

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EDENES MARIA SCHROLL LOSS

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA CADEIA PRODUTIVA DO MILHO
PARA CULTIVO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS.

Ponta Grossa – PR
2009

EDENES MARIA SCHROLL LOSS

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA CADEIA PRODUTIVA DO MILHO
PARA CULTIVO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Claudia Barana.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues

Ponta Grossa – PR
2009

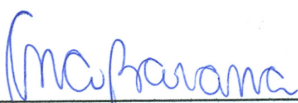
TERMO DE APROVAÇÃO

EDENES MARIA SCHROLL LOSS

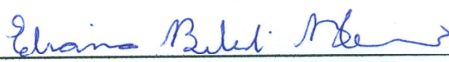
“ APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA CADEIA PRODUTIVA DO MILHO PARA CULTIVO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS “

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

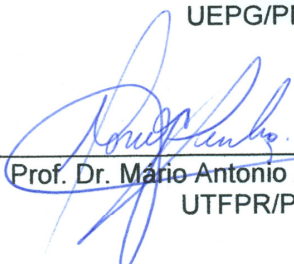
Ponta Grossa, 25 de Maio de 2009.



Profa. Dra. Ana Cláudia Barana
UEPG/PR



Profa. Dra. Eliana Beleski Borba Carneiro
UEPG/PR



Prof. Dr. Mario Antonio Alves da Cunha
UTFPR/PR

Ponta Grossa
2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adolfo e Olíria Schroll, aos irmãos Agnêse e Deborah, Pedro Adolfo e Anna Claudya, meu querido amigo Edílson Ferreira, pelo apoio em todos os momentos; aos meus filhos Felipe e Mayara pelo carinho e compreensão, em especial ao meu marido Márcio, pelo amor, e dedicação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nunca nos abandona e sabe o que é melhor para cada um de nós;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade e pela condição oferecida;

Aos Professores do Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos pelo apoio e incentivo, em particular Prof. Dr. Gilvan Wosiacki e a Prof^a Dr^a Eliana Beleski Borba Carneiro;

À Coordenadora do Curso de Química de Ms. Maristela Amadori que, juntamente com os professores da coordenação, deferiu meu pedido de afastamento parcial e total para fazer as disciplinas do mestrado;

Ao Laboratório LAQUA da UTFPR, campus Pato Branco, em especial à Prof^a. Ms. Simone Beux e à Roberta Roncatti, pelo apoio e atenção nas análises;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Barana, pela paciência, incentivo e, sobretudo, pelo meu crescimento como ser humano;

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Márcio Barreto Rodrigues, pela paixão e entusiasmo no trabalho com cogumelos e pelo apoio em todas as atividades;

À Andréia Rafaela Royer, bolsista de iniciação científica, sempre disposta e uma ótima parceira no decorrer do trabalho experimental;

À Samantha Lemke Gonzalez, pessoa maravilhosa, que esteve comigo em todas as etapas do mestrado e também na minha vida pessoal;

Ao amigo, irmão de coração e mestre Prof. Ms. Edilson Ferreira, pelo carinho e tranquilidade nos momentos mais difíceis;

Ao Prof. Dr. Alexandre Alfaro, pelo apoio e estímulo ao ingresso do Mestrado;

A colega de Mestrado Tatiana Roselena Oliveira, pela ajuda nas análises de micotoxinas. A Denise e Danianni do Laboratório de Engenharia de Alimentos da UEPG, pelo apoio nas análises físico-químicas;

Aos meus pais Adolfo e Olíria Schroll, pelas orações de incentivo no decorrer dessa etapa;

Aos meus irmãos, Agnêse, Déborah, Anna Claudya e Pedro Adolfo, por acreditarem e orarem, para que eu pudesse chegar ao final dessa caminhada;

Aos meus filhos, Felipe e Mayara Schroll Loss, meus tesouros, sempre vibrando com minhas vitórias;

À amiga Jussany Correia, pelo apoio e incentivo nas viagens para Ponta Grossa;

Ao meu marido Márcio Rogério Loss, que, ao longo desses dois anos, aprendeu a cozinhar, foi pai e mãe, compreensivo e ajudou nos momentos mais delicados;

Enfim, a todos os que souberam a importância desse trabalho.

Muito obrigada por existirem e estarem ao meu lado.

EPÍGRAFE

“O homem que venceu na vida, foi aquele que viveu bem, riu muitas vezes e amou muito. Que conquistou o respeito de pessoas inteligentes e o amor das crianças. Que preencheu um lugar no mundo e cumpriu uma missão. Que deixou um mundo melhor do que encontrou e que procurou o melhor nos outros e deu o melhor de si”.

(Robert Louis Steveson)

RESUMO

A agroindustrialização de produtos a base de milho através de processamento úmido resulta em subprodutos sólidos e líquidos, que dispostos de forma inadequada tornam-se fontes de contaminação e agressão ao meio ambiente. O presente trabalho teve como objetivo a valorização e o aproveitamento destes subprodutos da cadeia do milho (palha do sabugo do milho, milhocina e sabugo do milho), utilizando a fermentação no estado sólido (FES) para a produção de cogumelos *Pleurotus spp*, produto com importantes características nutricionais, funcionais e gastronômicas. A primeira etapa do trabalho se resumiu na caracterização dos subprodutos selecionados (palha do sabugo de milho, sabugo de milho e milhocina), que foram base para os estudos de obtenção de composto-base com potencial para a produção de *Pleurotus (ostreatus e florida)*. Na segunda etapa um planejamento fatorial 2^3 indicou que palha do sabugo do milho + milhocina e água 1:1 em pH = 5,0 apresentou melhor eficiência biológica para ambas as espécies de *Pleurotus* (florida e ostreatus). Estudos cinéticos realizados com o composto-base que apresentou melhor eficiência revelaram uma significativa interação entre a variável fibra bruta e relação C/N, indicando serem estes fatores importantes para o processo de desenvolvimento dos fungos. A caracterização dos corpos de frutificação dos cogumelos produzidos indicou valores nutricionais equivalentes aos da literatura, tendo sido obtidos em base seca: 92,18% de umidade, 13,50% de proteínas, 1,00% de lipídeos, 65,76 de carboidratos totais, 4,56% de cinzas e valor energético de 25,48 Kcal/100g. Análises quantitativas das micotoxinas aflatoxina e zearalenona indicaram valores inferiores aos limites estipulados pelas legislações nacionais e internacionais, para grãos de milho. A presença desses contaminantes indica que estes podem ter sido absorvidos do substrato pelo fungo.

Palavras-chave: palha do sabugo do milho; sabugo de milho; milhocina; *Pleurotus spp*.

ABSTRACT

The agroindustrialization of corn base products through humid processing results in solid and liquid by-products, which disposed in inadequate form become sources of contamination and aggression to the environment. The present work had as its objective the valorization and use of these by-products of the corn chain (straw of corncob, corn steep licor and corncob), using the solid state fermentation (SSF) for the production of *Pleurotus spp* mushrooms, a product with important nutritional, functional and gastronomical characteristics. The first stage of this work comprised the characterization of the selected by-products (straw of corncob, corncob and corn steep licor), which were the base to the studies of composed-base obtaining with potential for the production of *Pleurotus (ostreatus and florida)*. In the second stage a 2³ factorial planning indicated that corncob straw + corn steep licor and water 1:1 in pH = 5,0 presented better biological efficiency for both species of *Pleurotus (florida and ostreatus)*. Kinetic studies accomplished with the composed-base that presented better efficiency revealed a significant interaction between the variable crude fiber and C/N relation, indicating that these factors are important for the mushroom development process. The characterization of the fruiting bodies of the produced mushrooms indicated nutritional values equivalent to the ones in the literature, since it was obtained 92,18% of humidity, 13,50% of proteins, 1,00% of lipids, 65,76% of total carbohydrates, 4,56% of ashes, and energy value of 25,48 Kcal/100g. Quantitative analyses of the aflatoxin and zearalenona mycotoxins indicated inferior values to the limits set by the national and international legislations for corn grains. The presence of these pollutants indicates that they were absorbed from the substract by the fungus.

Keywords: straw of corncob; corncob; corn steep licor; *Pleurotus spp*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia dos cogumelos	18
Figura 2 – a) <i>Pleurotus ostreatus</i> , (b) <i>Pleurotus sajor-caju</i>	22
Figura 3 Fluxograma de produtos da cadeia do milho obtidos por processo	29
Figura 4 – Fluxograma das etapas de produção de <i>Pleurotus spp.</i>	34
Figura 5 – Diagrama esquemático da câmara de cultivo.....	36
Figura 6 - Resultados experimentais com sabugo, palha e <i>Pleurotus ostreatus</i> na fase de desenvolvimento miceliar: a) composto base com sabugo; b) composto base com palha de milho.	42
Figura 7 – Gráfico de Pareto das interações de primeira, segunda ordem	45
Figura 8 - Diagrama para interpretação geométrica dos resultados do planejamento fatorial 2 ³ . Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias de E.B...46	
Figura 9 - Influência da concentração de efluente e pH na eficiência biológica	47
Figura 10 – a) Incubação dos pacotes; b) abertura dos pacotes; c) aparecimento dos primórdios; d) desenvolvimento dos corpos de frutificação; e) cogumelos comestíveis <i>Pleurotus ostreatus</i> ; f) cogumelos comestíveis <i>Pleurotus florida</i>	48
Figura 11 – Relação linear entre o teor de fibra bruta e relação C/N	49
Figura 12 - a) Coleta dos cogumelos; b) corpos de frutificação do <i>Pleurotus ostreatus</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação dos níveis e fatores avaliados no planejamento fatorial 2 ³ utilizados para a produção de <i>Pleurotus spp.</i>	37
Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial 2 ³ sem ponto central.....	37
Tabela 3 – Características físico-químicas da milhocina.....	40
Tabela 4 - Resultados de produção de cogumelo fresco e eficiência biológica dos substratos palha e sabugo em relação a concentração do efluente para produção do <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental e resultados de rendimento médio em (g), eficiência biológica dos corpos de frutificação dos cogumelos	44
Tabela 6 – Efeitos calculados para o planejamento 2 ³ relativos aos estudos de obtenção de composto-base para a produção de cogumelos <i>Pleurotus spp.</i>	44
Tabela 7 - Resultados das análises físicas e químicas dos compostos base com o desenvolvimento miceliar	49
Tabela 8 - Caracterização físico-química de <i>Pleurotus ostreatus</i> , resultados em base seca.....	51
Tabela 9 - Caracterização dos macronutrientes em <i>Pleurotus ostreatus</i> , resultados em base seca	52
Tabela 10 – Resultados da presença de micotoxinas nos corpos de frutificação do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i>	52

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Cogumelos comestíveis	18
2.1.1 Valores nutricionais dos cogumelos comestíveis	19
2.1.2 Cogumelos comestíveis como Alimentos funcionais	19
2.2 Cogumelos <i>Pleurotus</i> spp	20
2.3 Produção de cogumelos.....	22
2.3.1 Fermentação no estado sólido (FES).....	23
2.3.2 Produção de cogumelos <i>Pleurotus</i> sp.....	24
2.3.2.1 Exigências de cultivo do <i>Pleurotus</i> spp.	25
2.3.2.2 Água	25
2.3.2.4 Fontes de nitrogênio.....	26
2.3.2.5 Relação de carbono e nitrogênio (C/N)	26
2.3.2.6 pH.....	26
2.3.2.7 Lipídeos, sais minerais e vitaminas	27
2.3.2.8 Temperatura.....	27
2.3.2.9 Luz.....	27
2.3.3 Trocas gasosas	27
2.4 Resíduos agroindustriais como matéria-prima para produção de cogumelos.....	28
2.4.1 Origem e utilização da água de maceração para produção de cogumelos.....	29
2.5 Micotoxinas e segurança alimentar na produção de cogumelos	30
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivos gerais.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material.....	32
4.1.1 Milhocina	32
4.1.2 Substrato palha e sabugo.....	33
4.1.3 Microorganismos	33
4.1.4 Produção do inóculo ou semente	33
4.2 Etapas de preparação para o cultivo	33
4.2.1 Mistura e ensacamento	34

4.2.2 Esterilização	34
4.2.3 Inoculação	34
4.2.4 Incubação e frutificação.....	35
4.2.5 Colheita e processamento	35
4.3 Preparações do substrato e condições de cultivo	35
4.3.1 Estudo e obtenção do composto base (Ensaio A).....	35
4.3.2 Planejamento fatorial 2^3 (Ensaio B)	36
4.4 Colheita e processamento	37
4.5 Metodologias das análises físicas e químicas.....	38
4.6 Estudo cinético do processo de bioconversão	39
4.7 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1 Caracterização físico-química do efluente do milho.	40
5.2 Resultados do Ensaio A – estudo e caracterização do composto base	41
5.3 Resultados do Ensaio B - Planejamento fatorial 2^3	43
5.4 Estudos cinéticos.....	48
5.5 Caracterização dos corpos de frutificação.....	50
5.5.1 Resultados das análises de micotoxinas.....	52
5.5.2 Compostos fenólicos totais.....	53
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	61

INTRODUÇÃO

Os sistemas agrícolas e agroindustriais da cadeia do milho dão origem a vários tipos de resíduos orgânicos, os quais, quando corretamente manejados e utilizados, reverterem-se em fornecedores de nutrientes para a produção de alimentos e outros insumos de relevância industrial. Por outro lado, quando inadequadamente manuseados e tratados, constituem fonte de contaminação e agressão ao meio ambiente, especialmente quando direcionados para os mananciais hídricos.

Durante o processamento agroindustrial de produtos a base de milho por via úmida, ocorre a geração de subprodutos como cascas, farelos e águas residuárias oriundas de tanques de maceração e etapas de separação de germe. Estes materiais, apesar de possuírem potenciais aplicações como integração em rações animais, bebidas ou álcool combustível, são em alguns casos descartados como resíduos.

Uma interessante alternativa para o aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais é a produção de cogumelos, os quais vêm conquistando mercado em função do reconhecimento de suas propriedades nutricionais e farmacológicas, além do seu valor gastronômico. Entretanto, outra grande vantagem na exploração desta alternativa é a possibilidade da utilização de uma variedade de fontes de carbono e nitrogênio, incluindo resíduos agroindustriais, como extratos de maceração, bagaços, palhas, cascas, milhocina entre outros. Além disso, em seu processo de bioconversão de resíduos contaminados, muitos fungos basidiomicetos podem atuar concomitantemente na detoxificação destes substratos, podendo gerar ao final da produção, após a colheita dos cogumelos, um substrato remediado quanto à presença de substâncias tóxicas e com menor teor de gorduras e fibras.

Este processo é possível porque na extremidade de suas hifas, os fungos sintetizam um grande número de enzimas e ácidos orgânicos que se difundem nos resíduos utilizados como substrato efetuando a quebra da celulose, amido, açúcares, proteínas, gorduras e outros constituintes do mesmo em moléculas menores que serão utilizadas como alimento e fonte de energia para o seu crescimento.

Neste contexto, esta dissertação tem como objetivo a valorização e aproveitamento biotecnológico de sub-produtos gerados no processamento de milho por processamento úmido para a produção de cogumelos comestíveis *Pleurotus spp.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cogumelos comestíveis

Cogumelos são definidos como macrofungos heterotróficos não fotossintéticos, saprófitos, podendo possuir diferentes corpos de frutificação, constituídos de píleo, lamelas, estipe, anel e bulbo (Figura 1). Podem ser comestíveis, venenosos e alucinógenos e ainda há aqueles que possuem propriedades medicinais curativas e até afrodisíacas (CHANG; MILES, 2004; FERGUS & FERGUS, 2003).

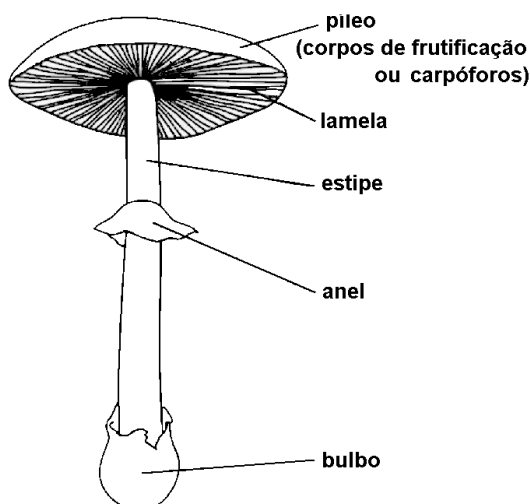


Figura 1 – Morfologia dos cogumelos

Fonte: C.L. Fergus & C. Fergus, 2003.

Dentre os cogumelos comestíveis, a maioria pertence à divisão *Basidiomycota*, mas existem muitos gêneros importantes nas divisões *Ascomycota* e *Deuteromycota*. Sob o ponto de vista nutricional, considerando o elevado conteúdo protéico dos cogumelos comestíveis, seu cultivo tem sido apontado como uma alternativa para incrementar a oferta de proteínas às populações de países em desenvolvimento e com alto índice de desnutrição. As espécies de cogumelos comestíveis são aproximadamente 2000 e cerca de 25 delas são cultivadas comercialmente. Entre essas existem 3 espécies mais cultivadas no Brasil, champignon de Paris (*Agaricus bisporus*); Shiitake (*Lentinus edodes*), Hiratake ou Shimeji (*Pleurotus*). A produção de cogumelos comestíveis está aumentando na cultura ocidental, envolvendo um grande número de espécies além do popular champignon. Em 1995 a produção mundial foi de 2,0 milhões de toneladas, em

2005, aumentou para 3,3 milhões de toneladas. O Brasil não se encontra nas estatísticas oficiais de cogumelos, mas a maior região produtora está localizada na região do Alto Tietê, estado de São Paulo. Entretanto existe um crescimento de consumo de cogumelos devido a uma maior divulgação do seu valor nutritivo e medicinal e pelo preço ter se tornado mais acessível para o consumidor (FURLANI; GODOY, 2007).

2.1.1 Valores nutricionais dos cogumelos comestíveis

A composição química dos cogumelos varia de acordo com a espécie, linhagem e estágio de desenvolvimento do corpo de frutificação. O tipo de substrato utilizado no cultivo também pode alterar a composição química dos cogumelos, principalmente no teor de proteínas e minerais, além de influenciar o aroma e sabor. Segundo Chang e Miles (2004), os cogumelos contêm vários L-aminoácidos, inclusive os essenciais como lisina, metionina, triptofano, treonina, valina, leucina, isoleucina, histidina e fenilalanina. Os principais minerais presentes nos cogumelos são o potássio, fósforo, pequenas quantidades de cálcio, conteúdo apreciável de ferro e zinco.

2.1.2 Cogumelos comestíveis como Alimentos funcionais

Os cogumelos comestíveis têm sido classificados como alimentos funcionais devido às suas qualidades nutricionais e propriedades terapêuticas.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA/MS Resolução nº 18 de 30 de Abril de 1999, as propriedades funcionais são aquelas relativas ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção da saúde e outras funções normais do organismo humano. As propriedades de saúde são aquelas que afirmam, sugerem ou implicam a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Dentre as substâncias que conferem propriedades funcionais aos alimentos, destacam-se os compostos fenólicos e as fibras.

Compostos fenólicos são moléculas que possuem um ou mais grupos fenólicos (anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas) em sua estrutura. Estas substâncias são reconhecidas como uma das maiores classes de metabólitos

secundários de plantas, sendo divididas em ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides e taninos (PIMENTEL, FRANCKI, GOLLÜCKE, 2005).

O consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “substâncias reativas oxigenadas” ou simplesmente ROS, essas substâncias também estão ligadas a processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (DA PAZ, 2007).

As fibras alimentares formam um conjunto de substâncias derivadas de vegetais, são resistentes à ação de enzimas digestivas humanas. De acordo com a solubilidade de seus componentes em água podem ser classificadas em fibras solúveis e fibras insolúveis (MATTOS; MARTINS, 2000).

As fibras solúveis formam géis em contato com água, aumentando a viscosidade dos alimentos parcialmente digeridos (pectinas, gomas e mucilagens e algumas hemiceluloses). Dentro das hemiceluloses temos as β -glucanas, fibras de grande importância encontradas nos cereais. Em alguns cogumelos comestíveis sua concentração podem variar de acordo com a espécie e meio de cultivo (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; PARK et al., 2003). As fibras solúveis são responsáveis, por exemplo, pelo aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e redução do colesterol plasmático. As fibras insolúveis aumentam o bolo fecal, reduzindo o tempo de trânsito no intestino grosso, e tornam a eliminação fecal mais rápida (MATTOS; MARTINS, 2000).

2.2 Cogumelos *Pleurotus* spp

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* encontrados em zonas temperadas, subtropicais e tropicais são muito freqüentes nas matas brasileiras. Seu modo de vida é como decompositor primário da matéria vegetal, principalmente de madeiras e, portanto, é facilmente encontrado nas florestas (DIAS, 2003).

No Brasil, são popularmente chamados de cogumelos ostras devido à morfologia de seus píleos, sendo também conhecidos no Brasil como cogumelos gigantes, Caetetuba, ou ainda, pela colônia japonesa, por Hiratake (YILDIZ, 2002).

O *Pleurotus* está sendo cultivado em muitos países do mundo, ganhando popularidade na Europa, América e Extremo Oriente.

Dependendo da espécie, requer um sistema de cultivo utilizando técnicas bem distintas. O Hiratake pode envolver recursos naturais previamente compostados e pasteurizados e também pode ser produzido em toras, mas, comercialmente, esta forma de cultivo não é economicamente rentável. O Shimeji é produzido por modernas técnicas, chamadas de cultivo axênico, onde o substrato pode ser acondicionado em frascos de vidros ou sacos de polipropileno, para uma posterior autoclavagem.

No comércio esses produtos são dispostos em bandejas de isopor recobertas com filme de PVC (policloreto de vinila) ou caixas de papelão e mantidas sob refrigeração (EIRA; BUENO, 2005).

A taxonomia do gênero *Pleurotus* foi baseada na morfologia e afinidade entre as espécies até as décadas passadas. De acordo com Bano; Rajarathnam (1988) e Chang; Miles (2004), o gênero *Pleurotus* apresenta a seguinte classificação botânica:

Reino: Fungi
Divisão: Eumycota
Subdivisão Basidiomycotina
Classe: Basidiomycetes
Ordem: Agaricales
Família: Trichlomataceae
Gênero: *Pleurotus*

Na Figura 2 são mostrados fotos de diferentes espécies de *Pleurotus spp.*

a) *Pleurotus ostreatus*b) *Pleurotus sajor-caju***Figura 2** – a) *Pleurotus ostreatus*, (b) *Pleurotus sajor-caju*

Fonte: Ramos et al. (2000)

Existem mais de 100 espécies de *Pleurotus* no mundo, das quais 14 espécies são cultiváveis. No Brasil existem muitas espécies nativas de *Pleurotus*, a maioria ainda não estudada, que teriam potencialidade de serem utilizadas para o cultivo, com a vantagem de serem adaptadas aos climas regionais brasileiros (MODA, 2003).

2.3 Produção de cogumelos

No final da década de 50, teve iniciaram-se os primeiros experimentos à base de serragem como substrato para o cultivo de cogumelos, já na década de 60, começaram a utilização de palha para produção em grande quantidade. O cultivo de cogumelos, até a década de 70, era feito basicamente da coleta diretamente da natureza e, a partir de então, iniciou-se o cultivo em escala industrial (YILDIZ, 2002).

Segundo Urben e Uriartt (2004), desde a década de 80 muitas universidades de agronomia e escolas técnicas da China estabeleceram cursos de produção de cogumelos comestíveis. Estes cursos de graduação tiveram uma função importante no desenvolvimento do cultivo de cogumelos. Durante 10 anos, a produção de fungos foi listada como o item mais importante do desenvolvimento da China.

Nos séculos passados, a produção tradicional de cogumelos dependeu somente de condições naturais, no entanto, esta tecnologia antiga era muito instável e dependia da queda natural de esporos usados como sementes, mas foi mantida por muitos séculos. A partir de 1960, o cultivo em toras com inoculação de sementes puras foi popularizado, representando uma mudança significativa no cultivo comercial do Shiitake. Ao final da década de 70 veio a maior mudança com

popularização do uso de serragem, farelo de arroz e de trigo como substratos dispostos em recipientes de plástico ou vidro. Essa técnica teve como objetivo aumentar a produção e contribuir para a preservação dos recursos florestais.

A década de 1980 foi marcada pela técnica Jun-Cao (do chinês Jun = cogumelos; Cao = gramíneas) que promoveu avanços significativos na tecnologia de produção, associando os benefícios sociais, ecológicos e econômicos e estabelecendo um melhor equilíbrio entre plantas, fungos e animais.

Em 1983, já havia a utilização de gramíneas como substrato para crescimento miceliar. As espécies mais cultivadas pelos chineses nesta época eram: *Lentinus edodes*,; *Auricularia aurícula*, *Tremela fusiformis*, *Auricularia polytricha*, *Hericium erinace*. A preocupação era substituir parcialmente a madeira por outros materiais, para uma proteção do ecossistema florestal, utilizando resíduos da agricultura como bagaço, palha de arroz, carapaça da semente de algodão, caule de trigo, folha de bananeira, e outras espécies vegetais. Além disso, essa pesquisa sistemática levou a uma seleção de espécies de gramíneas e de linhagens de cogumelos aptas para serem utilizadas (OLIVEIRA; URBEN, 2004).

Os cogumelos cultivados pela técnica Jun-Cao, apresentam alta qualidade nutricional em relação aos cultivados em toras e serragens. A difusão desta técnica iniciou a partir 1986 e, desde então, vem sendo aplicada em 26 províncias e 265 comunidades dispersas em 17 países, dentre os quais o Brasil. Dados mostram que no período de 1991 a 1995, foram cultivados mais de 1.239 bilhões de tubos e sacos de cogumelos comestíveis, o que equivale a 516,6 mil/m³ de madeira poupada.

Essa técnica apresenta diversas vantagens como recursos agrícolas naturais abundantes e inexplorados, aproveitamento de energia solar com alta taxa de conversão biológica, curto período de cultivo (sob condições adequadas, frutifica em até 40 dias) praticidade e facilidade de apropriação podem ser aplicadas em pequena e grande escala de produção, baixo custo, efeito positivo no combate a degradação do solo. O processo de produção do cultivo de cogumelos através inoculação do microorganismo em recipientes é conhecido como fermentação no estado sólido (URBEN; URIARTT, 2004).

2.3.1 Fermentação no estado sólido (FES)

De acordo com Pinto et al. (2005), a fermentação no estado sólido desempenha um papel de destaque no aproveitamento dos resíduos sólidos. A FES

vem sendo utilizada mundialmente para enriquecimento protéico de resíduos, onde os microorganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados para ração humana e animal; para destoxificação de resíduos com eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua ação aplicação intensiva ou para produção de compostos de alto valor agregado (enzimas e diferentes metabólitos).

A fermentação no estado sólido ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao desenvolvimento de microorganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada a fase sólida, formando uma camada fina na superfície das partículas. A FES apresenta como vantagem a utilização da fase sólida como fonte de nutrientes e, ao mesmo tempo, suporte para o crescimento de células microbianas. (PINTO et al., 2005).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água representa papel de destaque na FES, em virtude do elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. Na FES, a água está relacionada com dois parâmetros: o primeiro diz respeito a umidade, que está associada com o percentual da massa total do meio; o segundo à atividade de água (a_w), que determina a quantidade de moléculas de água disponíveis nas partículas do substrato. A umidade na FES tem se mostrado menos elucidativa que a atividade de água, pois a última afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2005).

Essa técnica tem sido amplamente usada na Ásia para produção de alimentos fermentados como queijo maturado, produção de enzimas (amilases, proteases, pectinases e outras), produção de ácido cítrico, ácido L (+) láctico, etanol, giberelinas, antibióticos, toxinas, alcalóides e aromas (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

2.3.2 Produção de cogumelos *Pleurotus sp.*

O *Pleurotus*, por ser um fungo lignolítico, degrada madeira para obter o seu alimento, possuindo capacidade de se desenvolver em qualquer resíduo que contenha celulose, hemicelulose e lignina. Alguns substratos são mais produtivos do que outros, pois dependendo da sua composição química, haverá mais ou menos substâncias propícias para seu desenvolvimento (BONONI et al., 1999).

O cultivo de *Pleurotus* é o mesmo para todas as linhagens, com exceção das temperaturas de frutificação, e pode ser dividido nas seguintes etapas: preparação

da matriz ou “spawn”, preparação do composto, esterilização, semeadura ou inoculação, incubação, produção e colheita.

2.3.2.1 Exigências de cultivo do *Pleurotus* spp.

De acordo com Chang e Miles (2004), os fatores físicos e nutricionais dos substratos são de vital importância para a produção de *Pleurotus*. As câmaras ou estufas onde os cogumelos são cultivados devem possuir iluminação adequada, níveis satisfatórios de oxigênio e taxas de dióxido de carbono inferiores a 1% para que possam produzir cogumelos de tamanho uniforme para melhor comercialização. Dentre os fatores que influem significativamente na produtividade e qualidade nutricional do *Pleurotus* estão o teor de umidade, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, relação carbono/nitrogênio (C/N), pH, lipídios, sais minerais e vitaminas, temperatura, luz e trocas gasosas (CHAHAL et al., 1987; RAGUNATHAN et al., 1996; BONATTI et al., 2004).

2.3.2.2 Água

A umidade do substrato deve estar entre 50 - 75% para o crescimento satisfatório de micélio. Porém, um excesso de umidade no substrato pode impedir as trocas gasosas do micélio ou proporcionar a proliferação de antagonistas e parasitas, mas para que ocorra a frutificação a umidade relativa deve estar entre 85 e 95% (CHANG; MILES, 2004).

2.3.2.3 Fontes de carbono

O carbono atua como fonte de energia para manutenção dos processos metabólicos na formação da célula fúngica, podendo ser obtido a partir de poli e monossacarídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos, alcoóis, compostos policíclicos, celulose, hemiceluloses e lignina. Este elemento tem como destino a formação dos lipídeos das membranas celulares, polissacarídeos de parede celular, ácidos nucléicos e proteínas (CHANG; MILES, 2004).

No resíduo vegetal, as principais fontes de carbono são os polissacarídeos e a lignina. Outros compostos como lipídeos e proteínas também podem ser utilizados. Estudos mostram que a glicose, galactose, manose e frutose estimulam e que a arabinose e a xilose diminuem o crescimento de *Pleurotus* (CHANG; MILES, 2004).

Durante o crescimento de micélio ocorre um aumento de monossacarídeos redutores e, após a frutificação, há uma diminuição. A perda destes açúcares redutores provavelmente está associada à necessidade de energia para a formação dos corpos de frutificação (BANO; RAJARATHNAM, 1988).

2.3.2.4 Fontes de nitrogênio

O nitrogênio é essencial para a síntese das proteínas, purinas, pirimidinas e polissacarídeos que constituem a parede celular de muitos fungos. O nitrogênio pode ser adicionado ao meio de cultivo líquido na forma de nitrato, amônia ou nitrogênio orgânico (CHANG E MILES, 2004).

2.3.2.5 Relação de carbono e nitrogênio (C/N)

Eira (2005) relata a importância da relação C/N, que varia em cultivos de diferentes cogumelos. O cultivo de *Agaricus blazei* é feito em composto muito semelhante ao *Agaricus bisporus*, porém adicionando-se menor quantidade de nitrogênio ao composto, com relação C/N inicial de aproximadamente 37/1. Este cogumelo é produzido em compostos comumente formulados com palhas de gramíneas (trigo, arroz, braquiária, coast-cross, bagaço de cana-de-açúcar), calcário calcítico e gesso.

A relação C/N de um composto, inicialmente é formulada em torno de 22/1 a 25/1. Se esta relação for inadequada a colonização do substrato será lenta, estando sujeita a contaminação, e a frutificação será de baixo rendimento. De acordo com Chang e Miles (2004), a relação C/N ótima para o *Pleurotus* é de 75 a 80/1, sendo também efetivas as relações de 32 a 150/1.

Segundo Silva et.al. (2007), o crescimento do fungo, bem como a qualidade, a quantidade e o rendimento do produto desejado, dependem da utilização de nutrientes e das condições físico-químicas do ambiente. Além disso, os valores nutricionais dos cogumelos *Pleurotus* dependem principalmente do tipo de substrato e condições de cultivo.

2.3.2.6 pH

Para o melhor desenvolvimento miceliar, o pH do substrato deve estar situado entre 6,5 e 7,0. Com o decorrer da colonização o pH se reduz até o valor de,

aproximadamente, 4,0, em função da liberação de ácidos orgânicos, principalmente do ácido oxálico (RAJARATHNAM, et al ,1996).

2.3.2.7 Lipídeos, sais minerais e vitaminas

Chang e Miles (2004) relatam que os lipídeos provavelmente são utilizados durante a formação do corpo de frutificação. O ácido linolênico é o ácido graxo encontrado em maior proporção nos carpóforos. Os íons de enxofre, fósforo, potássio e magnésio estimulam o crescimento do *Pleurotus*. Os cátions de cálcio, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco são os elementos traços que podem suplementar um meio de cultivo para estes cogumelos. Com relação às vitaminas, biotina e tiamina são as mais indicadas para serem incorporadas ao cultivo.

2.3.2.8 Temperatura

A influência da temperatura, tanto no crescimento quanto na produção dos corpos de frutificação depende da espécie e das linhagens utilizadas, ou seja, cada espécie ou linhagem deve se encontrar dentro de uma faixa de temperatura ideal para o bom funcionamento do metabolismo do fungo. Dependendo da etapa de desenvolvimento do *Pleurotus*, é indispensável uma temperatura específica: para formação de esporo de 12 a 20°C, para germinação de esporo de 24 e 28°C e para o crescimento micelial entre 30 e 35°C (EIRA; BUENO, 2005).

2.3.2.9 Luz

A presença de luz é necessária para formação normal dos corpos de frutificação. Entretanto, o píleo (chapéu) de espécies de *Pleurotus*, podem ter sua coloração branca e brilhante alterada para opaca e escura, quando em presença de luz, pois há liberação de fenoloxidasas que oxidam fenóis e formam melanoidinas. (EIRA e BUENO, 2005).

2.3.3 Trocas gasosas

O *Pleurotus* é um fungo aeróbio, mas cresce quando coberto com plástico. Uma concentração de CO₂ de até 28% de volume estimula o crescimento desse fungo durante a fase vegetativa, sendo importante para a inibição do desenvolvimento de competidores (EIRA ; BUENO, 2005).

Durante a frutificação é necessária melhor aeração para evitar atraso na formação de primórdio ou deformação de carpóforos. A taxa de CO₂ deve ser inferior a 0,5% para não produzir carpóforos deformados. Cogumelos cultivados em câmaras com altos teores de CO₂ e com luminosidade deficiente resultam em corpos de frutificação com estipes longos e finos e píleos de pequenas dimensões. Esta frutificação anormal resulta em grandes prejuízos ao produtor porque não serve para a comercialização (RAJARATHNAM, 1996).

Para a produção de carpóforos saudáveis é necessário fazer a remoção do excesso de CO₂ e outros metabólicos voláteis auto-inibidores, por métodos de ventilação. No entanto, o vento forte e direto sobre os carpóforos também desfavorece o seu desenvolvimento (EIRA; BUENO, 2005).

2.4 Resíduos agroindustriais como matéria-prima para produção de cogumelos

Os resíduos agroindustriais são ricos em matéria orgânica. Alguns contêm elevadas concentrações de celulose, hemicelulose e lignina, sendo denominados compostos “lignocelulósicos”. Sua composição pode variar de acordo com o material, possuindo de 10 a 20 % de lignina, 20 a 30% de hemicelulose e 50% ou mais de celulose (CHAHAL et.al.; 1987).

Segundo Bonatti et al. (2004), a palha de trigo é o substrato mais tradicional para o cultivo de *Pleurotus* na Europa. A produtividade alcançada por esse substrato é boa suficiente para não precisar de complemento para elaboração do composto. A palha de arroz também é utilizada em grandes quantidades para o cultivo deste cogumelo. Palhas de outros cereais, como cevada, também apresentaram boa produtividade, ou então podem ser suplementadas com algum tipo de farelo, palhas ou até resíduos líquidos para aumentar a produtividade (RAGUNATHAN et al., 1996; CHANG e MILES, 2004; KALMIS et al., 2008). Serragem de diversas madeiras também pode ser utilizada para a produção de *Pleurotus sp*, suplementada ou não, mas possui baixa produtividade. Pode-se verificar, portanto, que vários são os substratos que podem ser utilizados e que mesmo substratos iguais, mas de origens diferentes, podem fornecer diferentes produtividades (BAYSAL et al., 2003; DAS, 2007).

2.4.1 Origem e utilização da água de maceração para produção de cogumelos

Os produtos derivados do milho são obtidos pelo processamento seco e úmido. No primeiro processo, o milho, após limpeza e secagem, é separado em endosperma e germe. O fluxo do endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais e o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo. Nesse processo é obtido farelo peletizado, flocos de milho pré-cozidos, gritz, sêmolas, farinhas, fubás, creme e canjica (ABIMILHO, 2009).

Na produção do milho por via úmida, após a limpeza e secagem, o milho é macerado, separado em germe, fibras e endosperma (Figura 3). A água utilizada na maceração (*steep corn liquor*) também chamada milhocina é destinada à estação de tratamento de efluentes que apresenta valores médios de DQO (Demanda Química de Oxigênio) de 14.000 mg.L⁻¹ e DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) de cerca de 11.000 mg.L⁻¹ (LOSS et al., 2009).

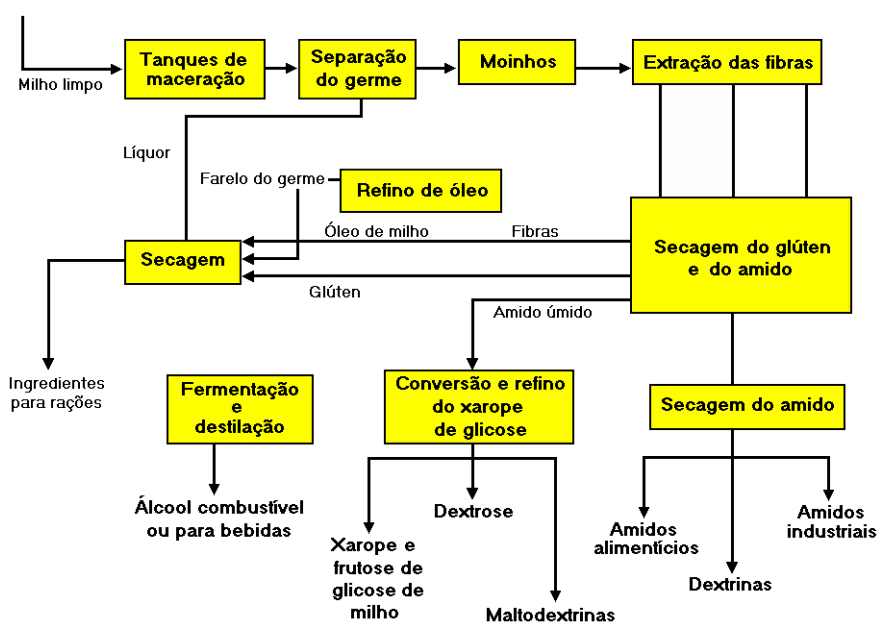


Figura 3 Fluxograma de produtos da cadeia do milho obtidos por processo úmido da agroindústria do milho. Fonte: ABIMILHO (2009).

Algumas indústrias utilizam a milhocina como fonte de energia na produção de celulose pela bactéria *Acetobacter xylinum* (Arai et al., 2003). No desenvolvimento de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus*, a milhocina vem sendo utilizada como fonte alternativa de nutrientes (GERN et al., 2008).

2.5 Micotoxinas e segurança alimentar na produção de cogumelos

A importância das micotoxinas está relacionada aos danos provocados à saúde humana e animal e prejuízos econômicos à agricultura. A contaminação dos cereais por fungos toxigênicos pode acontecer no período da pré-colheita, dependendo de fatores geográficos e climáticos, espécie de planta, manipulação na colheita, transporte, secagem, armazenamento e beneficiamento do grão.

Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, com perdas, de acordo com a estimativa da *Food and Agriculture Organization of the United Nation – FAO*, em torno de 25% dos grãos produzidos. No entanto a saúde pública considera 6 tipos de micotoxinas mais importantes como: aflatoxina (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), ocratoxina A, patulina, fumonisina, deoxinivalenol e zearalenona. Os problemas de saúde humana decorrentes de ação crônica das aflatoxinas no homem podem ser alterações do crescimento em jovens e crianças, distúrbios neurológicos, imunológicos e o aparecimento de câncer hepático. Esse risco se deve aos seus efeitos carcinogênicos, mutagênicos e hepáticos (DILKIN et al., 2000).

A zearalenona (ZEN) é produzida por *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium culmorum*. Acredita-se que em períodos de alta umidade há o favorecimento de incidência de (ZEN) no milho. Entretanto fatores bióticos e abióticos afetam o crescimento de *Fusarium* e a produção dessa micotoxina no milho está limitado a alguns países. Essa micotoxina apresenta similaridade de estrogênio e ação anabólica em várias espécies de animais, causando hiper-estrogênio e infertilidade em suínos, hiperplasias, vulvovaginite e perda embrionária (SEKIYAMA et Al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve por objetivo principal avaliar o processo de transformação biotecnológica de resíduos oriundos da cadeia do milho para a produção de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar sob aspecto, físico-química alguns subprodutos da cadeia do milho: palha de milho, sabugo e milhocina (efluente) da agroindústria de milho Cinderela, localizada na cidade de Cantagalo no estado do Paraná;
- Avaliar o desenvolvimento de espécies de *Pleurotus* e concentração de milhocina para a produção de cogumelos a partir dos resíduos caracterizados;
- Analisar a composição físico-química e nutricional dos corpos de frutificação;
- Avaliar a presença de micotoxinas nos cogumelos, uma vez que os resíduos do processamento de milho podem apresentar este tipo de contaminante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A produção do inóculo e cogumelos foi desenvolvida em laboratório com estufa e câmara de cultivo. As análises físicas e químicas foram executadas no Laqua (Laboratório de águas e alimentos), Laboratório de Solos e no Laboratório de Química, todos situados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Pato Branco – PR. As análises de determinação de micotoxinas e fibras alimentares foram realizadas nos Laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.1 Material

4.1.1 Milhocina

A indústria Cinderela, localizada no município de Cantagalo, PR, tem como objetivo o processamento dos grãos de milho por via seca e úmida, tendo como produtos: farinha de fubá, biju, quirera. Durante o processo há geração do efluente de milho, também denominado água de maceração, milhocina ou *corn steep liquor*.

O processamento tem início com o transporte de milho para os silos e para canjiqueira, onde os grãos são triturados para separação do germe e da quirera. O restante segue para a etapa de maceração. Na maceração são utilizados cinco tanques (T1, T2, T3, T4 e T5) de 3 m³ cada, onde o milho fica submerso em água pelo período de um dia em cada tanque. A cada troca de tanque a água de maceração é destinada para as lagoas de estabilização.

Para o desenvolvimento presente estudo, foi utilizado o efluente após 5 dias de fermentação, antes de ser transportado para lagoas de estabilização. O efluente foi acondicionado em bombonas de PEBD (polietileno de baixa densidade) de capacidade de 5 litros e armazenado em garrafas PET (politereftalato de etila) em freezer a -18°C.

4.1.2 Substrato palha e sabugo

Foram utilizados dois tipos de suporte sólido nos substratos, palha de milho cortada em pedaços de 2 cm e sabugo de milho triturado até atingir 5 mesh. Após processados ambos os substratos foram colocados em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 2 horas. Os resíduos foram cedidos por agricultores da região.

4.1.3 Microorganismos

As linhagens de *Pleurotus ostreatus* (EB 016) foram cedidas pela Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal. O fungo *Pleurotus florida* (PSP 1.01) foi cedido pela Fungibrás. As culturas foram mantidas em placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Agar (BDA) à temperatura de 4°C.

4.1.4 Produção do inóculo ou semente

A produção de sementes de *Pleurotus ostreatus* e *florida* foi feita utilizando-se grãos de sorgo como substrato e suporte para crescimento micelial. Os grãos foram lavados com água corrente e aquecidos a 90°C durante 30 minutos em água destilada. O extrato resultante foi drenado e os grãos suplementados com CaCO_3 e CaSO_4 nas proporções 0,35% e 1,3%, respectivamente. Os grãos de sorgo foram embalados e autoclavados a 121°C durante 1 hora. (URBEN e OLIVEIRA, 2004).

Após a esterilização, o substrato contido em cada embalagem foi inoculado com 5 discos de ágar de 8 mm de diâmetro contendo micélio e incubado em estufa, a 30°C e em ausência de luz por 15 dias para colonização. Após esta etapa foi mantido sob refrigeração.

4.2 Etapas de preparação para o cultivo

Na Figura 4 está descrito o fluxograma das etapas de produção do *Pleurotus spp*, que mostra desde o início até o término do desenvolvimento experimental de cada ensaio realizado: ensaio A, ensaio B e estudo cinético.

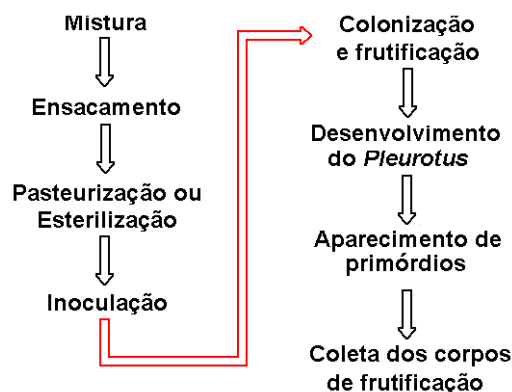


Figura 4 – Fluxograma das etapas de produção de *Pleurotus* spp.

4.2.1 Mistura e ensacamento

A mistura palha(150g) e milhocina (efluente), sabugo(150g) e milhocina, foram acondicionadas em bandejas de polipropileno, correspondente a cada composição e diferentes concentrações de milhocina 0, 25, 50, 75 e 100% (V/V) em água, então foram homogeneizadas manualmente, deixando em repouso por um período de aproximadamente 24 horas, logo em seguida foi drenado o excesso de água, sendo o material resultante colocado em saco de plástico de polipropileno e selado com tampão para garantir as trocas gasosas do processo de bioconversão. Considerando o conteúdo de água extraído, este procedimento resultou em um composto com umidade residual entre 60 e 70%. Após este procedimento, o saco contendo o composto-base hidratado foi encaminhado para o processo de esterilização.

4.2.2 Esterilização

Na etapa de esterilização os sacos de polipropileno contendo o composto base foram autoclavados a 121°C por um período de 1 hora e, em seguida, transferidos para uma câmara de fluxo laminar permanecendo, até atingir temperatura ambiente.

4.2.3 Inoculação

Após a etapa de esterilização, foi inserido o inóculo na proporção 5% (m/m) tendo como base o peso seco da amostra (150g), sendo a mistura homogeneizada e transferida para a câmara de cultivo, para o desenvolvimento do micélio e dos corpos de frutificação.

4.2.4 Incubação e frutificação

Na câmara de incubação e cultivo os pacotes contendo o material foram mantidos numa faixa de temperatura de 20 a 25 °C com teor de umidade do ar entre 70 e 75%. Após o período de colonização, cujo término se verificou pelo grau de colonização do substrato, a umidade do ar e a temperatura foram alteradas para faixa de 90 a 95% e 15 a 20 °C, respectivamente, para induzir a frutificação ou aparecimentos dos primórdios de cogumelos.

4.2.5 Colheita e processamento

Para avaliação da produtividade foi considerada a colheita do primeiro ciclo. O ponto de colheita foi identificado de forma visual, quando os corpos de frutificação atingiram aproximadamente 5 cm de píleo. Os corpos de frutificação foram secos em estufa a 60 °C até peso constante, triturados em liquidificador e armazenados sob refrigeração a 4 °C para posterior análise.

4.3 Preparações do substrato e condições de cultivo

O trabalho foi dividido em dois experimentos. Em um primeiro momento, denominado Ensaio A, foi avaliado a porcentagem de milhocina no substrato palha e sabugo que proporcionaram o maior rendimento biológico. Após se definir a melhor porcentagem de milhocina para o desenvolvimento do fungo, foi definido o Ensaio B, onde foi feito um planejamento fatorial 2^3 para se avaliar dois diferentes substratos, palha e sabugo, dois níveis de pH e duas espécies de fungos.

4.3.1 Estudo e obtenção do composto base (Ensaio A)

No Ensaio A foi avaliada a melhor concentração de milhocina, em palha e sabugo, para o desenvolvimento do fungo. A palha de milho foi cortada em pedaços de 2 x 2 cm e o sabugo foi triturado até atingir granulometria de 5 mesh. A palha e o sabugo foram hidratados com diferentes concentrações de milhocina, com porcentagens de 0, 25, 50, 75 e 100% de milhocina em água. Para a hidratação, a mistura foi deixada em repouso por 24 horas e, então, drenada. A parte sólida já hidratada (substrato), com teor de umidade entre 70 e 75%, foi colocada em sacos plásticos de polipropileno e autoclavada a 121 °C por uma hora. No dia seguinte à esterilização, os sacos com substratos à temperatura ambiente foram inoculados

com sementes de *P. ostreatus* em uma proporção de 5% (m/m) em relação ao substrato seco. A mistura homogeneizada foi então incubada em uma câmara de cultivo com temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$, conforme (figura 5). Após o período de colonização, os sacos foram abertos e o substrato incubado em um ambiente à $20 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar entre $85 \pm 5\%$ e $90 \pm 5\%$ em câmara de cultivo. A climatização desta foi controlada por umidificador ultra-sônico, lâmpadas incandescentes e termo higrômetro digital conforme a figura abaixo.

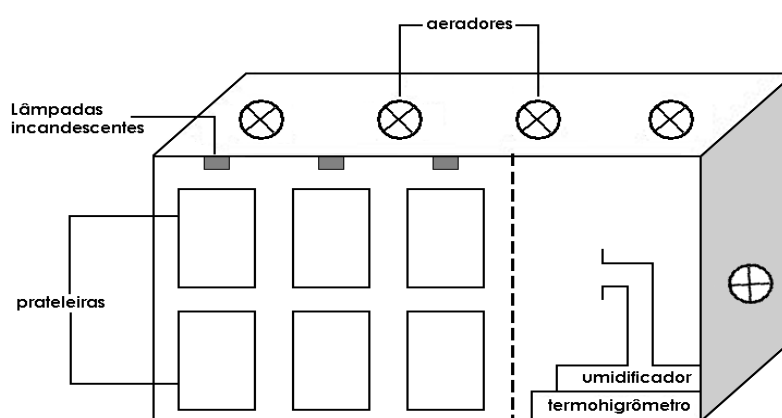


Figura 5 – Diagrama esquemático da câmara de cultivo

4.3.2 Planejamento fatorial 2^3 (Ensaio B)

Após avaliação dos resultados do Ensaio A, onde foi definida e fixada a melhor concentração de milhocina na solução de hidratação do substrato, foi feito um planejamento fatorial 2^3 para se avaliar os níveis +1 e -1 em três variáveis: pH, 5,0 e 6,0, concentração do efluente, 0 e 50% e espécie de fungo, *P. ostreatus* (-1) e *P. florida* (+1) (Tabela 1). Os pontos máximos e mínimos de concentração de substrato e pH foram codificados como +1 e -1, respectivamente.

Tabela 1 – Representação dos níveis e fatores avaliados no planejamento fatorial 2^3 utilizados para a produção de *Pleurotus spp*

Fatores	Níveis	
	-1	+1
Concentração de milhocina (% V/V)	0	50
Valor de Ph	5	6
Espécie de <i>Pleurotus</i>	<i>Ostreatus</i>	<i>florida</i>

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 sem ponto central

Ensaio	Concentração de milhocina (% V/V)	pH	Espécie de <i>pleurotus</i>
B1	-1 (0 %)	-1 (5,0)	-1
B2	+1 (50 %)	-1 (5,0)	-1
B3	-1 (0 %)	+1 (6,0)	-1
B4	+1 (50 %)	+1 (6,0)	-1
B5	-1 (0 %)	-1 (5,0)	+1
B6	+1 (50 %)	-1 (5,0)	+1
B7	-1 (0 %)	+1 (6,0)	+1
B8	+1 (50 %)	+1 (6,0)	+1

4.4 Colheita e processamento

Para avaliação da produtividade foi determinada a Eficiência Biológica (EB) da colheita do primeiro ciclo. A EB representa a porcentagem de conversão do substrato seco em cogumelos secos, obtida através de uma fórmula simples, originalmente desenvolvida pela indústria de *Agaricus bisporus* (Equação 1) (Moda, 2003). O ponto de colheita foi determinado de forma visual, quando os corpos de frutificação atingiram aproximadamente 5 cm de píleo. Os corpos de frutificação foram secos em estufa a 60°C até peso constante, triturados em liquidificador e armazenados sob refrigeração a 4°C para posterior análise.

$$\text{Eficiência biológica (EB)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

m_1 – massa de cogumelo fresco

m_2 – massa de substrato utilizado

4.5 Metodologias das análises físicas e químicas.

Os cogumelos foram pesados, desidratados a 55°C por 36 horas aproximadamente, triturados em mini processador para obtenção da granulometria necessária para cada tipo de análise, embalados em potes de polietileno, fechados e armazenados a temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$ (SILVA et al., 2007). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

Para a caracterização do efluente foram realizadas as análises de DQO, DBO, fenóis, sólidos totais, sólidos suspensos totais e lipídios, de acordo com método descrita em APHA (1998) e açúcares totais e nitrogênio total de acordo com método descrita em Adolfo Lutz (1985).

A determinação de carbono orgânico foi feita segundo método proposto por Tedesco et al. (1995) e o teor de nitrogênio total foi determinado pelo método Kjeldahl (AOAC, 2000). O teor de proteína bruta foi determinado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 4,38, segundo método descrito em Adolfo Lutz (1985).

O teor de umidade dos substratos e dos corpos de frutificação foi avaliado pelo método gravimétrico, segundo descrito na AOAC (2000). A quantidade de cinzas e a fração lipídica também foi determinada por método gravimétrico, segundo descrito em Adolfo Lutz (1985).

O teor de fibra bruta foi determinado por digestão ácida e básica, segundo método descrito em Adolfo Lutz (1985). Os valores de fibra dietética dos corpos de frutificação foram avaliados por uma combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos (AOAC, 2000).

As análises para determinação de compostos fenólicos foram feitas, utilizando-se como padrão ácido gálico e o reagente Folin-Ciocalteu, segundo método descrito em AOAC (2000).

As micotoxinas analisadas foram Aflatoxinas Totais e Zearalenona, utilizando-se o método imunológico Elisa, segundo descrito por ALLEN; SMITH (1987). A determinação dos teores de cálcio, potássio e magnésio foi feita utilizando-se equipamento de absorção atômica marca GBC modelo Avanta.

4.6 Estudo cinético do processo de bioconversão

Após os resultados experimentais que indicaram as melhores condições para produção otimizada de *Pleurotus*, os mesmos foram reproduzidos em duplicatas constituído de 5 pacotes, usando a mesma composição, temperatura e umidade, seguida da metodologia descrita nos itens (4.2.1 a 4.2.5). Todos os pacotes foram incubados e levados para câmara de cultivo, sendo semanalmente registrado o crescimento micelial e coletado material para análises físicas e químicas (C/N, proteína, fibra bruta, lipídios). Desta forma, foi possível monitorar a degradação do composto-base pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.

Na primeira etapa do monitoramento do processo de bioconversão, foram escolhidas as melhores condições do Ensaio B e preparados cinco pacotes em duplicatas, denominados PC1 a PC5. Todos os pacotes foram preparados nas mesmas condições de umidade, temperatura, quantidade de composto base e semente do cogumelo e, então, incubados na câmara de cultivo. Esse estudo avaliou o desenvolvimento da primeira semana, seguindo assim uma rotina de análises até a etapa do aparecimento dos primórdios.

Na segunda etapa desse estudo os cogumelos foram colhidos e pesados, para se determinar a eficiência biológica, e desidratados para posterior caracterização físico-química. Desta forma objetivamos monitorar a degradação do composto base pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.

4.7 Análises estatísticas

Os cálculos estatísticos foram realizados segundo Barros; Scarminio e Bruns (2003) e as superfícies de respostas foram obtidas com o auxílio do software Statgraphics Plus 4.1™.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização físico-química do efluente do milho.

O efluente do milho (milhocina) utilizado para umedecer o substrato foi caracterizado e seus resultados estão representados na Tabela 3. Destacam-se os elevados teores de DQO e DBO, indicando a necessidade de aproveitamento e/ou tratamento desse efluente antes de seu descarte em corpos d'água.

Tabela 3 – Características físico-químicas da milhocina

Parâmetros	Valor
pH	4,5
Açúcares (g/100g)	0,1
DQO (mg.L ⁻¹)	14.670
DBO ₅ (mg.L ⁻¹)	11.412
Fenóis totais (mg.L ⁻¹)	346
Nitrogênio total (mg.L ⁻¹)	1026
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	7819
Sólidos suspensos (mg.L ⁻¹)	0,70
Óleos e graxas (mg.L ⁻¹)	8,80
DBO ₅ / DQO	0,78

O nitrogênio total representa os valores de nitrogênio orgânico e amônia. O valor de pH do efluente tem relação direta com a distribuição da amônia em forma de íon (NH₄⁺) ou livre (NH₃). Esse pH de 4,5 do referido efluente indica que a maior parte da amônia existente está em sua forma ionizada. A toxicidade da amônia está relacionada diretamente com a mortalidade dos peixes, uma vez que ionizada é tóxica a estes organismos.

É importante salientar o fato de o pH encontrar-se abaixo da faixa permitida pela Resolução CONAMA 357/2005 que prevê uma faixa de pH 5 a 9, podendo afetar o crescimento de microorganismos dificultando a degradação da matéria orgânica presente no meio.

5.2 Resultados do Ensaio A – estudo e caracterização do composto base

Na Tabela 4 estão representados os resultados dos ensaios de desenvolvimento de *Pleurotus ostreatus* onde foram utilizados como substrato sabugo e palha, hidratados com milhocina, em diferentes concentrações, com pH ajustado em 6,0 com CaCO_3 em todos os experimentos.

Tabela 4 - Resultados de produção de cogumelo fresco e eficiência biológica dos substratos palha e sabugo em relação a concentração do efluente para produção do *Pleurotus ostreatus*.

Ensaio	Milhocina (%)	X ₁ palha (g)	X ₂ palha (%)	Y ₁ sabugo (g)	Y ₂ sabugo (%)
A1	0	105,73 ± 1,77	70,48 ± 1,12	34,53 ± 11,06	23,00 ± 7,35
A2	25	102,35 ± 13,05	68,59 ± 8,18	57,19 ± 25,97	38,13 ± 17,32
A3	50	114,09 ± 14,54	76,60 ± 9,69	54,32 ± 2,08	36,21 ± 1,38
A4	75	98,31 ± 19,12	65,53 ± 12,75	n. a	n. a
A5	100	115,63 ± 22,15	77,08 ± 14,77	43,56 ± 4,96	29,04 ± 3,30

X₁: massa de cogumelo fresco cultivado na palha da espiga de milho;

X₂: eficiência biológica;

Y₁: massa de cogumelo fresco cultivada no sabugo de milho;

Y₂: eficiência biológica do sabugo;

n.a: não analisado devido à contaminação dos meios.

Nos ensaios com 0% de milhocina ambos os substratos (palha e sabugo), não colonizaram completamente. Com 100% de milhocina, observou uma colonização completa, em compensação, apresentou um aumento significativo de contaminação. Assim, com 50% de milhocina, conseguimos o melhor resultado isento de contaminação.

Em geral, os primórdios surgiram após 33 dias, e a primeira colheita ocorreu 5 dias após o seu surgimento. O melhor resultado de EB foi obtido nos experimentos que utilizaram composto a base de palha + efluente sem diluição (experimento A5), tendo obtido em média 115,63g, correspondendo a 77,08% de eficiência biológica. Nos ensaios A5 com sabugo, observou-se contaminação com um tipo de microrganismo não identificado. O meio mais enriquecido, além de ter favorecido o crescimento do *Pleurotus*, também estimulou o crescimento de outros microrganismos.

As diferenças observadas entre os resultados obtidos com 0 e 100% de efluente foram avaliadas através do teste *t* pela comparação das médias, utilizando o desvio padrão agregado, com 95% de confiança e 2 graus de liberdade. Os cálculos mostraram para ambos os compostos, palha do milho + efluente e sabugo do milho + efluente, que não existem diferenças significativas entre as eficiências biológicas obtidas, sugerindo que, nestas condições, o efluente não estimula a produtividade de cogumelos.

Comparando-se entre os dois tipos de compostos estudados, observou-se que todos os resultados individuais se revelaram diferentes estatisticamente ao nível de confiança de 95%, sugerindo que as maiores eficiências observadas podem ser atribuídas ao substrato sólido, neste caso, a palha triturada. É importante salientar também que o grau de contaminação nos experimentos foi maior para o composto a base de sabugo. Este comportamento pode estar relacionado com fenômenos de absorção de água. O sabugo de milho absorve mais água que a palha, então no sabugo há mais água livre que na palha, favorecendo o crescimento de microrganismos que se desenvolvem em meios com maior teor de atividade de água. Oliveira et al. (2007) trabalharam com culturas em estado sólido em diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, esses resíduos absorvem água, com maior ou menor grau, de acordo com a sua composição.

Na figura 6 estão as fotos dos dois compostos base já hidratados e colonizados. Pode ser observado que o composto palha + milhocina apresenta melhor resultado de eficiência biológica, está mais colonizado.



a) sabugo+ milhocina +*Pleurotus*



b) palha+ milhocina +*Pleurotus*

Figura 6 - Resultados experimentais com sabugo, palha e *Pleurotus ostreatus* na fase de desenvolvimento miceliar: a) composto base com sabugo; b) composto base com palha de milho.

Esses resultados experimentais serviram de base para se definir o melhor substrato (palha) e a melhor faixa de concentração de efluente (0-50%). Em função da grande variabilidade observada nestes experimentos, possível interação entre os fatores experimentais estudados e para entender melhor o efeito do efluente sobre a eficiência biológica, o planejamento foi expandido através da inclusão de mais dois fatores experimentais de potencial relevância. Desta forma, foi conduzido um estudo complementar, Ensaio B, baseado em um planejamento fatorial completo 2^3 , onde foram avaliadas as variáveis: concentração de efluente, valor de pH e espécie de fungo.

Dias et al. (2003) cultivaram *Pleurotus sajor-caju* em substratos preparados com diferentes resíduos agrícolas, como palha de feijão, palha de milho, casca de café, e os mesmos substratos citados enriquecidos com calcário 2%, gesso 2% e 10% de farelo de trigo. Os substratos foram inoculados com 2% de semente, incubados a 24 °C e umidade de 80%. Os melhores resultados foram obtidos com substratos de palha de feijão, palha de feijão enriquecida e palha de milho enriquecida, apresentando eficiência biológica de 85,7, 81,4 e 83,4% respectivamente. A palha de feijão foi considerada o melhor resíduo para a produção desse cogumelo porque apresentou a melhor eficiência biológica, sem a necessidade de enriquecimento.

5.3 Resultados do Ensaio B - Planejamento fatorial 2^3

Após análise dos resultados obtidos no Ensaio A, concluiu-se que o meio contendo 50% de milhocina seria o ideal para a produção do *pleurotus*, devido ao fato de o mesmo não ter apresentado contaminação. Então, foi definido um experimento com planejamento fatorial completo com três variáveis onde foram estudados os níveis máximos e mínimos, +1 e -1, respectivamente, para cada variável: concentração de efluente, pH e espécie de fungo, conforme explicado na Tabela 1.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados referentes à interação dos níveis e eficiência biológica com os desvios padrões das duplicatas. Na análise das estimativas dos efeitos calculados, foram considerados estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95%, os efeitos cujos valores absolutos foram superiores a $t_8 \times s_{efeito}$, ou seja maiores que o erro padrão dos efeitos

multiplicados pelo valor tabelado de t (distribuição de Student, no caso em questão, para 95% de confiança e 8 graus de liberdade, $t = 2,306$).

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental e resultados de rendimento médio em (g), eficiência biológica dos corpos de frutificação dos cogumelos

Ensaio	Concentração de milhocina (%)	pH	Espécie	Eficiência Biológica (%)		$\bar{y}$	s^2	S
B1	0	5,0	<i>P. ostreatus</i>	22,76	21,58	22,17	0,69	0,83
B2	50	5,0	<i>P. ostreatus</i>	67,59	50,76	59,17	141,8	11,91
B3	0	6,0	<i>P. ostreatus</i>	22,84	19,86	21,35	4,45	2,11
B4	50	6,0	<i>P. ostreatus</i>	39,78	38,04	38,91	1,51	1,23
B5	0	5,0	<i>P. florida</i>	41,51	26,50	34,01	112,57	10,61
B6	50	5,0	<i>P. florida</i>	74,15	91,12	82,64	141,61	11,90
B7	0	6,0	<i>P. florida</i>	25,62	21,20	23,41	9,73	3,12
B8	50	6,0	<i>P. florida</i>	50,50	34,30	42,40	131,10	11,45

$\bar{y}$ – valor médio da eficiência biológica;

s^2 – estimativa da variância;

s – estimativa do desvio padrão amostral.

Na Tabela 6 estão os valores do cálculo do efeito de cada variável separadamente e de suas interações secundárias e terciárias.

Tabela 6 – Efeitos calculados para o planejamento 2^3 relativos aos estudos de obtenção de composto-base para a produção de cogumelos *Pleurotus spp.*

Média global dos efeitos principais:	40,50 $\pm$ 2,06
A (efluente)	30,54 $\pm$ 4,12*
B (pH)	-17,98 $\pm$ 4,12*
C (fungo)	10,21 $\pm$ 4,12*
Efeitos de interação:	
AB	-12,27 $\pm$ 4,12*
AC	3,26 $\pm$ 4,12
BC	-7,44 $\pm$ 4,12
ABC	-2,55 $\pm$ 4,12

*efeitos significativos a 95% de confiança

Os efeitos marcados com asterisco foram considerados estatisticamente significativos. Para complementar esta interpretação foi construído um gráfico de Pareto (Figura 7), no qual os efeitos significativos excedem a linha vertical.

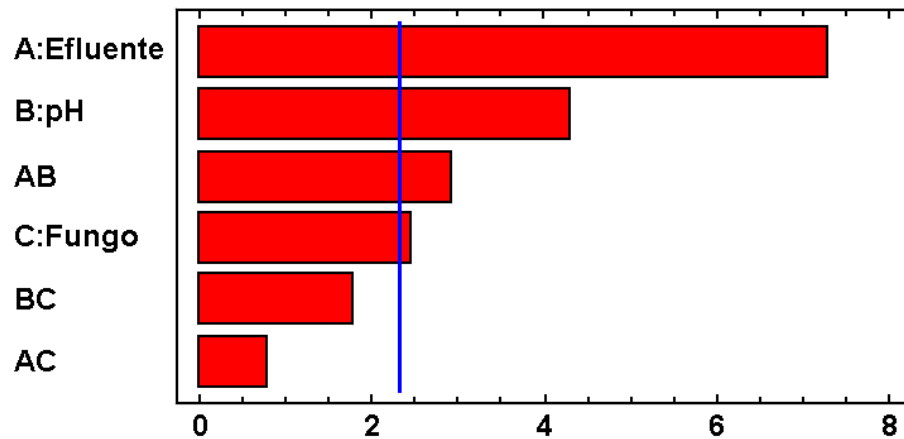


Figura 7 – Gráfico de Pareto das interações de primeira, segunda ordem

Os resultados expressos na Tabela 6 e no gráfico de Pareto (Figura 7) mostram que todos os efeitos principais e o efeito de interação efluente x pH são significativos. Apesar da variável espécie de fungo apresentar um efeito significativo, este se aproxima muito do efeito padrão, indicando que a espécie de fungo possui pouca influência sobre a eficiência biológica. Neste contexto, as variáveis que mais afetam esta resposta são o efluente, que apresentou um efeito de + 30,54%, e o pH, que apresentou um efeito de -17,98 %.

Como o efeito de interação efluente e pH é significativo, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. Desta forma, foi construído um diagrama contendo as respostas médias em todas as combinações das variáveis para interpretação dos resultados (Figura 8).

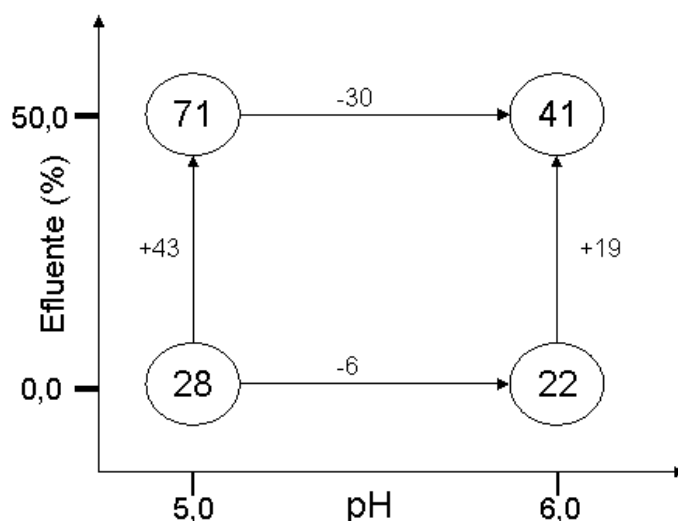


Figura 8 - Diagrama para interpretação geométrica dos resultados do planejamento fatorial 2^3 . Os valores nos vértices do quadrado são as respostas médias de E.B.

Examinando o diagrama da figura 8, podemos realizar as seguintes conjecturas:

- Elevando o pH de 5,0 para 6,0 induzimos uma diminuição na eficiência biológica, mas esse efeito é muito mais pronunciado na presença do efluente, onde há redução de 30 pontos percentuais contra 6, na ausência de efluente;
- O efluente diluído a 50%, quando agregado ao composto, afeta positivamente a eficiência biológica, sendo este efeito altamente significativo chegando a acrescentar 43% de eficiência biológica a pH 5,0 contra 19% em pH 6,0.
- Os maiores rendimentos (71%, em média) são obtidos em pH 5,0 em integração do efluente diluído ao composto.

Para ilustrar melhor os efeitos de interação entre os fatores Efluente e pH foi construída a superfície de resposta ilustrada pela Figura 9.

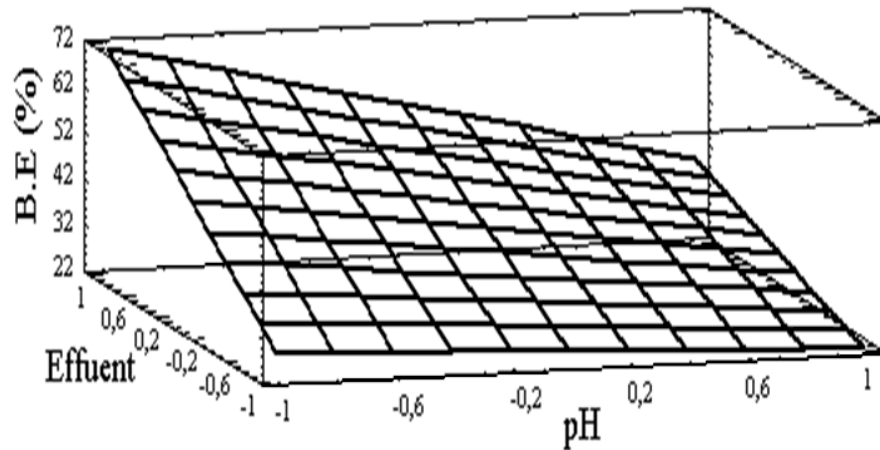


Figura 9 - Influência da concentração de efluente e pH na eficiência biológica

A figura acima apresenta os resultados padronizados da influência da concentração do efluente e do pH na eficiência biológica. Os valores destes parâmetros encontram-se descritos na tabela 2.

Analisando-se os gráficos de superfície de resposta, nota-se que, devido à inclinação da superfície, a variável que mais interferiu na eficiência biológica do fungo foi a concentração de efluente no meio. Apesar de ter apresentado significância nos resultados, as variáveis pH e espécie de fungo mostraram ter menor influência na produtividade.

O resultados experimentais do planejamento 2^3 , estão representados na (Figura 10), desde o cultivo dos cogumelos na câmara de cultivo até os corpos de frutificação.



a)



b)

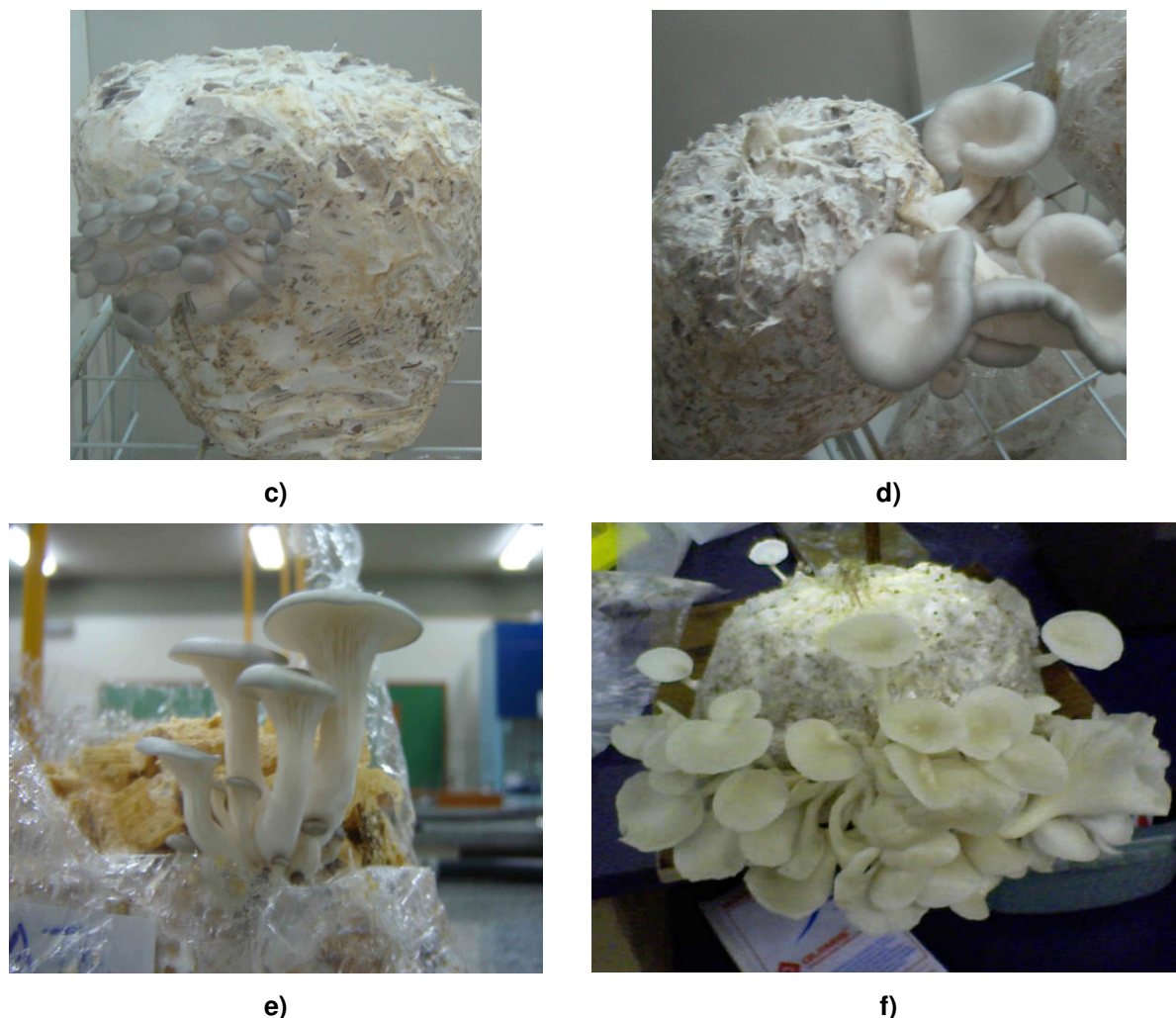


Figura 10 – a) Incubação dos pacotes; b) abertura dos pacotes; c) aparecimento dos primórdios; d) desenvolvimento dos corpos de frutificação; e) cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*; f) cogumelos comestíveis *Pleurotus florida*

5.4 Estudos cinéticos

Após definir as melhores condições de crescimento do *Pleurotus* nos ensaios A e B, os cogumelos foram caracterizados física e quimicamente para estudo cinético do processo de bioconversão.

No início do estudo cinético o PC1 apresentou umidade do composto base de $27,86 \pm 0,93\%$. No final do estudo, PC5, atingiu teor de umidade em torno de $33,1 \pm 1,15\%$, tendo uma variação de $5,3\%$, do início ao final do estudo, isso se deve a mudanças de temperatura e umidade relativa a cada etapa do cultivo do cogumelo.

Quanto ao crescimento micelial, na primeira semana observou-se um leve crescimento. Na segunda semana houve 35% de crescimento micelial. Na terceira semana o substrato apresentava colonização de 80% . Na quinta semana

apareceram os primórdios. Após três dias os cogumelos foram coletados, desidratados e armazenados para as análises de caracterização. A Tabela 7 representa as análises do composto base, com o desenvolvimento micelial.

Tabela 7 - Resultados das análises físicas e químicas dos compostos base com o desenvolvimento micelial

P	C/N	Nitrogênio (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)	Fibra bruta (%)	Cinzas (%)
PC1 (7 dias)	87	0,53 ± 0,02	3,31 ± 0,13	1,03 ± 0,08	30,34 ± 0,05	0,97 ± 0,15
PC2 (14 dias)	74	0,35 ± 0,05	2,25 ± 0,30	0,28 ± 0,02	n.a	1,53 ± 0,11
PC3 (21 dias)	74	0,37 ± 0,01	2,30 ± 0,01	0,31 ± 0,04	28,50 ± 0,5	1,06 ± 0,08
PC4 (28 dias)	31	0,45 ± 0,08	2,83 ± 0,53	0,31 ± 0,04	n.a	1,37 ± 0,12
PC5 (35 dias)	15	0,47 ± 0,01	2,93 ± 0,09	0,47 ± 0,01	14,86 ± 1,09	1,33 ± 0,09

P - pacotes utilizados estudo cinético;

n.a.: não analisado devido à contaminação dos meios

Analisando os resultados apresentados na Tabela 7, podemos ver que algumas análises não apresentaram variação ao longo do período estudado, ou seja, as amostras não apresentaram diferenças nos parâmetros nitrogênio, proteína, lipídios e cinzas. Entretanto, os parâmetros C/N e fibra bruta foram claramente afetados, sofrendo decréscimo constante ao longo do processo, indicando que o fungo estava utilizando a fibra bruta como fonte de energia. Esta relação foi caracterizada pela relação linear apresentada pela Figura 11.

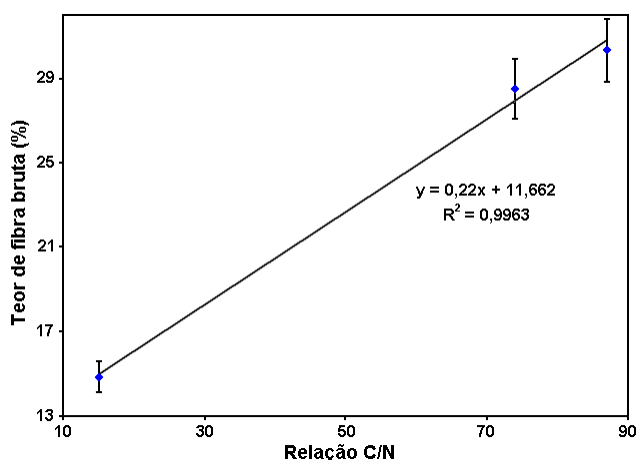


Figura 11 – Relação linear entre o teor de fibra bruta e relação C/N

Uma possível explicação para o processo pode estar relacionada com a degradação do material lignocelulósico deste substrato pela ação de enzimas lignocelulolíticas liberadas pelo fungo, com liberação de compostos de carbono e conseqüente alteração da relação C/N (RAGUNATHAN et al., 1996). Neste contexto, é interessante salientar que o composto residual gerado torna-se, então, um substrato com composição, em termos de carbono e nitrogênio muito próximo daquelas exigida por outros cogumelos, como por exemplo, *Agaricus blazei* (Chang e Milles, 2004).

5.5 Caracterização dos corpos de frutificação

Os corpos de frutificação foram desidratados para avaliação de suas características físicas e químicas. Foram feitas as análises de teor de umidade, proteína, lipídios, fibra bruta e carboidratos. Na Figura 12 está registrado o momento da colheita dos cogumelos e a foto dos mesmos. Na Tabela 8 estão dispostos os resultados de caracterização físico-química do *Pleurotus ostreatus*.



Figura 12 - a) Coleta dos cogumelos; b) corpos de frutificação do *Pleurotus ostreatus*

Tabela 8 - Caracterização físico-química de *Pleurotus ostreatus*, resultados em base seca

Parâmetros	Resultados
Umidade (%)	92,18 ± 0,17
Proteína (%)	13,50 ± 0,60
Lipídeos (%)	1,00 ± 0,30
Carboidratos totais (%)	65,76 ± 0,16
Cinzas (%)	4,56 ± 0,30
Fibra bruta (%)	15,18 ± 0,01
Fibra alimentar (%)	34,60 ± 0,08
Valor calórico (kcal/100g)	25,48 ± 0,08

A caracterização físico-química obtida neste experimento está de acordo com os resultados apresentados por Kalmis et al. (2008), que cultivaram *Pleurotus ostreatus* no efluente da trituração da azeitona e encontraram valores de umidade entre 73,7 e 90,8%, de proteína entre 10,5 e 30,4%, de lipídios entre 1,6 e 2,2%, carboidratos totais entre 57,6 e 81,8%, fibra bruta entre 7,5 e 8,7% e cinzas entre 6,1 e 9,8%. Também foram realizados nos cogumelos obtidos nos experimentos análises dos teores de fibras solúveis e insolúveis, que apresentaram resultados de 19,42% e 15,18%, respectivamente. Esses teores foram contabilizados no teor de carboidratos totais.

Chang e Miles (2004) caracterizaram diferentes espécies de *Pleurotus* e encontraram valores de fibra bruta entre 7,4 e 27,6%, consideradas componentes importantes para uma dieta balanceada. Verificaram também, em corpos de frutificação, que os teores de potássio, fósforo, sódio, cálcio e magnésio contribuem em torno de 56 a 70% das cinzas, sendo o potássio o mineral mais abundante, com aproximadamente 45% do total destas. O cálcio e sódio estão presentes em concentrações semelhantes em todos os cogumelos exceto para *Lentinus edodes*, que apresenta maior concentração de cálcio. Abaixo, na tabela 9 encontram-se os resultados de macronutrientes para o *Pleurotus ostreatus*.

Tabela 9 - Caracterização dos macronutrientes em *Pleurotus ostreatus*, resultados em base seca

Parâmetros (mg/L)	Resultados
Sódio	3,10 ± 0,10
Fósforo	0,31 ± 0,05
Potássio	3,65 ± 0,02
Cálcio	0,36 ± 0,10
Magnésio	1,90 ± 0,02

5.5.1 Resultados das análises de micotoxinas

Os resultados das análises de micotoxinas dos corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* cultivados no presente experimento estão apresentados na Tabela 10. O Brasil não possui uma regulamentação específica em relação aos teores de micotoxinas presentes em cogumelos, mas como foram utilizados resíduos da cadeia do milho para o preparo do substrato, foi adotado como padrão, valores determinados para milho, conforme Resolução RDC N° 274, de 15 de outubro de 2002, para determinação de aflatoxina.

Tabela 10 – Resultados da presença de micotoxinas nos corpos de frutificação do cogumelo *Pleurotus ostreatus*

Micotoxina	<i>P. ostreatus</i>	Limite 1	Limite 2
Aflatoxina (µg/kg)	13,3	20,0	50,0
Zearalenona (µg/kg)	84,2	-	30 a 1000

Limite 1: Limite máximo estabelecido para o milho na Legislação brasileira;
 Limite 2: Limite máximo estabelecido para o milho na legislação americana.

Os resultados das análises mostraram que, para aflatoxina, a amostra apresentou teores inferiores aos limites estabelecidos pela legislação brasileira e americana. Já para a zearalenona, a legislação brasileira não apresenta limite. Mas se considerarmos a legislação americana os limites estão dentro do permitido. A União Européia regulamenta a tolerância de 60 a 200 µg/kg de zearalenona na ração animal, mas a presença dessa micotoxina em alimentos, ou níveis residuais em alimentação humana não está autorizada (BRIONEZ-REYES, GOMEZ-MARTINEZ E CUEVA-ROLON, 2007).

A presença dessas micotoxinas nos cogumelos pode ser devida à contaminação da palha e/ou do sabugo do milho e/ou da milhocina utilizada. Uma vez que os cogumelos absorvem algumas substâncias do substrato, esses

resultados indicam a importância em se avaliar a presença de compostos tóxicos tanto no substrato quanto nos corpos de frutificação.

5.5.2 Compostos fenólicos totais

Os teores dos compostos fenólicos dos corpos de frutificação estão correlacionados com as propriedades antioxidantes dos cogumelos. Neste experimento com a palha de milho e milhocina 50 %, utilizando como inóculo o fungo *Pleurotus ostreatus*, fez-se as análises nos cogumelos secos e o teor de compostos fenólicos encontrado foi $2,0 \text{ mg.g}^{-1}$. Oliveira et al. (2007), cultivaram *Pleurotus pulmonarius* em diversos substratos e obtiveram teor de compostos fenólicos totais entre 5,9 e $6,75 \text{ mg.g}^{-1}$ para o cogumelo seco. Os autores não observaram diferença estatística entre os diferentes meios cultivados.

Cheung; OOI, (2002) estudaram a atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos totais em corpos de frutificação em *Lentinus edodes* e *Volvariella volvacea*. Os compostos foram extraídos em diferentes solventes como éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água. A melhor eficiência de extração foi com utilização do metanol, apresentando um resultado entre 4,79 e 15 mg.g^{-1} , os outros solventes não apresentaram resultados significativos.

CONCLUSÕES

Os resíduos milhocina, palha do sabugo do milho e sabugo de milho podem ser utilizados para o desenvolvimento do *Pleurotus spp*, minimizando assim o impacto ambiental causado pelo descarte dos mesmos ao meio e gerando um produto com alto valor agregado;

O melhor substrato para o desenvolvimento do *Pleurotus ostreatus* foi o composto por palha do sabugo de milho hidratada em solução contendo 50% de água e 50% de milhocina, com pH = 5,0;

O *Pleurotus ostreatus* é um fungo de alto valor nutricional, apresentando em sua composição 13,50% de proteína, 1,00% de lipídeos, 65,76% de carboidratos totais, 15,18% de fibra bruta, 0,31 mg.L⁻¹ de fósforo, 3,65 mg.L⁻¹ de potássio, 0,36 mg.L⁻¹ de cálcio e 1,90 mg.L⁻¹ de magnésio.

As análises de micotoxinas nos corpos de frutificação indicaram a presença de zearalenona e aflatoxina, provavelmente devido ao uso de resíduos do processamento de milho, cereal que costuma ter esse tipo de contaminação.

Através do estudo cinético realizado foi possível verificar que a relação C/N é diretamente proporcional ao teor de fibra bruta, fenômeno relacionado ao processo de hidrólise enzimática do material lignocelulósico utilizado na conversão em biomassa fúngica;

O protocolo de cultivo desenvolvido no presente trabalho pode representar uma alternativa para melhoria nas condições sócio-econômicas na agricultura familiar. Entretanto, necessita de estudos complementares para elucidação dos mecanismos de absorção de contaminantes (aflatoxinas) paralelamente a outros ensaios que atestem segurança alimentar para o consumo do produto.

REFERÊNCIAS

ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985, 533p.

ABIMILHO. Processos Industrial de via úmida. Disponível na URL: <<http://www.abimilho.com.br/processo3.htm>>. Acessado em 14 de março de 2009.

ALLEN, J. C.; SMITH, C. J. Enzyme-linked immunosorbent assay kits for routine food analysis. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p.193-199, 1987.

American Public Health Association Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Food. 2ed. Washington D.C. : APHA,1994.

ARAI, Y., TAKAO, M.; SAKAMOTO, R.; YOSHIKAWA, K.; TERASHITA, T. Promotive effect of the hot water-soluble fraction from corn fiber on vegetative mycelial rowth in edible mushroom. **J. Wood Science**, n. 49, p.437-43, 2003.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 871-158, 1988.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S. BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003.

BAYSAL, E.; PEKER, H., YALINLIÇ, M.K., TEMİZ, A. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 95-97, 2003.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, p. 425-428, 2004.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Coleção Brasil Agrícola. Editora Ícone, 1999.

BRIONES-REYES, D. GOMÉZ-MARTINEZ, L. CUEVA-RÓLON, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 693-698, 2007.

CHAHAL, D. S.; ISHAQUE, M.; BROUILLARD, D.; CHORNET, E.; OVEREND, R. P., JAULIN, L.; BOUCHARD, J. Bioconversion of hemiceluloses into fungal protein. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 355-61, 1987.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value Medicinal Effect and Environmental Impact**. 2ed. CRC Press Boca Raton, 2004.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P.; OOI, V. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2002.

Resolução CONAMA 357. Disponível na URL: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acessado em 12 de maio de 2009.

Da PAZ, M. F. **A Biotecnologia Tradicional: cogumelos, produtos que melhoram a qualidade de vida**. UNOESC Notícias. Disponível na URL: http://www.unoescxxe.edu.br/web_reitoria/noticias_unoesc/desc_noticias.php?cod_noticia=1254. Acessado em 16/02/2009.

DAS N.; MUKHERJEE M. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2723-2726, 2007.

DIAS, E.S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. S.; DA SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. Lavras: **Ciência Agrotécnica**, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DILKIN, P., MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. Santa Maria: **Ciência Rural**, v. 30, n.1 p. 137-141, 2000.

EIRA, A. A. e BUENO, F.S. **Cultivo de cogumelo Shimeji e Hiratake**. Viçosa: CPT, 2005.

FERGUS, C.L.; FERGUS, C. **Common Edible and Poisonous: Mushroom of the Northeast**. Pennsylvania, Stackpole Books, 2003.

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

GERN R. M. R.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 76 - 82, 2008.

KALMIS E.; AZBAR, N.; YILDIZ, H.; KALYONCU, F. Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 164-169, 2008.

LOSS, E.; ROYER. A. R; BARRETO-RODRIGUES. M. e BARANA, A. C. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus spp.* Mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**. v. 166, issue. 2-3, p. 1522-1525, 2009.

MATTOS, L. L. ; MARTINS, I. S. Consumo de fibras alimentares e população adulta. São Paulo: **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n.1, p. 50 - 55, 2000.

MODA E. M. **Produção de *Pleurotus Sajor-Caju* em bagaço de cana de açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação “in natura”**. Dissertação de Mestrado. Piracicaba: ESALQ/USP, 2003.

Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington: AOAC, 2000.

OLIVEIRA, H. C. B. e URBEN, A. F. **Cultivo de *Pleurotus spp.* utilizando a técnica “Jun-Cao”**. In: Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Org. Arailde Fontes Urben. Cap. 5, 2 ed. Brasília: Embrapa, 2004.

OLIVEIRA, M. A.; DONEGA. M. A; PERALTA, R. M.; e SOUZA, C. G. M. Produção de inóculo do cogumelo comestíveis *Pleurotus pulmonaris* (Fr) Quélet – CCB 19 a partir de resíduos da agroindústria. Campinas: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 84-87, 2007.

PARK, Y. K.; IKEGAKI M.; ALENCAR. S. M.; AGUIAR, C. L. Determinação da concentração de β -glucano em cogumelos *Agaricus Blazei* Murril por método enzimático. Campinas: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, 2003.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Editora McGraw-Hill, volume II, 1981.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais**. Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela, 2005.

PINTO, G. A. S., BRITO, E. S., ANDRADE, A, M. R., FRAGA, S. L. P., TEIXEIRA, R. B. **Fermentação no estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização dos resíduos agroindústrias tropicais**. Comunicado Técnico On line nº. 102. Fortaleza: EMBRAPA, 2005,

RAGUNATHAN R.; GURUSAMY, R.; PALNISWANY, M.; SWAMINATHAN, K. Cultivation of *Pleurotus spp.* on various agro-residues. **Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p.139-144, 1996.

RAMOS, A. C.; SAPATA, M. M.; CANDEIAS, M.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, M. L. **Cultura de cogumelos do gênero *Pleurotus***. INIAP - Estação Agronômica Nacional. Departamento de Tecnologia de Produtos Agrários, Oeiras, Portugal. Artigo do Ministério de Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

SEKIYAMA. B. L.; RIBEIRO, A. B.; MACHINSKI, P. A.; JUNIOR, M. M. Aflatoxins, ochratoxin a and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 289-294, 2005.

SILVA, E.G.; DIAS, E. S.; SIQUEIRA, F. G.; SCHWAN, R. S., Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. Campinas: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 72-75, 2007.

SOCCOL, C. R. e VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

TEDESCO, M. J.; GIANELO, C.; BISSANI, C. A.; BOLHNEN, H. e VOLKWEIS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia – UFRGS – RS, EdUFRGS, Porto Alegre 1995.

URBEN, A. F. e de OLIVEIRA, H. C. B. **Formulações e preparo de meios para “sementes”**. In: Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada, Cap. 3, 2ed. Org. Arailde Fontes Urban. Brasília: Embrapa, 2004.

URBEN, A. F.; URIARTT, A. H. **Princípios do cultivo de cogumelo pela técnica “Jun-Cao”**. In: Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada, Cap. 3, 2ed. Org. Arailde Fontes Urban. Brasília: Embrapa, 2004.

YILDIZ S.; YILDIZM U. C.; GEZER, E. D., TEMIX, A. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 301-306, 2002.

ANEXOS

Journal of Hazardous Materials 166 (2009) 1522–1525



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Short communication

Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiencyEdenes Loss^a, Andrea Rafaela Royer^b, Marcio Barreto-Rodrigues^{b,*}, Ana Claudia Barana^a^a Ponta Grossa State University – UEPG, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 – CEP 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil^b Federal Technological University of Paraná – UTFPR, Via do Conhecimento s/n, km 01 Bairro Paraná, CEP 85501-970, Ponta Grossa, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2008

Received in revised form 8 November 2008

Accepted 10 November 2008

Available online 17 November 2008

Keywords:

Maize effluent

Pleurotus

Biological efficiency

ABSTRACT

This study evaluated the *Pleurotus* spp. mushroom production process using an effluent from the maize agroindustrial process as a carbon and nitrogen source and as a wetting agent. A complete experimental design based on factorial planning was used to optimize the biological efficiency and evaluate the effect of the concentration of effluent, pH and species of *Pleurotus*. The results indicated that the effluent affects the biological efficiency for the production of both species of mushrooms at all pH values studied. The maximum biological efficiency predicted by the model (81.36%) corresponded to the point defined by the effluent contents ($X_1 = 1$), pH ($X_2 = 1$) and fungus species ($X_3 = 1$), specifically 50%, 5.0 and *P. floridae*, respectively. The results demonstrated that the effluent is a good alternative for the production of *Pleurotus* mushrooms.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The processing of maize produces certain types of organic residues, which, when correctly processed and used, can supply nutrients for food production and other materials of industrial relevance of a high added value. On the other hand, when inadequately handled and treated, they constitute a source of contamination and environmental degradation, especially involving water resources [1,2]. For example, in some regions of the state of the Paraná, Brazil, the wastewater result of industrial maize processing, called the maize effluent (ME), has a high pollution potential with chemical oxygen demands (COD) of up to 14,000 mg L⁻¹ and biochemical oxygen demands (BOD) of up to 11,000 mg L⁻¹ [3]. The organic fraction includes sugars, polyphenols, polyalcohols and lipids. Some of these substances (mainly sugars) can serve as carbon and energy sources for microorganism growth [4]. To prevent episodes of ambient contamination, some industries have used systems of effluent treatment. In contrast, recent works have considered the exploitation of agroindustrial effluents as alternative sources of carbon and nitrogen in important bioprocesses that generate products of aggregate value [5–9]. For example, one of the most promising alternatives is the conversion of these residues in *Pleurotus* spp. Mushrooms.

Pleurotus spp., commonly known as oyster fungus, is appreciated because of its delicious taste, high vitamin (thiamin, riboflavin and

niacin), protein, carbohydrate, and mineral (calcium, phosphorus, iron) content, as well as its low fat content. In addition, these mushrooms have high gastronomic value, demand few environmental controls, are able to colonize and degrade a large variety of solid and liquid residues, and require a shorter growth time when compared to other edible mushrooms [10–12]. *P. ostreatus* and *P. floridae* are potential sources of valuable food protein, and they are organisms that can use various wastes [7,10,13,14]. Within this context, several researchers have studied the bioconversion processes of agricultural and agroindustrial residues in mushrooms of the *Pleurotus* spp. For example, as a biological remediation for olive oil mill wastewater (OME), Sanjust et al. (1991) suggested the use of OME as a medium for the growth of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus*, *P. floridae*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii*) [6,8]. Ramos-Cormenzana et al. (1995) discussed the potential methods for recycling alpechin wastes (solid waste generated by the olive oil extraction process), including the use of alpechin as a growth medium for mushroom production [15]. Zervakis et al. tested two *Pleurotus* species, *P. eryngii* and *P. pulmonarius*, to colonize an olive press-cake (OPC) substrate supplemented with various dilutions of raw OME [5]. In addition, following the harvesting of the mushrooms, the substrate used is valuable as a fertilizer or soil conditioner for the growth of plants and fermented residues, and it can be used as animal feed after mushroom cultivation [16]. In this article, the cultivation process of *Pleurotus* spp. mushroom on substrates containing maize effluent (ME) was studied. The main objective of this work is to elucidate the conditions at which the effluent under study can be better used as a wetting agent and carbon/nitrogen supplemental font to generate a substrate-base for mushroom production with low cost. This would

* Corresponding author. Tel.: +51 46 3220 2586; fax: +51 46 3220 2556.
E-mail address: marclorodrigues@utfpr.edu.br (M. Barreto-Rodrigues).

Table 1
Physical and chemical characteristics of maize effluent.

pH	COD (mg/L)	BOD (mg/L)	Phenols (mg/L)	Total sugar (%)	Total nitrogen (mg/L)	Total solids (mg/L)	Suspended solids (mg/L)	Oils (mg/L)
4.5	14670	11412	346	0.1	1026	7819	0.70	8.80
6.5–8.5 ^a	90 ^a	60 ^a	0.2 ^a	–	–	–	100.0 ^a	50.0 ^a

^a Permissible limits of Brazilian law (CONAMA Resolution 357/2005).

contribute to the ecological elimination of the effluent instead of making an investment in conventional systems of treatment.

2. Material and methods

2.1. Effluent production and characterization

In the process of improving maize for the production of biju bran and flour, the triturated grains must be fermented. This is carried out simultaneously in a series of tanks (3 m³ each), with regular water exchange every 24 h, and the consequent production of wastewater of fermentative nature, with raised sedimented solid text and organic load. These effluents are accumulated and equalized in stabilization tanks and anaerobic treatment systems, with partial removal of the biodegradable organic load. It is important to emphasize, however, that these processes of treatment are not efficient in the complete removal of organic loads, solids, phenols and oils, thus generating effluent with parameters that exceed the limits established for effective ambient legislation.

The ME used throughout the study was obtained from local industrial maize processing in Southwest Paraná State and used immediately for the preparation of the growing medium. This effluent was collected from a fermentation tank previous to the treatment. The physical and chemical characteristics of the ME are presented in Table 1.

2.2. Microorganisms

Single strains of *P. ostreatus* and *P. floridae* were used in the experiments. Spawn of both types was obtained from EMBRAPA – Genetic Resources and Biotechnology and maintained at 4 °C on PDA (potato dextrose agar) in Petri dishes. Sorghum grains were used as substrate and growth support for spawn multiplication. The grains were washed in owing water and then cooked for 10 min (after boiling) in deionized water at a ratio of 1:2 (wheat grains:water, w/v). The extract obtained was drained, and the grains were supplemented with 0.35% CaCO₃ and 1.3% CaSO₄. Once cooked and supplemented, the wheat grains were packaged (250 g of wheat grains in polyethylene bags of 200 mm), closed and sterilized in an autoclave at 121 °C for 1 h. After the sterilization, each bag was inoculated with five agar disks of 6 mm diameter containing mycelium and then incubated at 30 °C in the absence of light for a 14-day period.

2.3. Substrate preparation and cultivation conditions

A foliar residue of maize practical agriculture (Maize straw) was collected directly in the field, after grain harvesting. The material was cut into long pieces (2–5 cm) and soaked overnight in ME:tap mixtures containing 0% or 50% ME (by volume) to obtain a moisture content of around 70–75%. The pH of each medium was then adjusted to 5.0 or 6.0 by adding a varying amount of CaCO₃, as described by Kalmis and Sargin [6]. Two replicates were prepared for each concentration of ME examined. Polypropylene bags (height 19 cm, diameter 15 cm) were filled with 1.5 kg of substrate, sterilized twice for 60 min at 121 °C to prevent cross contamination, and allowed to cool down to the desired inoculation temperature. On the day following sterilization, the bags were vertically inoculated

with the spawn (*P. ostreatus* and *P. floridae*) at a rate of 5% of the dry substrate weight (w/w).

The tightly closed bags were then incubated in a cultivation room maintained at 25 ± 5 °C at a relative humidity of 70–75 ± 5%. After the substrate was fully colonized, the bags were removed from the substrate, which was then incubated at 20 ± 5 °C at a relative humidity of 85–90 ± 5%.

2.4. Optimization of biological efficiency

The substrate containing the straw and effluent was prepared in accordance with a 2³ full factorial design to evaluate the effect of the medium composition (effluent concentration, pH and *Pleurotus* species) on the biological efficiency (fresh mushroom yield), which was calculated using the equation:

biological efficiency (B.E)

$$= \left(\frac{\text{weight of fresh harvested mushrooms}}{\text{weight of wet substrate used}} \right) \times 100$$

Table 2 shows the level and factors used in the design.

For each of the three factors, high and low set points coded into +1 and −1, respectively, were selected. A statistical model for an optimized biological efficiency was determined by the response regression procedure. The model is expressed by Equation 1: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$, where Y = response variable, b_0 , b_1 , b_2 and b_3 = regression coefficients, and X_1 , X_2 and X_3 = variables under study. The statistical analysis was performed using STATGRAPHICS Plus statistical software – Version 4.1.

3. Results and discussion

As previously mentioned, the evaluation of the experimental effect in study is based on productivity, described in this work for the biological efficiency. The different experimental conditions and their respective results are shown in Table 3.

The biological efficiency was between 19.86 and 9112%. The main effects and their respective interactions calculated from the data of Table 3 are illustrated in the Pareto charts in Fig. 1. These charts estimate the effects in decreasing order of importance. The horizontal bars represent the significant findings.

The linear effects of [effluent] (X_1), pH (X_2) and fungus (X_3) were significant, and a linear model was calculated (Equation 2), where the biological efficiency (%) = $60.7682 + 22.9117X_1 - 13.4832X_2 + 7.663X_3 - 9.19925X_1X_2 + 2.452X_1X_3 - 5.573X_2X_3$. Table 4 shows the partitions of the variability in biological efficiency into separate pieces for each of the effects. It also presents

Table 2
Factors evaluated in the factorial design used to define a culture medium for *Pleurotus* spp.

Factor	Level	
	−1	+1
X_1 : [maize effluent] (%)	0	50
X_2 : pH	5	6
X_3 : fungus species	<i>ostreatus</i>	<i>floridae</i>

Substratum base: cut maize straw.

Table 3
Factors evaluated in the factorial design used to define a culture medium for *Pleurotus* mushroom production.

Experiment number	Independent variables/coded values			Response B.E. (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	1	-1	22.84
2	-1	-1	-1	22.76
3	-1	1	1	25.62
4	1	-1	-1	67.59
5	1	-1	1	74.15
6	-1	-1	1	41.51
7	1	1	1	34.30
8	1	1	-1	39.78
9	-1	1	-1	19.86
10	-1	-1	-1	21.58
11	-1	1	1	21.20
12	1	-1	-1	50.76
13	1	-1	1	51.12
14	-1	-1	1	26.50
15	1	1	1	50.50
16	1	1	-1	38.04

X₁: [maize effluent] (%); X₂: pH and X₃: fungus species.

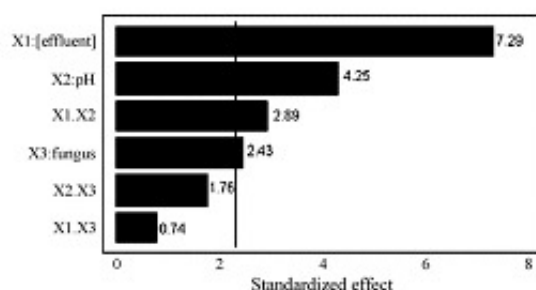


Fig. 1. Pareto chart based on total error with 8 d.f., $t=2.30601$ (the vertical line defines 95% of the confidence intervals).

the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, four effects have P -values of less than 0.05, indicating that they are significantly different from zero at the 95.0% confidence level. The R -squared statistic indicates that the model as fitted explains 91.7% of the variability in biological efficiency. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 12.621. The mean absolute error (MAE) of 711675 is the average value of the residuals. The Durbin–Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in the data file. Since the DW value is greater than 1.4, there is probably no serious autocorrelation in the residuals. A model is mathematically satisfactory when it presents high regression coefficients and the lack-of-fit is not significant.

Table 4
Analysis of variance (ANOVA) for biological efficiency.

Source	Sum of squares	d.f.	Mean square	F-ratio	P-value
X ₁ : [effluent]	8399.17	1	8399.17	52.73	0.0001*
X ₂ : pH	2908.77	1	2908.77	18.26	0.0027*
X ₃ : fungus	939.545	1	939.545	5.90	0.0413*
X ₁ X ₂	1354.02	1	1354.02	8.50	0.0194*
X ₁ X ₃	96.1969	1	96.1969	0.60	0.4394
X ₂ X ₃	496.933	1	496.933	3.12	0.1153
Blocks	11.4109	1	11.4109	0.07	0.7957
Total error	127432	8	159.29		
Total	15480.4	15			

* Significant at the 95.0% confidence level.

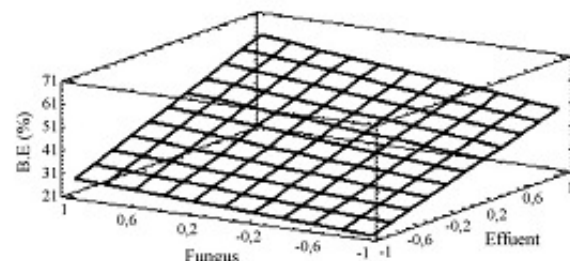


Fig. 2. Influence of the effluent and fungal species content on the biological efficiency.

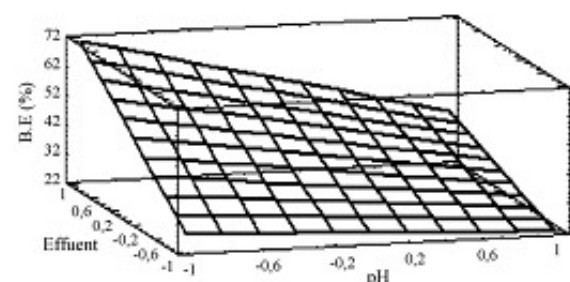


Fig. 3. Influence of the effluent and pH content on the biological efficiency.

The illustrated surfaces of Figs. 2 and 3 also confirm the observed behavior in the Pareto chart (Fig. 1). In both, the inclined surfaces that generated the more significant biological efficiency of *Pleurotus* are induced mainly by the increase of effluent concentration, since the other effects (pH or fungus species), although significant, had only a minor influence on the mushroom productivity.

The maximum biological efficiency predicted by the model (81.36%) corresponded to the point defined by the effluent contents ($X_1 = 1$), pH ($X_2 = -1$) and fungus ($X_3 = 1$), which were 50%, 5.0 and 35% (v/v) *P. ostreatus*, respectively. From the experiments, it was evident that the effluent content had a positive influence on the biological efficiency. It is interesting to point out that these results are superior to others reported by authors in the literature. For example, using 100% of the olive oil industry effluent, Kalmis and Sargin obtained a maximum of 50% biological efficiency for *P. ostreatus* [6]. Other experiments conducted using water instead of the effluent recorded little ($\approx 10\%$) or no biological efficiency for the production of mushrooms, confirming that the effluent is efficient in the substrate supplementation for *Pleurotus* cultivation.

4. Conclusion

The present study was the first to demonstrate the possibility of using wastewater maize as a supplementary source for substrate *Pleurotus* mushroom production. The effluent improved the biological efficiency of the production of both species of mushrooms studied at different pH values. The maximum biological efficiency predicted by the model (81.36%) corresponded to the point defined by the contents of the effluent ($X_1 = 1$), pH ($X_2 = -1$) and fungus ($X_3 = 1$), specifically 50%, 5.0 and *P. floridae*, respectively. In conclusion, many producers use different agricultural wastes for the production of the *Pleurotus* species. In this study, it was observed that ME can be used at concentrations of 50% with water to moisten and supplement the substrate. It provides an economically acceptable production alternative for the mushroom cultivation and reduces the disposal problems caused by ME, while also gener-

ating a residue colonized with potential applications as a fertilizer in agriculture or as a supplement of animal rations. Future work will evaluate the physical-chemical properties and alimentary security in relation to the presence of mycotoxins for the mushrooms produced from this process.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES/Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEPG and Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior/UGF - Unidade Gestora do Fundo Paraná for their financial support and to Karina Agostini Duracenski and Ana Carla Balbinotti for their technical support.

References

- [1] C. Isralides, B. Scanlon, A. Smith, S.E. Harding, K. Jumel, Characterization of pul-
lulans produced from agro-industrial wastes, *Carbohydrate Polymers* 25 (1994)
203–209.
- [2] T.N. Lakhanpal, Bioremediation technology for environmental protection
through bioconversion of agro-industrial wastes, *Progress in Industrial Micro-
biology* 36 (2002) 101–128.
- [3] E.A. Fermiani, M.B. Rodrigues, E. Loss, Estimativa da eficiência de tratamento de
efluente oriundo de agroindústria de beneficiamento de milho, *Synergismus
científica UTFPR* 1 (2006) 1–4.
- [4] C. Yu, H. Liu, Y. Xing, N.S. Manulovskiy, V.S. Kovalev, Y.L. Gurevich, Bio-
conversion of rice straw into a soil-like substrate, *Acta Astronautica*, doi:10.1016/j.actaastro.2008.03.010.
- [5] G. Zervakis, P. Yatras, C. Ballis, Edible mushrooms from olive oil mill wastes,
International Biodeterioration & Biodegradation 1 (1996) 237–243.
- [6] E. Kalmis, S. Sargin, Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw con-
taining olive mill wastewater, *International Biodeterioration & Biodegradation*
53 (2004) 43–47.
- [7] R. Galtán-Hernández, D. Salmones, Obtaining and characterizing *Pleurotus*
ostreatus strains for commercial cultivation under warm environmental condi-
tions, *Scientia Horticulturae*, doi:10.1016/j.scienta.2008.05.029.
- [8] E. Kalmis, N. Azbar, H. Yildiz, F. Kalyoncu, Feasibility of using olive mill effluent
(OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus*
ostreatus, on wheat straw, *Bioresource Technology* 99 (2008) 164–169.
- [9] M. Ahmadi, F. Vahabzadeh, B. Bonakdarpour, M. Mehranian, Empirical modeling
of olive oil mill wastewater treatment using loof a-immobilized *Phanerochaete*
chrysosporium, *Process Biochemistry* 41 (2006) 1148–1154.
- [10] R. Ragunathan, R. Gurusamy, M. Palaniswamy, K. Swaminathan, Cultivation
of *Pleurotus* spp. on various agro-residues, *Food Chemistry* 55 (1996) 139–
144.
- [11] S. Yildiz, U.C. Yildiz, E.D. Cezek, A. Temiz, Some lignocellulosic wastes used as
raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom, *Process
Biochemistry* 38 (2002) 301–306.
- [12] G. Olivieri, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Giardina, G. Cennamo, G. Sanna,
Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*, *Biochemical
Engineering Journal* (2006) 180–187.
- [13] D. Wang, H. Zhu, Y. Zhang, C. Yang, A carbon-carbon coupled dimeric bergenerin
derivative biotransformed by *Pleurotus ostreatus*, *Bioorganic & Medicinal Chem-
istry Letters* 15 (2005) 4073–4075.
- [14] N. Das, M. Mukherjee, Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants, *Bio-
resource Technology* (2007) 2723–2726;
Environment 2 (2004) 391–394.
- [15] U. Baysal, H. Peker, M. Yalçinkılıç, A. Temiz, Cultivation of oyster mushroom on
waste paper with some added supplementary materials, *Bioresource Technol-
ogy* 89 (2003) 95–97.
- [16] S.C. Villas-Bôas, E. Esposito, D.A. Mitchell, Microbial conversion of lignocel-
lulosic residues for production of animal feeds, *Animal Feed Science and
Technology* 98 (2002) 1–12.

IV SICOG – IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL**III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS**

ANAIS - Caxias do Sul, RS, 27 A 30 DE OUTUBRO DE 2008

P11 – OTIMIZAÇÃO DE SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE *Pleurotus ostreatus* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DA CADEIA DE MILHO

Edenes M. Schroll Loss¹, Andréa Rafaela Royer²

Márcio Barreto Rodrigues², Ana Cláudia Barana¹

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa, - UEPG

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco – UTFPR

E-mail: marciorodrigues@utfpr.edu.br

Cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* possuem elevado valor nutritivo, sendo ricos em proteínas e vitaminas e com baixo teor de lipídeos. Neste trabalho, foi realizada a produção de *P. ostreatus* a partir de resíduos da cadeia do milho (efluente, placa e sabugo de milho), em pH 6, em diferentes concentrações de efluente (0, 25, 50, 75 e 100%) analisando a sua eficiência biológica. Os resultados mais expressivos foram obtidos e com efluente e palha de milho com eficiência biológica de 77,08% nos ensaios usando 100% de efluente, o experimento com sabugo apresentaram sinais de contaminação, colonização micelial do substrato incompleta e baixo valores de eficiência biológica (23,02%). Esse estudo sugere que o uso de efluente do beneficiamento do milho, bem como a palha de milho, pode representar uma alternativa interessante para a produção de um alimento de significativas características, nutricionais, medicinais e econômicas, ao mesmo tempo em que contribui para a produção dos impactos ambientais eventualmente causados pelo lançamento dos resíduos supracitados.