial foi duas vezes maior. Os demais microrganismos foram incapazes de crescer em vinhaça mesmo quando esta era diluída de um litro a um litro e meio com água. Agaricus campestris, Boletus indecisis e Tricholoma nudum foram capazes de maior produção de micélio.

lio do que aquela relatada por REUSSER e col. (1958 a) em meio contendo melaço de beterraba ou licor sulfítico. Tanto Agaricus campestris como Boletus indecisis foram capazes de crescer nas mais variadas concentrações de vinhaça, produzindo maior massa micelial nas concentrações mais elevadas. A capacidade desses dois microrganismos de utilizar a fração "não açúcar" em lugar dos carboidratos, quando estes se apresentavam em baixas concentrações do meio, foi observada pelo autor. Boletus indecisis e Agaricus campestris foram facilmente separados do meio, na forma de aglomerados esféricos de micélio, por filtração, enquanto que Tricholoma nudum foi de difícil separação por este processo, em virtude da forma filamentosa de seu micélio. A capacidade adaptativa do Agaricus campestris à vinhaça foi demonstrada, desde que o organismo adaptado alcançou em 96 horas um desenvolvimento somente alcançado em 192 horas quando não adaptado.

Crescimento de micélio, em cultura submersa, de Morchella hortensis, Morchella crassipes e Morchella esculenta foi investigado por LITCHFIELD e col. (1963) em meio de água de maceração de milho-fosfato de amônio, contendo glucose, maltose ou lactose. Em meio contendo glucose ou maltose, os três microrganismos produziram rendimentos de micélio comparáveis. Os rendimentos com Morchella hortensis e Morchella crassipes em meio contendo lactose foram semelhantes àqueles obtidos em meio de glucose ou maltose, enquanto o rendimento obtido com Morchella esculenta nesse mesmo meio foi inferior à metade daquele obtido em meio contendo glucose ou maltose. Estudando o efeito do pH, relação C:N e aeração no crescimento de Morchella hortensis, verificaram que o maior rendimento apresentado por esse microrganismo, em meio contendo glucose, era obtido com uma relação C:N de 5:1 e 10:1, um pH entre 5,5 e 6,5 e uma aeração de 0,08 micromoles de oxigênio por litro por minuto. Concluíram, finalmente, que a produção de micélio de Morchella hortensis a partir de resíduos industriais, contendo glucose, mal-

tose ou lactose merecem estudos posteriores.

Um produto denominado pelo "Food and Drug Administration" dos Estados Unidos como "Substância aromatizante em pó de cogumelo morchela", constituído de micélio de Morchella pulverizado, produzido em cultura submersa em fermentadores de aço inoxidável, tem sido comercializado nos Estados Unidos, segundo relato de KLIS (1963). Este produto é utilizado como base aromatizante em sopas, molhos desidratados, em refeições pré-preparadas de macarrão e arroz, em alimentos congelados, e em culinária doméstica. Restrição é feita apenas para alimentos processados industrialmente, devido à perda das características organoléticas do produto sob ação do calor envolvido no processo de esterilização. As características organoléticas obtidas pela adição desse produto são semelhantes àqueles das sopas de creme de cogumelos, reconhecidas pelo consumidor americano como o verdadeiro sabor e aroma de cogumelo.

Considerando a impraticabilidade econômica da recuperação dos sólidos contidos em soro de soja, resíduo das indústrias produtoras de proteína isolada de soja, e o conseqüente agravamento do problema de poluição acarretado pelo seu descarte nos cursos de água, PALANGHE e col. (1964) estudaram a utilização deste resíduo como substrato para produção de micélio de cogumelos, analisando comparativamente seus crescimentos, conteúdo em proteína e capacidade fermentativa. Das sete espécies de cogumelos inoculadas em vários meios de soro de soja, Tricholoma nudum e Boletus indecisis apresentaram o maior crescimento de micélio, maior produção de proteína e a maior utilização de sólidos do soro de soja no menor tempo de desenvolvimento. Micélio de Tricholoma nudum na forma não usual de aglomerados esféricos de 5 a 8 milímetros de diâmetro foi obtido pela utilização de acetato de amônio como fonte de nitrogênio. A adição de mais de 1% de glucose ao meio de soro de soja de terminou um decréscimo na produção e no conteúdo de proteína do micélio de Tricholoma nudum, enquanto que pela adição de 3% de gluco

se, Boletus indecicus dobrou sua capacidade de produção de proteína micelial. Observaram os autores que a adição ao meio de soro de soja, de ferro, enxofre e zinco conjuntamente, não determinou alteração no crescimento de Tricholoma nudum quando a fonte de nitrogênio adicionada ao meio foi tartarato de amônio. Entretanto, verificaram uma completa inibição do crescimento desse microrganismo quando estes elementos eram adicionados ao meio contendo acetato de amônio como fonte de nitrogênio. Efeitos da adição de fósforo, potássio e magnésio ao meio de soro de soja contendo acetato de amônio foram também relatados pelos autores. Utilizando soro de soja concentrado a 50% os autores obtiveram o dobro de crescimento micelial de Tricholoma nudum, entretanto com conteúdo de proteína ligeiramente diminuído. Nas mesmas condições o crescimento micelial e a produção de proteína de Boletus indecicus foram aumentadas substancialmente. A produção de 4 a 6 gramas de proteína micelial por litro de meio de soro de soja obtida em seu trabalho permitiram aos autores considerar este processo de viabilidade econômica, como alternativa para o descarte de soro de soja associado a uma produção de produto de elevado conteúdo protéico.

Pesquisas realizadas por IMPENS (1968) a fim de estudar o efeito de compostos intermediários da reação de Maillard (interação de glucose e aminoácidos, por ação de calor) e de substâncias de coloração marrom produzidas por interação de glucose e amoníaco debaixo desta mesma ação, sobre o crescimento de cogumelos na forma micelial, revelaram que estas substâncias não são de forma alguma inócuas ao crescimento micelial. Concluíram que dependendo das condições de aquecimento aplicadas ao meio de cultura, do microrganismo e de sua linhagem, estas substâncias poderão exercer efeitos variáveis, desde estímulo até inibição do desenvolvimento do micélio. Os resultados revelados por este autor colocaram em evidência a importância das condições de esterilização do meio de cultura para o crescimento de micélio de cogumelo.

Os requerimentos nutricionais de micélio de Pleurotus flabelatus, cujo corpo de frutificação é consumido na Índia, foram investigados por SRIVASTAVA e BANO (1970). Verificaram que, entre várias fontes de carbono, manose, frutose e glucose permitiram maior rendimento de micélio. Em meio contendo 5% de glucose foram obtidas 13 gramas de micélio com 19,4% de proteína, por litro. Entre várias fontes de nitrogênio utilizadas, citrato de amônio permitiu o maior rendimento em massa micelial quando utilizado na concentração de 2 gramas por litro do meio de cultura. Acima dessa concentração, a produção de micélio decresceu, mas o conteúdo de proteína aumentou. Os níveis ideais de concentração de cálcio, potássio e magnésio no meio de cultura foram determinados. A faixa ideal de pH, para o crescimento do micélio, situou-se, segundo os autores, dentro dos limites de 4,5 a 7,5.

Estudando o crescimento de micélio de Morchella sp. em caldo de nabo, de folhas de couve-flor, ou de repolho, JANARDHANAN e col. (1970) verificaram que de 9 fontes de nitrogênio utilizadas, cloreto de amônio permitiu o melhor rendimento em massa micelial. O micélio obtido, no meio contendo caldo de folhas de couve-flor, apresentou um conteúdo de 26,25% de proteína, 8,94% de gordura e 5,36% de cinzas. Uma concentração de 5% de glucose no meio de cultura proporcionou o maior desenvolvimento de micélio, com características organolépticas semelhantes às do corpo de frutificação do microrganismo.

3. MATERIAL

3.1. Microrganismos

Foram utilizados neste trabalho sete espécies de cogumelos, Collybia velutipes 1865, Tricholoma nudum 1866, Boletus indecisus 1867, Morchella hibrida 1869, Agaricus campestris 1873, Cantharellus cibarius 1874 e Pleurotus ostreatus 1950, obtidas da coleção do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida", do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP. Estas culturas foram mantidas por transferências periódicas, em meio de malte agar, à temperatura ambiente.

3.2. Meios de cultura para o desenvolvimento do micélio

Na composição dos meios de cultura usados neste trabalho utilizou-se vinhaça proveniente da fabricação de álcool de milho, centrifugada, tendo 0,93% de carboidratos totais; 0,15% de açúcares redutores; 0,1% de nitrogênio; 0,008% de fósforo; 0,001% de magnésio; 0,68% de polióis, e respectivamente 0,14%; 0,05% e 0,9% de ácidos acético, succínico e láctico; e pH de 3,8.

O meio de cultura usado para a seleção dos microrganismos constituiu-se apenas de vinhaça ajustada a pH 5,0.

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho tiveram seu pH ajustado para 5,0 com hidróxido de sódio a 70%, e foram sempre esterilizados sob pressão a 121°C, por 15 minutos.

3.2.1. Efeito de nitrogênio, fósforo e magnésio

Aos meios de cultura, utilizados na determinação das concentrações ideais de nitrogênio, fósforo e magnésio, foram adicionados, respectivamente, conforme o elemento, sulfato de amônio, sulfato de potássio monobásico ou sulfato de magnésio heptaidratado, em quantidades que permitiram suprir 1.000, 1.500 e 2.000 miligramas de nitrogênio por litro, nos meios para estudo da influência de nitrogênio; 80, 100, 150 e 200 miligramas de fósforo por litro, nos meios destinados ao estudo da influência de fósforo; 10, 25, 50 e 100 miligramas de magnésio por litro, nos meios destinados ao estudo da influência de magnésio. A concentração de 1.500 miligramas de nitrogênio foi utilizada nos meios para o estudo da influência de fósforo e as concentrações de 1.500 miligramas de nitrogênio e 100 miligramas de fósforo foram utilizadas nos meios para o estudo da influência de magnésio.

3.2.2. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio

As diferentes fontes de nitrogênio estudadas foram: cloreto de amônio, nitrato de sódio, uréia e sulfato de amônio. Para a composição de cada um dos meios de cultura, à vinhaça ajustada para 100 miligramas de fósforo por litro, e contendo 10 miligramas de magnésio por litro, foram adicionados os referidos sais em quantidades suficientes para obtenção de 1.500 miligramas de nitrogênio por litro.

3.2.3. Efeito da concentração e da diluição da vinhaça

A variação da produção de micélio foi estudada usando-se os meios de cultura de vinhaça concentrada, que resultaram nas seguintes composições:

Vinhaça concentrada de 1,5:1

Carboidratos totais	1,43%
Açúcares redutores	0,24%
Nitrogênio	1.500 mg/l
Fósforo	120 mg/l
Magnésio	15 mg/l

Vinhaça concentrada de 1,25:1

Carboidratos totais	1,20%
Açúcares redutores	0,18%
Nitrogênio	1.250 mg/l
Fósforo	100 mg/l
Magnésio	12,5 mg/l

A variação da produção de micélio foi também estudada, usando-se meios de cultura de vinhaça diluída com água destilada, ajustados às concentrações de 1.500, 100 e 10 miligramas de nitrogênio, fósforo e magnésio, respectivamente, com sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de magnésio heptaidratado. Estes meios resultaram nas seguintes concentrações de carboidratos e açúcares redutores:

Vinhaça diluída de 1:1,5

Carboidratos totais	0,60%
Açúcares redutores	0,09%

Vinhaça diluída de 1:1,25

Carboidratos totais	0,76%
Açúcares redutores	0,11%

3.2.4. Meios de cultura padrão

A avaliação da produção de micélio em meios de vinhaça concentrada e vinhaça diluída foi feita por comparação com a produção de micélio obtida no seguinte meio padrão:

Carboidratos totais	0,93%
Açúcares redutores	0,15%
Nitrogênio	1.500 mg/l
Fósforo	100 mg/l
Magnésio	10 mg/l

• Este mesmo meio de cultura foi também utilizado na verificação do efeito do inóculo desenvolvido em vinhaça; na verificação do consumo de álcoois polihídricos; na determinação da demanda bioquímica de oxigênio; na produção de micélio para a verificação do seu conteúdo em aminoácidos e gorduras e na observação da ocorrência de esporos secundários.

4. MÉTODOS

4.1. Produção de micélio

Os inóculos para produção de micélio foram obtidos pela transferência de porções das culturas mantidas em meio de malte agar, para 40 ml de meio de extrato de malte a 5% contidos em frascos Erlenmeyers de 250 ml de capacidade, de boca esmerilhada, juntamente com pérolas de vidro. Os frascos foram incubados, sem agitação, a 28-30°C por 10 dias. Após o crescimento, desprezou-se o líquido residual, e o micélio foi lavado por 3 vezes com porções de 100 ml de água destilada e esterilizada. A seguir, os tampões de algodão foram substituídos por tampas de vidro esmerilhadas e o micélio, suspenso em 40 ml de água destilada e esterilizada, foi fragmentado por ação das pérolas de vidro, sob agitação manual.

Dois mililitros da suspensão resultante, os quais continham de 7 a 9 miligramas de matéria seca, foram utilizados para inocular 200 ml de meios de desenvolvimento contidos em frascos Erlenmeyers de 500 ml. Este procedimento foi usado em todos os experimentos, exceto em um, no qual serviu como inóculo uma cultura produzida em meio de desenvolvimento durante 7 dias sob agitação. Neste caso o mesmo volume de inóculo continha de 10 a 12 miligramas de matéria seca. Em seguida os frascos foram colocados em agitador rotatório de excentricidade de 2,54 cm, desenvolvendo 170 rotações por minuto, à temperatura de 28-30°C. As amostras para análise foram coletadas a intervalos de 5, 7 e 9 dias ou ainda de acordo com a necessidade de cada experimento.

A observação da ocorrência de esporos secundários foi feita nas culturas desenvolvidas por 10 dias, em meio de malte sem agitação, e no meio de cultura padrão, após 24, 48 e 72 horas, sob agitação.

4.2. Métodos Analíticos

Após coleta das amostras o micélio foi separado em papel, por filtração a vácuo, lavado com água destilada e seu peso determinado após secagem por 24 horas, a 60°C sob vácuo.

Triptofano foi determinado no micélio pelo método colorimétrico de OPIENSKA-BLAUTH (1963) após hidrólise alcalina (CLARK, 1964). Os demais aminoácidos foram determinados qualitativamente pela reação com nihidrina em analisador Beckman, modelo 120 C.

A estimativa dos lipídios do micélio foi feita gravimetricamente, após extração em Soxhlet com éter etílico, por 16 horas, e seus ácidos graxos foram determinados qualitativa e quantitativamente por cromatografia gasosa (LUDDY e col., 1960).

O nitrogênio total foi sempre determinado pelo método micro-Kjeldahl (BAILEY, 1967). Na avaliação da proteína bruta do micélio utilizou-se o fator 6,25.

Os carboidratos totais (C.T.) foram determinados pelo reagente de antrona (MORRIS, 1948), e os açúcares redutores (A.R.) pelo reagente cúprico alcalino de SOMOGYI (1945) e pelo reagente de arseno-molibdato de NELSON (1944).

Os polióis foram determinados como glicerol, pelo método de LAMBERT e NEISH (1950) e sua identificação foi feita em cromatografia de papel (HOUGH, 1950). O sistema de solventes usado foi fenol-água (4:1 p/v) e os polióis detectados segundo a técnica de TREVELYAN e col. (1950).

Fósforo foi determinado colorimetricamente (CATANI e col., 1959) e magnésio por titulação com etilenodiamina tetra-acetato (GLÓRIA e col., 1965). Antes das determinações de fósforo e magnésio, as amostras foram submetidas ao tratamento sugerido por GLÓRIA e col. (1965).

A demanda bioquímica de oxigênio foi determinada pelo método de WINKLER (1946).

Os ácidos orgânicos foram determinados qualitativa e quantitativamente por cromatografia em coluna de sílica (FARIA, 1968).

Todas as determinações colorimétricas foram precedidas de clarificação, segundo SOMOGYI (1930).

Todos os dados neste trabalho foram expressos como a média de 3 repetições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos microrganismos

O critério adotado na seleção dos microrganismos baseou-se na sua capacidade de desenvolvimento, em cultura submersa, em meio de vinhaça, sem nenhuma suplementação de nutrientes. Das espécies estudadas, relacionadas na Tabela I, apenas Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foram utilizadas nas investigações posteriores, por serem as únicas a apresentar crescimento no referido meio de cultura.

5.2. Efeito da concentração de nitrogênio, fósforo e magnésio no desenvolvimento de micélio de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, em cultura submersa.

Pela observação dos dados constantes na Tabela II, verificou-se que a maior produção de micélio de Agaricus campestris, em cada um dos níveis de nitrogênio estudados, ocorreu aos 7 dias de desenvolvimento. O prosseguimento da fermentação até 9 dias, não contribuiu geralmente para o aumento da referida produção. Embora maiores teores de proteína no micélio tenham ocorrido aos 5 dias de desenvolvimento, para os três níveis de nitrogênio, o menor peso de micélio, verificado a este período de tempo, determinou a menor produção de proteína. O aumento dessa produção só foi alcançado aos 7 dias de desenvolvimento, quando o teor de proteína foi maior que aquele verificado aos 9 dias e quando o peso de micélio

foi maior que o obtido aos 5 dias. Aos 7 dias, portanto, o decréscimo do conteúdo protéico do micélio pode ser compensado pelo aumento da massa micelial. Os dados da Tabela II indicaram, também, que o nível de nitrogênio mais adequado foi 1.500 miligramas de nitrogênio por litro de meio de cultura, quando o teor de proteína do micélio, o consumo de carboidratos totais e de açúcares redutores foram geralmente mais elevados. Além disso, a produção de proteína atingida aos 7 dias de desenvolvimento, nesse nível de nitrogênio não pode ser alcançada nos meios contendo as outras concentrações desse elemento, nem mesmo aos 9 dias de desenvolvimento.

Pela observação dos dados constantes da Tabela III, verificou-se que a maior produção de micélio de Tricholoma nudum, em cada um dos níveis de nitrogênio estudados, ocorreu aos 9 dias de desenvolvimento. Como no caso de Agaricus campestris (Tabela II), também com este microrganismo, os maiores teores de proteína no micélio em cada um dos níveis de nitrogênio ocorridos aos 5 dias de desenvolvimento, não permitiram a maior produção de proteína, devido ao reduzido peso de micélio. A maior produção de proteína, para os níveis de 1.000 e 2.000 miligramas de nitrogênio por litro de meio de cultura, foi obtida somente aos 9 dias de desenvolvimento, quando o maior peso de micélio compensou seu menor teor de proteína. A maior produção de proteína, entretanto, foi alcançada aos 7 dias de desenvolvimento e ao nível de 1.500 miligramas de nitrogênio por litro de meio de cultura. Neste caso, o teor de proteína do micélio não foi acentuadamente reduzido em relação àquele obtido aos 5 dias de desenvolvimento, permitindo assim, que com um menor peso de micélio, o rendimento superasse aquele alcançado aos 9 dias. Neste período de tempo um peso maior de micélio continha um teor protéico menor. A maior adequidade de 1.500 miligramas de nitrogênio por litro de meio de cultura foi ainda suportada pelo fato de que a este nível o microrganismo, geralmente, consome mais carboidratos totais e açúcares redutores.

Os dados constantes da Tabela IV, permitiram observar que aos níveis de 1.500 e 2.000 miligramas de nitrogênio por litro de meio de cultura, o maior peso de micélio de Pleurotus ostreatus foi obtido após 9 dias de desenvolvimento, enquanto que ao nível de 1.000 miligramas, este peso de micélio foi alcançado aos 7 dias de desenvolvimento. Os maiores teores de proteína no micélio foram atingidos, como no caso de Agaricus campestris e Tricholoma nudum (Tabelas II e III), aos 5 dias de desenvolvimento. A observação dos resultados da Tabela IV, permitiram concluir que aos 5 dias de desenvolvimento, a variação dos níveis de nitrogênio, não exerceu influência marcante sobre o conteúdo de proteína do micélio ou sobre a produção de proteína. Nesse mesmo período de tempo e ao nível de 1.500 miligramas de nitrogênio por litro, o microrganismo apresentou o maior consumo de carboidratos totais e açúcares redutores. A influência da variação dos níveis de nitrogênio, definiu-se completamente aos 7 e 9 dias de desenvolvimento, quando os níveis de 1.500 e 2.000 miligramas por litro levaram a uma maior produção de proteína e a um maior consumo de carboidratos totais e açúcares redutores. No caso desse microrganismo, a maior produção de proteína foi obtida aos 7 dias de desenvolvimento para o nível de 1.500 miligramas de nitrogênio por litro de meio de cultura. Nesse período de tempo e a esse nível, um maior peso de micélio em relação ao obtido aos 5 dias de desenvolvimento, compensou um ligeiro decréscimo do conteúdo protéico. O maior peso de micélio, observado aos 9 dias de desenvolvimento, ao nível de 1.500 miligramas de nitrogênio, foi prejudicado por seu menor conteúdo protéico, resultando em uma produção de proteína igual àquela obtida aos 7 dias de desenvolvimento.

Os dados constantes nas Tabelas V, VI e VII, referentes ao efeito da concentração de fósforo sobre o desenvolvimento do micélio de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, permitiram concluir que entre todos os níveis de fósforo

estudados, o de 100 miligramas por litro de meio de cultura foi aquele que permitiu a maior produção de proteína, independentemente do período de tempo de desenvolvimento do micélio. Uma única exceção verificou-se quando, aos 9 dias de desenvolvimento, ao nível de 80 miligramas de fósforo por litro, Pleurotus ostreatus produziu mais proteína que ao nível de 100 miligramas por litro. Ao nível de 100 miligramas de fósforo por litro a maior produção de proteína, proporcionada por todos os três microrganismos, verificou-se aos 7 dias de desenvolvimento. No caso de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, conteúdos de proteína do micélio, ligeiramente maiores que os obtidos aos 5 dias de desenvolvimento, associados a maiores pesos de micélio, permitiram essa maior produção. No caso de Agaricus campestris essa maior produção foi possível apesar do menor conteúdo protéico do seu micélio, porque este microrganismo, a este período de tempo, também apresentou maior peso de micélio, em confronto com o peso obtido aos 5 dias de desenvolvimento. Aos 9 dias de desenvolvimento um mais baixo teor protéico não pôde ser compensado por um mais elevado peso de micélio. Dentro de cada nível de fósforo empregado, o aumento do peso de micélio foi progressivo, considerados os intervalos de tempo de 5, 7 e 9 dias. Como no caso das fermentações precedentes, para determinação do efeito de diferentes níveis de nitrogênio no desenvolvimento do micélio, verificou-se, também, no desenvolvimento desses três microrganismos, em diferentes níveis de fósforo, uma tendência geral de decréscimo do conteúdo protéico com o aumento progressivo do tempo de fermentação.

As Tabelas VIII, IX e X, indicam os resultados referentes ao efeito da concentração de magnésio sobre o desenvolvimento de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

A variação da concentração de magnésio, de 10 até 100 miligramas por litro de meio de cultura, não afetou marcadamente a produção de micélio de Agaricus campestris. Entretanto, no caso

de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, o peso de micélio decresceu acentuadamente com as concentrações de 50 e 100 miligramas de magnésio por litro, em relação à concentração de 10 miligramas por litro. Essas concentrações influíram tão pronunciadamente sobre o desenvolvimento de Pleurotus ostreatus a ponto de retardar o crescimento do micélio. Com o emprego de concentrações maiores que 10 miligramas de magnésio por litro ocorreu um decréscimo do conteúdo protéico do micélio dos três microrganismos, resultando, conseqüentemente, uma menor produção de proteína, principalmente para Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, aos níveis de 50 e 100 miligramas de magnésio por litro. Ao nível de 10 miligramas, os três microrganismos apresentaram a maior produção de proteína aos 7 dias de desenvolvimento. Exceto para Agaricus campestris, cujo consumo de carboidratos totais e de açúcares redutores se mostrou comparável apesar da variação de alguns níveis de magnésio, o consumo desses açúcares decresceu nitidamente com o aumento da concentração de magnésio no meio de cultura.

As altas eficiências em proteína apresentadas por Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus nos ensaios destinados à observação da influência de nitrogênio, fósforo e magnésio (Tabelas II a X), principalmente aos 5 dias de fermentação, comprovaram a utilização pelos microrganismos de uma fração "não açúcar" (Tabelas XV e XVI) juntamente aos carboidratos totais. As menores eficiências geralmente observadas aos 7 e 9 dias de fermentação, foram consequência de um mais elevado consumo de carboidratos, aliado a um menor consumo de "não açúcares", provavelmente em menor disponibilidade no meio de cultura, neste período de tempo. Nos casos em que magnésio estava presente em concentrações de 50 e 100 miligramas por litro de meio, as eficiências obtidas para Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, não devem ser confrontadas, principalmente em relação às obtidas com 10 miligramas de magnésio por litro, porque o desenvolvimento do micélio foi acentuadamente

influenciado por aqueles níveis de magnésio. O consumo de "não açúcares", tal como aqui relatado, foi previamente sugerido por REUSSER e col. (1958 a) no desenvolvimento de Agaricus campestris e Tricholoma nudum em meio de licor sulfítico e por FALANGHE (1962) no desenvolvimento de Agaricus campestris em meio de vinhaça de aguardente.

Pela observação dos dados referentes ao pH, constantes das Tabelas II a X, verificou-se que em consequência do desenvolvimento de qualquer dos três microrganismos estudados, o pH do meio de cultura elevou-se com o decorrer da fermentação, independente dos níveis nos quais nitrogênio, fósforo e magnésio estavam presentes nos meios de cultura.

5.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no desenvolvimento de micélio de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, em cultura submersa.

Observando os resultados da Tabela XI, obtidos pela utilização de cloreto de amônio, nitrato de sódio, uréia e sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, no desenvolvimento desses três microrganismos, verificou-se que a maior produção de proteína foi obtida pela utilização de sulfato de amônio. Embora os maiores pesos de micélio desses microrganismos tivessem sido obtidos com a utilização de uréia, como fonte de nitrogênio, o conteúdo protéico dos mesmos foi sempre menor do que aquele obtido com sulfato de amônio, determinando assim redução na produção de proteína.

No desenvolvimento de Agaricus campestris e Tricholoma nudum as fontes de nitrogênio que proporcionaram um maior consumo

de carboidratos totais e açúcares redutores, foram em ordem decrescente, uréia, sulfato de amônio, nitrato de sódio e cloreto de amônio, enquanto que no desenvolvimento de Pleurotus ostreatus, uréia, também responsável pelo maior consumo de açúcares, foi seguida por cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de sódio.

5.4. Efeito da concentração da diluição da vinhaça na variação da produção de micélio de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

Os dados obtidos (Tabela XII), mostraram que Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus sofreram completa inibição de crescimento em todos os meios contendo vinhaça concentrada. Agaricus campestris, entretanto, embora experimentando a mesma inibição em meios de vinhaça concentrada de 1,5 e 2 litros para 1 litro, demonstrou, face ao desenvolvimento obtido em meio de vinhaça concentrada de 1,25 litros para 1 litro, comparável àquele obtido no meio testemunha, uma menor sensibilidade à variação da composição da vinhaça. Esta observação denotou que Agaricus campestris apresenta uma menor exigência nutricional em relação aos outros dois microrganismos. As inibições de crescimento observadas resultaram provavelmente de um efeito negativo de teores mais elevados de certas substâncias presentes na vinhaça concentrada.

Os dados obtidos na Tabela XIII permitiram observar que o desenvolvimento de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus em meios de vinhaça diluída foi sensivelmente afetado. Quando Tricholoma nudum foi inoculado nos meios de cultura constituídos de vinhaça diluída, mostrou-se incapaz de qualquer desenvolvimento. Pleurotus ostreatus, entretanto; apresentou uma capacidade ligeira

mente maior de superar as deficiências do meio determinadas pela diluição da vinhaça, como revelado pelo seu crescimento no meio contendo vinhaça diluída de 1 para 1,25 litros. Por outro lado, Agaricus campestris não mostrou grande sensibilidade à diminuição da concentração de vinhaça no meio de cultura, como demonstrou a pequena variação dos resultados obtidos nos meios de vinhaça utilizados. Estes resultados comprovaram a menor exigência nutricional de Agaricus campestris em relação aos outros dois microrganismos, relatada anteriormente. O exame dos dados das Tabelas XII e XIII referentes ao consumo de açúcares e as eficiências de produção de proteína de Agaricus campestris, sugeriram que quando o conteúdo de açúcares no meio diminui, o seu consumo decresce e as eficiências se elevam em consequência da maior utilização da fração "não açúcar". Esta observação está de acordo com aquela previamente relatada por FALANGHE (1962), quando desenvolveu Agaricus campestris em meio de vinhaça de aguardente.

5.5. Efeito do inóculo desenvolvido em vinhaça no desenvolvimento de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

A capacidade adaptativa dos três microrganismos ao meio de vinhaça, foi demonstrada (Tabela XIV) quando micélio desenvolvido em meio de vinhaça serviu como inóculo para um novo meio de cultura da mesma composição. A produção de massa micelial e a produção de proteína foram maiores, quando os microrganismos estavam adaptados à vinhaça, assim como o observado com Agaricus campestris desenvolvido em meio de vinhaça de aguardente (FALANGHE, 1962). Nessa mesma tabela, os dados referentes ao consumo de carboidratos

e à eficiência fermentativa possibilitaram verificar que a adaptação de Agaricus campestris permitiu um maior consumo de "não açúcares", e, portanto, maiores eficiências fermentativas. No caso de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, a referida adaptação permitiu um maior consumo de carboidratos totais, e conseqüentemente, de modo geral, menores eficiências fermentativas. Esses resultados comprovaram a menor exigência nutricional de Agaricus campestris, que para atingir consumo máximo de açúcares não necessitou de adaptação.

5.6. Consumo de "não açúcares", presentes no meio de vinhaça, por Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

Os resultados obtidos anteriormente revelando o consumo de "não açúcares" por Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, levaram à tentativa de verificação do consumo, por esses microrganismos, de alguns "não açúcares" identificados no meio de vinhaça.

Os dados constantes da Tabela XV, permitiram verificar que entre os três ácidos orgânicos identificados no meio de vinhaça, ácido acético e ácido succínico foram consumidos em porcentagens mais elevadas pelos três microrganismos, enquanto que ácido láctico foi utilizado em menores proporções. Verificou-se, também, que Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus consumiram muito rapidamente os ácidos acético e succínico, pois aos 5 dias de desenvolvimento as porcentagens de consumo desses ácidos foram já bastante elevadas. O consumo desses dois ácidos por Agaricus campestris mostrou-se entretanto, mais lento. Com relação ao ácido láctico,

Agaricus campestris revelou uma utilização mais rápida que a de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

Várias substâncias, presentes no meio de vinhaça, reagiram como polióis pela técnica cromatográfica empregada, porém apenas eritritol e glicerol puderam ser seguramente identificados. A concentração dos polióis nas amostras das fermentações cujos resultados constam da Tabela XVI, foi, entretanto, calculada como glicerol, pelo método colorimétrico. Pelos dados apresentados nessa tabela verificou-se que um consumo elevado de polióis, pelos três microrganismos, foi alcançada aos 7 dias de fermentação, não sendo praticamente modificado até aos 9 dias. Aos 5 dias, o consumo dos polióis por Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foi aproximadamente metade daquele obtido aos 7 dias, enquanto que o de Agaricus campestris foi aproximadamente quatro vezes maior. Verificou-se, assim, que Agaricus campestris consome polióis mais lentamente que os outros dois microrganismos.

Os dados constantes das Tabelas XV e XVI comprovaram o consumo de "não açúcares" na forma de ácidos orgânicos e polióis, contidos no meio de vinhaça, o que resultou nas altas eficiências fermentativas obtidas nos experimentos anteriores.

5.7. Determinação da demanda bioquímica de oxigênio nos líquidos residuais do desenvolvimento de micélio de cogumelos em meio de vinhaça.

Os resultados da Tabela XVII demonstraram substanciais reduções na demanda bioquímica de oxigênio dos líquidos residuais do desenvolvimento de micélio de Agaricus campestris, Tricholoma nudum

e Pleurotus ostreatus em meio de vinhaça, principalmente a partir do sétimo dia de desenvolvimento. Após 5 e 7 dias de desenvolvimento de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus as reduções da demanda bioquímica de oxigênio foram comparáveis entre si e maiores que a determinada pelo desenvolvimento de Agaricus campestris. Aos 9 dias de desenvolvimento, as reduções determinadas por Agaricus campestris e Tricholoma nudum tornaram-se iguais e cerca de 50% menores que a determinada por Pleurotus ostreatus. Essas consideráveis reduções da demanda bioquímica de oxigênio se associadas a um processo de viabilidade econômica poderiam se constituir numa alternativa para aliviar o problema de poluição determinado pelo eventual descarte de vinhaça de milho, nos cursos de água.

5.8. Aminoácidos dos micélios de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

O confronto do conteúdo em aminoácidos dos micélios de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, com o padrão estabelecido pela FAO (1957) como "proteína ideal" é apresentado na Tabela XVIII. Os micélios de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus apresentaram conteúdos de fenilalanina, leucina, lisina, treonina, triptofano e tirosina equivalentes ou que excederam os valores sugeridos no padrão da FAO, enquanto que o micélio de Agaricus campestris apresentou-se nesse confronto com teores mais baixos de triptofano e tirosina. Os teores de valina, metionina e isoleucina nos micélios dos três microrganismos foram inferiores àqueles recomendados pela FAO. Portanto, os micélios de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foram aqueles cujos conteúdos em aminoácidos se aproximaram daquele recomendado pela FAO,

enquanto que o micélio de Agaricus campestris comparou-se menos favoravelmente com aquele padrão.

5.9. Conteúdo de gorduras e dos seus ácidos graxos no micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa.

A estimativa gravimétrica das gorduras dos micélios de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, revelou respectivamente os teores de 6,51; 7,53 e 6,71%. O confronto dos teores de gorduras desses micélios confirmaram a observação previamente feita por REUSSER e col. (1958 a, 1958 b) de que o teor de gordura do micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa varia em função de microrganismo e do meio de cultura utilizado. A Tabela XIX apresenta uma análise da fração lipídica dos micélios dos cogumelos estudados. Seus dados revelaram que o conteúdo de ácidos graxos insaturados, nessa fração, são consideravelmente maiores que os de ácidos graxos saturados. Um conteúdo destacadamente maior de ácidos palmíticos, olêico e linolêico em relação aos demais ácidos graxos identificados, foi revelado nessa análise.

5.10. Ocorrência de esporos secundários nas culturas dos microrganismos.

Exames microscópicos realizados nas culturas de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, desenvolvidas em meio de malte e meio de vinhaça, mostraram a ocorrência de esporos secundários, que evoluindo para os denominados "fragmentos de micélio" (BLOCK e

col., 1953) formaram massa micelial filamentosa. Por outro lado, a linhagem de Agaricus campestris não produziu o referido tipo de esporos, e desenvolveu-se na forma de aglomerados esféricos de micélio. Os microrganismos que produziram esporos secundários apresentaram os mais rápidos crescimentos e os maiores pesos de micélio, como observado por BLOCK e col. (1953) e por SUGIHARA e HUMFELD (1954), entretanto sua separação do meio de cultura, por filtração, foi mais difícil que a de Agaricus campestris.

5.11. Produção de micélio e proteína por cogumelos desenvolvidos em cultura submersa.

Os resultados constantes na Tabela XX permitiram observar que no presente trabalho a maior produção de micélio e proteína foi obtida com Pleurotus ostreatus, seguido por Tricholoma nudum e Agaricus campestris. Confrontando esses resultados com aqueles obtidos com outros microrganismos em vários meios de cultura, relacionados na mesma tabela, observou-se que a produção de proteína por Pleurotus ostreatus, Tricholoma nudum e Agaricus campestris, desenvolvidos em vinhaça de milho, mostrou-se geralmente comparável ou maior que as obtidas por outros autores, exceto no caso de Agaricus blazei, desenvolvido em água de maceração de milho; Boletus indecisus, em vinhaça de aguardente; Tricholoma nudum, em licor sulfítico; Agaricus campestris e Morchella hybrida, em melão de beterraba. Observou-se ainda, pelos dados da Tabela XX, uma grande variação de pesos de micélio e proteína, tanto em função dos microrganismos, como em função dos substratos utilizados.

Tabela I - Espécies de cogumelos testadas em meio de vinhaça.

<u>Microrganismo</u>	<u>Crescimento</u>
<u>Collybia velutipes</u>	-
<u>Tricholoma nudum</u>	+
<u>Boletus indecisus</u>	-
<u>Morchella hybrida</u>	-
<u>Agaricus campestris</u>	+
<u>Cantharellus cibarius</u>	-
<u>Pleurotus ostreatus</u>	+

Período de desenvolvimento: 7 dias.

Tabela II - Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento e composição e composição do micélio de

Agaricus campestris

Nitrogênio (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
1.000	5	2,99	53,49	1,60	34,66	12,90	6,32	133,27	17,19
1.500	5	3,06	54,81	1,68	41,33	15,05	6,29	119,79	18,03
2.000	5	2,08	54,06	1,12	30,00	3,22	6,23	374,81	12,09
1.000	7	5,99	43,71	2,62	36,66	20,43	7,25	137,80	28,15
1.500	7	6,00	48,45	2,91	48,00	24,73	6,91	126,39	31,25
2.000	7	5,54	49,60	2,75	34,00	18,27	6,40	161,63	29,56
1.000	9	5,75	40,32	2,32	38,66	21,29	8,09	117,09	24,92
1.500	9	5,66	43,74	2,47	48,66	25,16	7,91	105,80	26,62
2.000	9	5,70	42,57	2,43	34,66	25,16	7,76	122,55	26,09

* Expressa como grammas de proteína/100 grammas de carboidratos totais.

Tabela III - Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento e composição do micélio de

Tricholoma nudum

Nitrogênio (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
1.000	5	4,71	53,83	2,54	53,40	24,50	6,71	111,40	27,31
1.500	5	5,74	52,47	3,01	60,00	31,10	5,63	104,15	31,07
2.000	5	4,79	42,62	2,04	55,33	26,43	5,09	82,92	21,93
1.000	7	5,72	46,37	2,65	66,93	47,15	7,64	54,75	28,49
1.500	7	7,34	53,28	3,91	78,45	58,67	5,80	71,61	42,04
2.000	7	6,98	38,95	2,72	69,33	49,55	5,64	59,00	29,24
1.000	9	6,52	41,47	2,70	70,00	53,42	7,85	54,32	29,03
1.500	9	8,32	43,43	3,61	76,00	59,42	7,66	65,28	38,82
2.000	9	8,00	38,31	3,06	74,00	57,42	6,23	57,30	32,90

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela IV - Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento e composição do micélio de

Pleurotus ostreatus

Nitrogênio (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
1.000	5	5,02	55,64	2,79	12,66	13,33	6,55	225,25	30,03
1.500	5	5,07	54,18	2,75	25,33	15,48	5,70	190,76	29,54
2.000	5	5,05	54,57	2,76	11,13	7,63	5,48	388,14	29,63
1.000	7	5,59	45,39	2,54	72,66	67,53	7,57	40,40	27,28
1.500	7	6,19	53,98	3,34	76,66	70,64	5,59	50,43	35,62
2.000	7	6,00	54,19	3,25	74,66	69,46	5,43	50,22	36,07
1.000	9	5,32	40,33	2,15	75,35	69,03	7,63	33,42	23,07
1.500	9	7,68	43,47	3,34	80,66	79,78	7,66	45,20	35,90
2.000	9	7,24	45,53	3,30	89,33	80,97	7,48	43,78	35,44

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela V - Efeito da concentração de fósforo no crescimento e composição do micélio de

Agaricus campestris

Fósforo (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
80	5	2,91	54,75	1,59	40,00	7,42	6,74	230,09	17,13
100	5	4,57	54,69	2,50	43,33	16,77	6,77	160,21	26,87
150	5	4,62	53,06	2,45	46,67	20,54	6,63	128,34	26,36
200	5	4,28	51,13	2,19	43,33	9,89	6,57	237,87	23,53
80	7	5,71	48,44	2,77	46,00	18,92	7,61	157,15	29,74
100	7	6,18	48,56	3,00	49,33	22,26	7,78	144,97	32,27
150	7	5,66	45,38	2,57	48,67	23,55	7,87	117,28	27,62
200	7	5,70	42,13	2,40	45,33	23,12	8,16	111,69	25,82
80	9	5,88	43,44	2,55	52,00	24,41	7,90	112,52	27,03
100	9	6,44	42,50	2,74	55,33	31,12	8,08	94,38	29,43
150	9	6,11	39,88	2,44	52,67	23,98	8,02	109,27	26,20
200	9	5,94	39,56	2,35	50,67	26,88	8,12	93,99	25,27

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela VI - Efeito da concentração de fósforo no crescimento e composição do micélio de

Tricholoma nudum

Fósforo (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
80	5	5,73	52,50	3,01	58,00	24,62	5,44	131,36	32,34
100	5	5,99	53,00	3,17	59,33	30,43	5,70	112,01	34,08
150	5	4,13	50,69	2,09	51,33	20,97	5,15	107,35	22,51
200	5	3,52	51,00	1,79	43,33	18,92	6,00	102,00	19,30
80	7	7,27	52,44	3,81	75,33	51,93	5,76	78,93	40,99
100	7	7,57	53,56	4,05	78,00	54,84	5,85	79,50	43,60
150	7	6,55	49,13	3,22	72,67	49,14	7,62	70,42	34,60
200	7	6,57	49,19	3,23	73,15	46,99	8,29	73,95	34,75
80	9	7,70	41,44	3,19	76,00	54,41	7,29	63,06	34,31
100	9	7,95	45,60	3,62	76,67	60,21	7,80	64,64	38,92
150	9	7,27	44,13	3,21	75,33	54,84	7,80	62,91	34,50
200	9	7,08	43,31	3,06	73,34	52,37	8,16	62,96	32,97

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela VII - Efeito da concentração de fósforo no crescimento e composição do micélio de Pleurotus ostreatus

Fósforo (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
80	5	5,10	54,13	2,76	23,33	17,53	5,54	173,00	31,30
100	5	6,36	54,13	3,44	39,33	30,32	5,69	122,07	37,02
150	5	5,75	53,94	3,10	28,67	29,03	6,63	114,87	33,35
200	5	5,54	53,25	2,95	23,33	27,42	5,59	115,68	31,72
80	7	6,31	54,00	3,41	69,33	25,38	6,05	72,65	36,64
100	7	7,12	54,19	3,86	74,21	50,43	6,43	82,26	41,49
150	7	6,42	54,06	3,47	73,00	40,64	7,31	106,41	37,32
200	7	6,42	53,31	3,42	73,61	38,17	7,53	96,03	36,80
80	9	7,98	41,50	3,31	78,00	54,62	7,03	65,19	35,61
100	9	8,18	40,19	3,29	80,67	64,09	7,25	55,16	35,04
150	9	7,93	39,81	3,16	79,33	60,43	7,36	56,17	33,94
200	9	7,88	36,88	2,91	78,00	57,53	7,93	54,32	31,25

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela VIII - Efeito da concentração de magnésio no crescimento e composição do micélio de

Agaricus campestris

Magnésio (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
10	5	4,61	54,21	2,50	44,67	21,61	6,69	124,38	26,88
25	5	3,35	47,66	1,60	14,67	15,70	6,33	109,59	17,20
50	5	3,37	45,33	1,53	15,33	17,31	6,32	95,03	16,45
100	5	3,34	44,19	1,46	16,00	17,31	6,27	91,30	15,80
10	7	5,77	48,27	2,78	52,00	31,39	7,64	95,20	29,89
25	7	5,66	43,29	2,45	25,33	27,52	7,54	95,70	26,34
50	7	5,38	38,19	2,05	26,47	26,55	7,37	82,99	22,04
100	7	5,42	35,91	1,95	16,67	26,55	7,17	73,48	20,86
10	9	6,11	43,04	2,63	56,67	34,29	7,75	82,44	28,28
25	9	5,38	40,50	2,18	24,67	29,99	7,62	78,13	23,44
50	9	5,24	37,39	1,96	25,33	31,60	7,42	66,66	21,07
100	9	4,82	33,00	1,59	18,00	31,28	7,23	54,64	17,10

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela IX - Efeito da concentração de magnésio no crescimento e composição do micélio de

Tricholoma nudum

Magnésio (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
10	5	6,05	52,87	3,20	62,00	32,36	5,65	106,31	34,41
25	5	4,92	45,77	2,25	45,33	25,69	5,52	94,14	24,19
50	5	3,57	38,98	1,39	37,33	16,56	5,30	90,26	14,95
100	5	2,03	34,67	0,70	23,33	9,03	5,17	83,81	7,53
10	7	7,50	53,57	4,00	76,00	51,06	5,77	84,21	43,01
25	7	5,15	42,81	2,20	48,00	27,84	5,55	84,94	23,66
50	7	3,66	35,87	1,31	40,67	22,36	5,43	62,98	14,09
100	7	1,77	32,04	0,57	26,00	14,94	5,10	41,01	6,13
10	9	7,96	46,87	3,71	77,33	62,46	7,82	63,85	39,89
25	9	6,44	41,24	2,65	59,33	46,66	6,86	61,06	28,49
50	9	4,56	33,11	1,51	53,33	39,27	6,27	41,37	16,24
100	9	2,02	29,71	0,60	32,00	20,00	5,37	32,26	6,45

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela X - Efeito da concentração de magnésio no crescimento e composição do micélio de

Pleurotus ostreatus

Magnésio (mg/l)	Período de incubação (dias)	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	pH	Eficiência*	
								% C.T. usados	% C.T. originais
10	5	6,34	54,04	3,43	41,33	34,08	5,74	108,20	36,88
25	5	5,15	50,21	2,56	22,67	16,56	5,40	167,92	27,81
50	5	-	-	-	-	-	-	-	-
100	5	-	-	-	-	-	-	-	-
10	7	6,73	54,06	3,64	78,67	53,75	6,34	72,80	39,14
25	7	5,56	50,10	2,78	44,67	42,68	5,49	70,02	29,89
50	7	1,79	29,87	0,53	22,67	12,26	5,27	46,93	5,75
100	7	1,33	27,00	0,36	18,00	4,73	5,15	81,59	3,86
10	9	7,84	40,69	3,19	82,67	62,89	7,07	54,53	34,30
25	9	6,30	36,10	2,27	45,33	48,91	5,59	49,89	24,41
50	9	2,17	28,49	0,62	38,00	15,91	5,34	41,89	6,66
100	9	1,40	24,77	0,35	35,33	10,21	5,22	35,13	3,74

Tabela XI - Efeito da fonte de nitrogênio na produção e composição do micélio dos cogumelos.

Microorganismo	Fonte* de Nitrogênio	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)
<u>Agaricus</u> <u>campestris</u>	I	2,92	36,19	1,06	22,38	8,39
	II	4,41	37,94	1,67	27,45	11,18
	III	6,39	41,12	2,63	42,98	22,04
	IV	6,28	47,75	3,00	38,74	17,96
<u>Tricholoma</u> <u>nudum</u>	I	7,31	47,56	3,48	57,88	41,72
	II	7,50	43,75	3,28	64,18	52,90
	III	8,54	48,94	4,14	82,37	77,31
	IV	7,85	53,69	4,21	71,09	63,33
<u>Pleurotus</u> <u>ostreatus</u>	I	6,99	45,31	3,17	67,02	56,24
	II	7,56	43,13	3,26	63,54	53,55
	III	8,51	46,63	3,97	85,73	74,09
	IV	7,61	53,87	4,10	66,31	55,38

* Fontes I, II, III e IV significam cloreto de amônio, nitrato de sódio, uréia e sulfato de amônio, respectivamente. Todas as determinações foram feitas após 7 dias de desenvolvimento. A composição dos meios é relatada em Material, item 3.2.2.

Tabela XII - Crescimento de cogumelos em meios com quantidades variáveis de vinhaça.

Microorganismo	Meio*	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	Eficiência**	
							% C.T. usados	% C.T. originais
<u>Agaricus campestris</u>	1,50	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	5,90	50,50	2,98	50,55	35,00	70,95	24,83
	1,00	5,93	48,02	2,85	46,76	21,50	142,50	30,64
<u>Tricholoma nudum</u>	1,50	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	7,39	53,34	3,94	80,67	59,12	71,64	42,35
<u>Pleurotus ostreatus</u>	1,50	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	7,00	53,89	3,77	75,33	51,60	78,54	40,53

* Meios 1,50 e 1,25 significam vinhaça concentrada de 1,50 e 1,25 litros a aproximadamente 1 litro. No meio 1,00 a vinhaça não foi concentrada. A composição desses meios encontra-se em Material, item 3.2.3. Determinações feitas aos 7 dias de desenvolvimento.

** Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela XIII - Crescimento de cogumelos em meios com vinhaça diluída.

Microorganismo	Meio*	Peso seco de micélio (g/l)	Proteína do micélio (%)	Proteína (g/l)	A.R. usados (%)	C.T. usados (%)	Eficiência**	
							% C.T. usados	% C.T. originais
<u>Agaricus campestris</u>	1,50	5,10	48,67	2,48	43,16	11,67	354,28	41,33
	1,25	5,74	48,25	2,77	48,67	14,43	251,82	36,45
	1,00	5,93	48,02	2,85	53,33	21,50	142,50	30,64
<u>Tricholoma nudum</u>	1,50	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	7,39	53,43	3,94	80,67	59,12	71,64	42,35
<u>Pleurotus ostreatus</u>	1,50	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	4,98	48,69	2,42	87,61	70,13	45,40	31,84
	1,00	7,00	53,89	3,77	75,33	51,60	78,54	40,53

* Meios 1,50 e 1,25 significam vinhaça diluída de 1 litro para 1,50 e 1,25 litros, com água destilada. No meio 1,00 a vinhaça não foi diluída. A constituição dos meios encontra-se em Material, item 3.2.3. Determinações feitas aos 7 dias de desenvolvimento.

** Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

Tabela XIV - Efeito do inóculo produzido em meio de vinhaça no desenvolvimento de cogumelos.

Microorganismo	Período de incubação (dias)		Peso seco de micélio (g/l)		Proteína do micélio (%)		Proteína (g/l)		C.T. usados (%)		Eficiência* C.T. usados (%)	
	I.V.	I.M.	I.V.	I.M.	I.V.	I.M.	I.V.	I.M.	I.V.	I.M.	I.V.	I.M.
<u>Agaricus campestris</u>	5	5,61	4,47	49,00	53,82	2,75	2,40	19,14	19,25	154,49	134,08	
	7	7,41	6,08	49,69	49,27	3,68	2,30	22,26	21,29	148,39	116,16	
	9	7,18	6,34	48,63	41,99	3,49	2,66	34,94	33,98	107,38	84,18	
<u>Tricholoma nudum</u>	5	6,92	5,79	53,50	52,78	3,70	3,05	36,34	29,89	109,47	109,71	
	7	8,18	7,54	53,62	53,02	4,38	4,00	73,96	51,29	63,23	83,86	
	9	8,16	7,85	46,38	46,23	3,78	3,63	75,34	57,63	53,92	67,72	
<u>Pleurotus ostreatus</u>	5	6,49	6,30	54,06	54,18	3,51	3,41	66,11	30,21	57,07	121,35	
	7	8,50	7,04	54,38	54,20	4,62	3,82	78,91	40,68	62,97	84,51	
	9	8,30	8,10	45,13	49,31	3,75	3,99	79,55	63,87	50,68	67,17	

* Expressa como gramas de proteína/100 gramas de carboidratos totais.

A composição do meio de cultura encontra-se em Material, item 3.2.4.

Os símbolos I.V. e I.M. significam, respectivamente, inóculo produzido em meio de vinhaça e em meio de malte.

Tabela XV - Utilização de ácidos orgânicos por micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa.

Microorganismo	Período de incubação (dias)	Consumo de Ácidos Orgânicos (% p/v)*		
		Ac. Acético	Ac. Succínico	Ac. Láctico
<u>Agaricus campestris</u>	5	79,65	35,54	28,87
	7	85,71	75,00	30,68
	9	98,26	94,74	32,15
<u>Tricholoma nudum</u>	5	95,24	90,80	23,54
	7	97,40	96,06	35,01
	9	97,84	96,06	46,38
<u>Pleurotus ostreatus</u>	5	87,02	94,74	11,77
	7	91,34	94,74	12,77
	9	92,64	96,06	34,91

* Concentrações dos ácidos orgânicos no meio de cultura a 0 horas: acético 0,14%; succínico 0,05%; láctico 0,90%.

Tabela XVI - Consumo de polióis por micélio de cogumelos.

Microrganismo	Consumo de polióis % (p/v)*		
	5 dias	7 dias	9 dias
<u>Agaricus campestris</u>	24,78	91,06	94,72
<u>Tricholoma nudum</u>	50,29	94,14	94,28
<u>Pleurotus ostreatus</u>	57,29	94,58	95,16

* Teor inicial: 0,68% (p/v)

Tabela XVII - Demanda bioquímica de oxigênio nos líquidos residuais do desenvolvimento do micélio de cogumelos em meio de vinhaça.

Microrganismo	Demanda bioquímica de oxigênio* (ppm)		
	5 dias	7 dias	9 dias
<u>Agaricus campestris</u>	20.000	14.000	7.600
<u>Tricholoma nudum</u>	16.000	8.400	7.600
<u>Pleurotus ostreatus</u>	14.000	9.000	4.000

* DBO original do meio de vinhaça: 28.000 ppm.

Tabela XVIII - Aminoácidos dos micélios de cogumelos*.

Aminoácido	<u>Agaricus</u> <u>campestris</u>	<u>Tricholoma</u> <u>nudum</u>	<u>Pleurotus</u> <u>ostreatus</u>	Padrão da FAO
Alanina	3,38	7,96	7,10	-
Arginina	4,32	4,60	3,72	-
Ác. aspártico	13,58	10,39	10,60	-
1/2 Cistina	1,12	1,09	1,05	-
Ác. glutâmico	13,70	12,45	11,65	-
Fenilalanina	2,81	3,68	3,56	2,80
Glicina	2,54	3,56	3,45	-
Histidina	2,91	1,64	1,61	-
Isoleucina	3,40	3,60	3,48	4,20
Leucina	10,77	6,17	5,87	4,80
Lisina	5,60	6,02	5,58	4,20
Metionina	0,79	0,73	0,76	2,20
Prolina	2,97	4,79	4,45	-
Serina	5,15	6,20	4,65	-
Treonina	7,19	6,11	5,69	2,80
Triptofano	1,36	2,00	2,04	1,40
Tirosina	2,14	3,26	2,95	2,80
Valina	2,46	3,96	3,80	4,20
Proteína	49,11	53,02	53,97	-

* Valores calculados como % de Proteína, N x 6,25.

Tabela XIX - Composição em ácidos graxos da fração lipídica do micélio de cogumelos desenvolvidos em cultura submersa*.

Componente	<u>Agaricus</u> <u>campestris</u>	<u>Tricholoma</u> <u>nudum</u>	<u>Pleurotus</u> <u>ostreatus</u>
Ácidos saturados			
Láurico	0,29	-	-
Mirístico	0,29	0,18	0,23
Palmítico	17,05	14,08	13,88
Esteárico	3,54	4,02	4,83
Araquídico	0,52	0,32	0,50
Behêmico	0,07	0,04	0,10
C-15	0,88	-	-
Total	22,64	18,64	19,64
Ácidos insaturados			
Palmitolêico	0,74	2,55	2,43
C-16 (2=)	0,25	0,22	0,25
C-16 (3=)	0,27	0,25	0,51
Olêico	20,37	21,46	25,28
Linolêico	50,33	53,28	48,57
Linolênico	5,31	3,57	3,35
Total	77,27	81,33	80,39

* Expressos como % do total de ácidos graxos.

Tabela XX - Produção de micélio e proteína por cogumelos desenvolvidos em vários resíduos industriais.

Microrganismo	Substrato	Micélio g/l	Proteína g/l	Referência
<u>Agaricus blazei</u>	Água de maceração de milho	26,60	8,64	BLOCK e col., 1953.
<u>Agaricus campestris</u>	Melaço de beterraba	17,20	7,03	REUSSER e col., 1958 a.
<u>Agaricus campestris</u>	Vinhaça de milho	7,41	3,68	Este trabalho.
<u>Boletus indecicus</u>	Licor sulfítico	14,10	3,54	REUSSER e col., 1958 a.
<u>Boletus indecicus</u>	Vinhaça de aguardente	20,80	4,95	FALANGHE, 1962.
<u>Morchella hortensis</u>	Soro de queijo	8,65	2,98	LITCHFIELD, 1967.
<u>Morchella hortensis</u>	Resíduo de enlatamento de abóboras	8,25	2,90	LITCHFIELD, 1967.
<u>Morchella hybrida</u>	Melaço de beterraba	29,60	10,30	REUSSER e col., 1958 a.
<u>Morchella hybrida</u>	Licor sulfítico	9,48	3,55	REUSSER e col., 1958 a.
<u>Morchella hybrida</u>	Soro de soja	4,10	1,98	FALANGHE e col., 1964.
<u>Pleurotus ostreatus</u>	Vinhaça de milho	8,50	4,62	Este trabalho.
<u>Tricholoma nudum</u>	Melaço de beterraba	3,52	1,58	REUSSER e col., 1958 a.
<u>Tricholoma nudum</u>	Licor sulfítico	11,40	4,84	REUSSER e col., 1958 a.
<u>Tricholoma nudum</u>	Soro de soja	6,00	3,28	FALANGHE e col., 1964
<u>Tricholoma nudum</u>	Vinhaça de aguardente	15,60	4,35	FALANGHE, 1962.
<u>Tricholoma nudum</u>	Vinhaça de milho	8,18	4,38	Este trabalho.

6. CONCLUSÕES

a) Das sete espécies de cogumelos testadas, somente Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foram capazes de crescer em meio de vinhaça de milho, sem qualquer suplementação.

b) As concentrações de 1.500, 100 e 10 miligramas por litro de meio, de nitrogênio, fósforo e magnésio permitiram as maiores produções de proteína, geralmente observadas aos 7 dias de desenvolvimento, para os três microrganismos estudados.

c) As altas eficiências observadas foram devidas à utilização, pelos três microrganismos, da fração "não açúcar" do meio de vinhaça, comprovada pelo consumo de ácidos orgânicos e polióis, pelo micélio de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

d) Sulfato de amônio foi a fonte de nitrogênio que propiciou a maior produção de proteína, para os três microrganismos.

e) O microrganismo com menores exigências nutricionais foi Agaricus campestris.

f) A capacidade adaptativa dos três microrganismos à vinhaça de milho, foi demonstrada pelas maiores produções de micélio e proteína, quando de utilizou como inóculo, culturas desses microrganismos previamente desenvolvidas em meio de vinhaça.

g) A maior produção de micélio e proteína foi obtida com Pleurotus ostreatus, seguido de Tricholoma nudum e Agaricus campestris.

h) O desenvolvimento dos três microrganismos determinou apreciáveis reduções da demanda bioquímica de oxigênio da vinhaça de milho.

i) O micélio de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus apresentou um teor de aminoácidos que mais se aproximou do teor da proteína padrão, recomendada pela FAO.

j) Todos os microrganismos estudados apresentaram em sua fração lipídica uma maior porcentagem de ácidos graxos insaturados.

k) Esporos secundários foram observados nas culturas de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus, as quais apresentaram crescimento filamentoso, enquanto que Agaricus campestris, cujo crescimento foi na forma de aglomerados esféricos de micélio, não apresentou a formação do referido tipo de esporos.

7. RESUMO

A praticabilidade do uso de vinhaça de milho, como substrato para produção de micélio de cogumelos, foi investigada. Das sete espécies de cogumelos estudadas, apenas Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foram capazes de se desenvolver no meio de vinhaça, sem qualquer suplementação. Para os três microrganismos as concentrações de 1.500, 100 e 10 miligramas por litro, de nitrogênio, fósforo e magnésio, respectivamente, foram consideradas as mais adequadas para maior produção de proteína, geralmente observada aos 7 dias de desenvolvimento. Os maiores pesos de micélio e de proteína foram obtidos com Pleurotus ostreatus, Tricholoma nudum e Agaricus campestris, em ordem decrescente. Das diferentes fontes de nitrogênio estudadas, sulfato de amônio permitiu sempre a melhor produção de proteína. As altas eficiências observadas foram devidas à utilização de uma fração "não açúcar" do meio de vinhaça, comprovada pelo consumo de ácidos orgânicos e polióis, pelo micélio dos três microrganismos. A capacidade adaptativa de Agaricus campestris, Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foi também demonstrada. Os micélios de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus foram aqueles cujo teor de aminoácidos se comparou mais favoravelmente com a Proteína Padrão, preconizada pela FAO. Analisando-se a fração lipídica do micélio dos três microrganismos verificou-se uma elevada porcentagem de ácidos graxos insaturados. O microrganismo que apresentou exigências nutricionais menos específicas foi Agaricus campestris. O desenvolvimento do micélio dos três microrganismos, em meio de vinhaça de milho, foi responsável pelas apreciáveis reduções da demanda bioquímica de oxigênio no referido meio de cultura. A ocorrência de esporos secundários foi somente observada nas culturas de Tricholoma nudum e Pleurotus ostreatus.

8. SUMMARY

The feasibility of corn stillage as culture medium for mushroom mycelium production, in submerged culture, was investigated. Of seven species tested, Agaricus campestris, Tricholoma nudum and Pleurotus ostreatus were selected by their growth in a corn stillage medium with no addition of salts. The more adequate concentration of nitrogen, phosphorus and magnesium were 1.500, 100 and 10 miligrams per liter, respectively, for the maximum protein yield, generally observed at 7 days. Maximum mycelium and protein yields were obtained with Pleurotus ostreatus, followed by Tricholoma nudum and Agaricus campestris. Among various nitrogen sources, ammonium sulfate allowed the best protein yields. High fermentative efficiencies observed with the three microorganisms were due to the consumption of "non sugars", such as organic acids and polyols, present in the corn stillage medium. The adaptive capacity of Agaricus campestris, Tricholoma nudum and Pleurotus ostreatus was also demonstrated. The amino acid content of Tricholoma nudum and Pleurotus ostreatus mycelium was closer related to the FAO protein pattern than the Agaricus campestris mycelium. A very high percentage of non saturated fatty acids in the mycelium lipidic fraction of the three microorganisms was observed. The nutritional requirements of Agaricus campestris were less specific than those of Tricholoma nudum and Pleurotus ostreatus. The development of the three microorganisms mycelium provided large reduction on the biochemical oxygen demand of the corn stillage medium. Secondary spores were observed in cultures of Tricholoma nudum and Pleurotus ostreatus only.

9. BIBLIOGRAFIA

- BAILEY, J.L. Determination of nitrogen. In: BAILEY, J.L. Techniques in protein chemistry. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier, 1967, p. 346-7.
- BLOCK, S.S.; STEARNS, T.W.; STEPHENS, R.L. & McCANDLESS, R.F.J. Mushroom mycelium. Experiments with submerged culture. J. agric. Fd. Chem. 1 (14): 890-3, 1953.
- CATANI, R.A.; ARRUDA, H.C.; PELEGRINO, D. & BERGAMIN F^o, H. A absorçãõ de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e silício pela cana-de-açúcar Co 419 e o seu crescimento em função da idade. Anais da Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz", 16: 167-90, 1959.
- CIRILLO, V.P.; HARWICK, W.A. & SEELEY, R.D. Fermentation process for producing edible mushroom mycelium. US Patent 2.928.210, 1960.
- CLARCK Jr., J.M.; Amino acid composition of proteins. In: CLARCK Jr, J.M. Experimental biochemistry. San Francisco, Freeman, 1964, p. 93-6.
- EDDY, B.P. Production of mushroom mycelium by submerged culture. J. Sci. Fd. Agric. 9: 644-9, 1958.
- FALANGHE, H. Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinasse. Appl. Microbiol. 10: 572-6, 1962.

FALANGHE, H; SMITH, A.K. & RACKIS, J.J. Production of fungal mycelial protein in submerged culture of soybean whey. *Appl. Microbiol.* 12: 330-4, 1964.

FARIA, V.P. Effect of maturity on composition and digestibility of a bird grain sorghum. M.S. thesis. The Ohio State University, 1968, p. 27-9.

FOOD and AGRICULTURAL ORGANIZATION. Protein requirements. FAO nutritional studies series, nº 16. Rome, 1957. Apud Evaluation of protein quality. Washington, Academy of Science. National Research Council, publ. 1100, 1963, p. 14.

GILBERT, F.A. The submerged culture of Morchella. *Mycologia* 52 (2): 201-9, 1960.

GLORIA, N.A. da; CATANI, R.A. & MATUO, T. Determinação de cálcio e magnésio em plantas, pelo método do EDTA. *Anais Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz"* 22: 153-71, 1965.

HALBINGER, R.E. Aplicación del método del micelio submergido al cultivo de hongos comestibles. *Revta. argnt. Agron.* 21 (3): 162-76, 1954.

HOUGH, L: Application of paper partition chromatography to the separation of the polyhydric alcohols. *Nature* 165: 400, 1950.

HUMFELD, H. The production of mushroom mycelium (Agaricus campestris) in submerged culture. *Science* 107: 373, 1948.

- HUMFELD, H. Production of mushroom mycelium. Yearbook of Agriculture. U.S. Dept. Agric., 1950/1, p. 242-5.
- HUMFELD, H. & SUGIHARA, T.F. Mushroom mycelium production by submerged propagation. Fd. Technol. 3: 355-6, 1949.
- HUMFELD, H. & SUGIHARA, T.F. The nutrient requirements of Agaricus campestris grown in submerged culture. Mycologia 44: 605-20, 1952.
- IMPENS, R. & WILLAN, A. Influence des produits de la réaction de Maillard sur la croissance du mycélium. Separata de Proceedings of the 2nd. Scientific Symposium and the 7th. International Congress on Mushroom Science. Hamburg. 1968. Wageningen, Center for Agric. Publ. Document, 1969, p. 97-110.
- JANARDHANAN, K.K.; KAUL, T.N. & HUSAIN, A. Use of vegetable wastes for the production of fungal protein from Morchella species. J. Fd. Technol. 7 (4): 197-9, 1970. Apud. Chem. Abstr. 75: 34199k, 1971.
- KLIGMAN, A.M. Secondary spores in the mycelium of cultivated mushroom, Psalliota campestris Fr. Am. J. Bot. 29(4): 304-8, 1942.
- KLIS, J.B. ed. Real mushroom in powder form. Separata de Fd. Process., Sept. 1963.
- LAMBERT, E.B. Principles and problems of mushroom culture. Bot. Rev. 4 (7): 397-426, 1938.

- LAMBERT, M. & NEISH, A.C. Rapid method for stimulation of glycerol in fermentation solutions. Can. J. Res. 28 B: 83-9, 1950.
- LITCHFIELD, J.H. Submerged culture of mushroom mycelium. In: PEPPLER, H.J. ed. Microbial Technology. New York, Reinhold 1967, p. 131.
- LITCHFIELD, J.H.; OVERBECK, R.C. & DAVIDSON, R.S. Mushroom culture. Factors affecting the growth of the morel mushroom mycelium in submerged culture. J. agric. Fd. Chem. 11 (2): 158-62, 1963.
- LUDDY, F.E., BARFORD, R.A. & RIEMNSCHNEIDER, R.W. Direct conversion of lipids components to their fatty acids methyl esters. J. Am. Chem. Soc. 73: 447-51, 1960.
- MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone reagent. Science 107: 254-5, 1948.
- MOUSTAFA, A.M. Nutrition and the development of mushroom flavor in Agaricus campestris mycelium. Appl. Microbiol. 8: 63-7, 1960.
- NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. biol. Chem. 153: 375-80, 1944.
- OPIENSKA-BLAUTH, J.; CHAREZINSKI, M. & BERBEC, H. A new, rapid method of determining tryptophan. Analyt. Biochem. 6: 69-76, 1963.

- REUSSER, P.J.; SPENCER, J.F.T. & SALLANS, H.R. Protein and fat content of some mushrooms grown in submerged culture. *Appl. Microbiol.* 6 (1): 1-4, 1958 a.
- REUSSER, P.J.; SPENCER, J.F.T. & SALLANS, H.R. Tricholoma nudum as a source of microbiological protein. *Appl. Microbiol.* 6 (1): 5-8, 1958 b.
- SOMOGYI, M. A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 86: 655-63, 1930.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61-8, 1945.
- SRIVASTAVA, H.C. & BANO, Z. Nutrition requirements of Pleurotus flabellatus. *Appl. Microbiol.* 19: 166-9, 1970.
- SUGIHARA, T.F. & HUMFELD, H. Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom. *Appl. Microbiol.* 2: 170-2, 1954.
- SZUECS, J. Method of enhancing mushroom mycelium flavor. US Patent 2.693.664, 1954.
- SZUECS, J. Method of growing mushroom mycelium and the resulting products. US Patent 2.850.841, 1958.
- SZUECS, J. Mushroom culture. US Patent 2.761.246, 1956.
- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatography. *Nature* 166: 444-5, 1950.

WINKLER, L.W. Dissolved oxygen. The Winkler method. In: American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and sewage. 9 th. ed. New York, Am. Public Health Assoc., 1946, p. 127-9.