

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**MICOPROTEÍNAS DE MACROFUNGOS OBTIDAS EM
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO:
AVALIAÇÃO DO ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL
E COMPOSTOS BIOATIVOS**

Fernanda Stoffel

Caxias do Sul, 2019.

Fernanda Stoffel

MICOPROTEÍNAS DE MACROFUNGOS OBTIDAS EM
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO: AVALIAÇÃO DO
ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E COMPOSTOS
BIOATIVOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientadora: Dra. Simone Mendonça

Caxias do Sul, 2019.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Universidade de Caxias do Sul

Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S873m Stoffel, Fernanda

Micoproteínas de macrofungos obtidas em cultivo em estado sólido : avaliação do enriquecimento nutricional e compostos bioativos / Fernanda Stoffel. – 2019.

198 f. f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Simone Mendonça.

1. Proteínas. 2. Macrofungos. 3. Física do estado sólido. 4. Compostos bioativos. I. Camassola, Marli, orient. II. Mendonça, Simone, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 577.112

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)

Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

Fernanda Stoffel

MICOPROTEÍNAS DE MACROFUNGOS OBTIDAS EM CULTIVO EM ESTADO
SÓLIDO: AVALIAÇÃO DO ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E COMPOSTOS
BIOATIVOS

Teste apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa Dra. Marli Camassola

Coorientadora: Dra. Simone Mendonça

TESE APROVADA EM 14 DE JULHO DE 2019.

Profa. Dra. Marli Camassola

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong

Profa. Dra. Eloane Malvessi

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marli Camassola pela orientação e empenho na realização deste trabalho, e à pesquisadora Dra. Simone Mendonça pela coorientação. Às professoras da banca de acompanhamento, Dra. Eloane Malvessi e Dra. Luciani Tatsch Piemolini-Barreto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Agroenergia pela bolsa.

A Universidade de Caxias do Sul (UCS) pela oportunidade do doutoramento e pela estrutura oferecida, e ao Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) – Câmpus São Miguel do Oeste, pelo incentivo à qualificação docente e pela estrutura oferecida para a realização do trabalho.

À Dra. Roselei Claudete Fontana, do Laboratório de Enzimas e Biomassa (LEB), por todo o suporte na parte experimental, além da amizade e companheirismo.

Ao tecnólogo de alimentos, amigo e empresário Moacir Schneider da Cervejaria Vitrola pela doação do bagaço de malte e às empresas Tecnovin de Bento Gonçalves e Econatura de Garibaldi pela doação do bagaço de uva.

Ao bolsista de iniciação científica Weslei de Oliveira Santana pela dedicação e companhia na realização deste trabalho, além da amizade e por nunca deixar de acreditar que iria dar certo. À técnica dos laboratórios do curso de Engenharia de Alimentos, Aline Novello, pelo suporte nas análises de proteínas, e aos demais colegas do LEB pelos momentos de descontração, pela hora do café.

À minha família que sempre me apoiou, me incentivou e esteve do meu lado durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Macrofungos comestíveis: características, importância e aspectos legais	13
2.1.1 Gênero <i>Pleurotus</i>	15
2.1.2 Gênero <i>Auricularia</i>	19
2.1.3 Gênero <i>Agaricus</i>	21
2.2 Cultivo em estado sólido para obtenção de micoproteínas.....	23
2.3 Matérias-primas vegetais.....	25
2.3.1 Grãos de cereais.....	26
2.3.2 Bagaço de malte.....	30
2.3.3 Bagaço de uva.....	31
2.4 Enriquecimento proteico de matérias-primas por meio de CES de macrofungos	34
2.4.1 Características gerais e fontes de alimentos proteicos.....	34
2.4.2 Micoproteínas	36
2.4.3 Obtenção de micoproteínas de macrofungos por meio de CES	39
2.5 Compostos bioativos e atividade biológica de micoproteínas	41
2.5.1 Compostos com atividade antioxidante	42
2.5.2 Inibição enzimática.....	44
2.6 Propriedades físicas e físico-químicas das micoproteínas.....	46
2.7 Uso de micoproteínas no desenvolvimento de alimentos.....	47
2.8 Uso de micoproteínas na nutrição animal.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Macrofungos	53

3.2 Matérias-primas vegetais: grãos e resíduos agroindustriais	53
3.3 Cultivo em estado sólido (CES)	54
3.4 Farinhas de matérias-primas colonizadas pelos micélios (micoproteínas).....	55
3.5 Utilização de farinha de micoproteína na formulação de alimentos	56
3.6 Métodos analíticos.....	57
3.6.1 Biomassa fúngica (extração e quantificação de ergosterol)	57
3.6.2 Determinação da composição centesimal.....	59
3.6.3 Determinação da composição de aminoácidos	63
3.6.4 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante <i>in vitro</i>	63
3.6.5 Determinação de ergotioneína	66
3.6.6 Determinação de lovastatina.....	67
3.6.7 Inibição de enzimas do trato digestório	67
3.6.8 Características físicas e físico-químicas	70
3.6.9 Propriedades tecnológicas das farinhas	72
3.6.10 Análise estatística	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 Capítulo 1	75
4.2 Capítulo 2	110
4.3 Capítulo 3	145
5 DISCUSSÃO GERAL.....	174
6 CONCLUSÃO.....	181
7 PERSPECTIVAS	183
8 REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	184

RESUMO

O crescimento populacional e o esgotamento de recursos naturais demanda a pesquisa por novas alternativas para o suprimento de alimentos proteicos. Fontes alternativas de proteínas, como aquelas oriundas de microrganismos, podem auxiliar na solução desta problemática. No presente trabalho, micoproteínas de *Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* e *Pleurotus albidus* foram produzidas como resultado de cultivo em estado sólido (CES) utilizando matérias-primas vegetais como grãos (arroz integral, milho canjica, trigo) ou bagaços (de malte de cevada e de uva) no meio de cultivo. As matérias-primas vegetais colonizadas pelos micélios (miceliadas) foram secas e moídas para obtenção de farinhas de micoproteínas que foram analisadas quanto ao conteúdo de biomassa micelial, composição nutricional, características físicas e físico-químicas, compostos secundários bioativos (ergosterol, ergotioneína e lovastatina) e atividade biológica *in vitro* (antioxidante e inibição das enzimas α -glicosidase, α -amilase e lipase pancreática), sendo comparadas com as respectivas farinhas controle (matérias-primas vegetais não miceliadas). Na produção de micoproteínas de *P. albidus*, foi observado crescimento micelial em todas as matérias-primas utilizadas, sendo determinados os maiores valores de ergosterol ($0,60 \text{ mg. g}^{-1}$) e de biomassa fúngica (183 mg. g^{-1}) em farinhas obtidas de grãos de trigo miceliados por este macrofungo. Na avaliação da composição nutricional, a respeito as proteínas e aminoácidos totais, os resultados mais relevantes foram observados em micoproteínas de *P. albidus*. Em farinhas obtidas de grãos de trigo e de bagaço de malte miceliados por *P. albidus*, os percentuais mais altos de enriquecimento proteico relativo ao controle foram de 46 e 42%, respectivamente; para conteúdo de aminoácidos totais em comparação ao controle foram de 17,7 e 20,2%, respectivamente. Quanto ao conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, de maneira geral, valores superiores foram determinados nas micoproteínas de *A. fuscosuccinea*. Nestes aspectos, pode-se destacar a farinha obtida de grão de milho miceliado por *A. fuscosuccinea*, em que o conteúdo de fenólicos foi 29 vezes superior ao controle, e as capacidades sequestradoras dos radicais DPPH[·] e ABTS^{·+} foram 10 e 55 vezes superiores ao controle, respectivamente. Na investigação dos compostos secundários, a presença de ergotioneína foi identificada, particularmente, nas micoproteínas de *P. albidus* em farinha obtida de grão de trigo, na qual foi determinada a concentração de $26,01 \mu\text{g.}100 \text{ g}^{-1}$ de amostra. As maiores concentrações de lovastatina foram determinadas nas farinhas de micoproteínas de *A. fuscosuccinea* produzidas em grão de trigo ($0,660 \mu\text{g.}100 \text{ g}^{-1}$) e em bagaço de malte ($1,170 \mu\text{g.}100 \text{ g}^{-1}$) e, ainda, na micoproteína de *P. albidus* produzida em bagaço de uva ($0,883 \mu\text{g.}100 \text{ g}^{-1}$). As micoproteínas de *A. blazei* e de *P. albidus* foram as mais

efetivas na inibição da enzima α -glicosidase (pelo menos 78,4% de inibição no ensaio *in vitro*). A maior capacidade inibitória de atividade da enzima lipase pancreática *in vitro* (74,5%) foi evidenciada na micoproteína de *P. albidus* produzida em grão de trigo. Por fim, a farinha de bagaço de malte contendo a micoproteína de *P. albidus* foi utilizada para enriquecer nutricionalmente a formulação de um biscoito tipo *cookie*. A substituição total da farinha de trigo refinada pela farinha de micoproteína resultou em produto com valores superiores de proteína (11,60 g.100g⁻¹), de fibras alimentares totais (32,35 g.100g⁻¹), de atividade antioxidante (DPPH) (50,4%) e de inibição de α -glicosidase (74,9%). Em conclusão, a produção da micoproteína de macrofungos constituiu uma estratégia promissora para o enriquecimento nutricional e a produção de compostos bioativos, com potencial uso como ingrediente funcional em alimentos ou como aditivo na nutrição animal.

ABSTRACT

The population growth and depletion of natural resources demand research into new alternatives for the supply of protein foods. Alternative sources of proteins, such as those derived from microorganisms, can help solve this problem. In this study, *Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus* mycoproteins were produced in solid-state cultivation (SSC) using vegetable raw materials such as grains (brown rice, corn, wheat) or bagasse (brewer spent grain, grape marc) in the cultivation medium. The colonized material was dried and milled to obtain mycoproteins flours which were analyzed for mycelial biomass content, nutritional composition, physical and physicochemical characteristics, bioactive secondary compounds (ergosterol, ergothioneine and lovastatin), biological activity *in vitro* (antioxidant and α -glycosidase, α -amilase and pancreatic lipase enzymatic inhibition) and compared with the respective control flour. The results demonstrated that in the production of *P. albidus* mycoproteins, mycelial growth was observed in all the raw materials used, being determined the highest values of ergosterol (0.60 mg.g^{-1}) and fungal biomass (183 mg.g^{-1}) in flours obtained from wheat grains myceliated by this macrofungi. In the evaluation of the nutritional composition, regarding the proteins and total amino acids, the most relevant results were observed in mycoproteins of *P. albidus*. In flour obtained from wheat grains and brewer spent grain myceliated by *P. albidus*, the percentage of protein enrichment relative to the control were 46 and 42%, respectively; and increase in total amino acid content compared to control were 17.7 and 20.2%, respectively. As for the phenolic compounds and antioxidant activity, in general, the highest values were determined in the *A. fuscosuccinea* mycoproteins. In these aspects, it is possible to highlight the flour obtained from corn grain myceliated by *A. fuscosuccinea*, in which the phenolic content was 29 times higher than the control, and the scavenging capacities of the radicals DPPH[·] and ABTS⁺ were 10 and 55 times higher than control, respectively. In the investigation of the secondary compounds, the presence of ergothioneine was identified particularly in the *P. albidus* mycoproteins, as in the flour obtained from wheat grain myceliated by the fungus in which the concentration of $26.01 \mu\text{g.100 g}^{-1}$ of sample was determined. The highest concentrations of lovastatin were determined in *A. fuscosuccinea* mycoproteins flour produced in wheat grain ($0.660 \mu\text{g.100 g}^{-1}$) and in brewer spent grain ($1.170 \mu\text{g.100 g}^{-1}$), and also in the *P. albidus* mycoprotein produced in grape marc ($0.883 \mu\text{g.100 g}^{-1}$). *A. blazei* and *P. albidus* mycoproteins were the most effective inhibitors of the α -glycosidase enzyme (at least 78.4% inhibition in the *in vitro* assay). The highest inhibition of pancreatic lipase *in vitro* (74.5%) was evidenced in the *P. albidus* mycoprotein produced in

wheat grain. Finally, *P. albidus* mycoprotein flour produced in brewer spent grain was used to nutritionally enrich the formulation of a cookie. Total replacement of refined wheat flour by mycoprotein flour resulted in a product with higher values of protein (11.60 g.100 g⁻¹), of total dietary fiber (32.35 g.100 g⁻¹), of antioxidant activity (50.4% in DPPH assay) and α- glucosidase inhibition (74.9%). In conclusion, macrofungi mycoprotein production is a promising strategy for nutritional enrichment and the production of bioactive compounds, with potential use as a functional ingredient in food or as an additive in animal nutrition.

1 INTRODUÇÃO

A população mundial estimada para a metade do século XXI será de 9,8 bilhões de habitantes. De acordo com as recomendações da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, a produção de alimentos deverá ser dobrada no período entre 2012 e 2050 para atender a demanda consequente do aumento populacional (FAO, 2017). Na atualidade, as principais fontes de proteína da alimentação humana são de origem animal e vegetal. O suprimento de alimentos proteicos de origem animal é uma preocupação pois, devido aos impactos ambientais e às questões relacionadas com o bem-estar animal, o setor produtivo não poderá simplesmente aumentar a utilização de recursos para responder ao aumento da demanda. Neste sentido, as fontes proteicas alternativas, como aquelas provenientes de microrganismos, poderiam auxiliar na solução desta problemática.

Macrofungos são fungos que formam corpos de frutificação, também conhecidos como cogumelos. Os macrofungos comestíveis são muito apreciados pelos atributos sensoriais de sabor, aroma e textura, e pela sua composição nutricional, com elevados conteúdos de proteínas, de fibras alimentares totais e baixo teor de gorduras totais. Devido ao seu valor nutricional e composição química, os macrofungos podem ser considerados alimentos funcionais, e por vezes, contém metabólitos secundários que têm sido associados à promoção da saúde.

Dentre as espécies de macrofungos encontrados no Brasil, *Agaricus blazei* Murrill, originária da cidade paulista de Piedade e conhecida como Cogumelo do Sol, merece destaque pelas propriedades medicinais. Há também, espécies pouco estudadas isoladas do bioma Mata Atlântica, no Estado do Rio Grande do Sul, tais como *Pleurotus albidus* e *Auricularia fuscosuccinea*, entre outras.

O consumo de macrofungos comestíveis pode ser limitado ao seu custo (Souilem *et al.*, 2017), principalmente em países sem a cultura do seu uso na alimentação. Fatores como a

estrutura, as condições de cultivo e o tempo necessário para a obtenção dos cogumelos podem ter influência sobre os seus custos de produção. Por sua vez, o aproveitamento na forma de micélio vegetativo pode ser uma alternativa aos cogumelos, pois sua obtenção é mais rápida quando comparado ao período necessário para produção dos corpos de frutificação (basidiomas) (Mokochinski *et al.*, 2015; Rathore *et al.*, 2019). Estudos sugerem que os micélios, bem como as matérias-primas constituintes do meio utilizado para o crescimento micelial, podem representar uma fonte de compostos bioativos, tais como ácidos fenólicos e ergosterol, ambos com atividade antioxidante. Além disso, a combinação de matérias-primas com a biomassa micelial pode ser considerada fonte alternativa de obtenção de proteína, neste caso, proteína fúngica ou micoproteína que são termos que se referem às proteínas oriundas do processo de cultivo de fungos (leveduriformes ou filamentosos).

Cultivo em estado sólido (CES) é um processo biotecnológico no qual microrganismos se desenvolvem no meio de cultivo com baixo conteúdo ou ausência de água livre. Os microrganismos com crescimento favorecido para o CES são os fungos filamentosos, entre eles os macrofungos basidiomicetos, pois esta técnica de cultivo simula o seu habitat natural, sendo que os fungos sintetizam enzimas e outros metabólitos de interesse industrial nestas condições. Além disso, por meio do CES, diferentes matérias-primas vegetais podem ser utilizadas em processos de bioconversão por microrganismos, como uma estratégia para enriquecê-los nutricionalmente, com a produção de micoproteínas e metabólitos de valor agregado para insumos da indústria alimentícia e de nutrição animal.

Grãos de cereais, tais como trigo, milho e arroz, podem ser utilizados como matéria-prima para produção de micélio de macrofungos (micoproteína) por meio de CES. Este processo biotecnológico pode disponibilizar compostos bioativos dos cereais, reduzir fatores antinutricionais e aumentar a digestibilidade dos componentes estruturais do grão, além dos bioativos microbianos, incrementando o valor nutricional dos alimentos. A produção de

micoproteínas em grãos por meio do CES de diferentes macrofungos foi reportada na literatura (Zhai *et al.*, 2015), mas estudos com as espécies *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* e *A. blazei* são escassos.

Resíduos das atividades agroindustriais são biomassas vegetais que podem ser matérias-primas promissoras para a produção de micoproteína por meio do CES. A região da Serra Gaúcha concentra agroindústrias de diversos ramos, dentre elas estão vinícolas e microcervejarias. O gerenciamento dos resíduos sólidos resultantes destas atividades, como os bagaços de uva e de malte, é recomendado para evitar impactos ambientais. O destino mais comum para o bagaço de malte é a alimentação de ruminantes. O bagaço de uva é normalmente destinado à agricultura para uso na adubação. Uma alternativa para estes resíduos seria a sua utilização como matéria-prima em bioprocessos, permitindo a obtenção de produtos de maior valor comercial, como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, ácidos graxos essenciais, aminoácidos e proteínas.

Tanto o bagaço de malte quanto o bagaço de uva foram pesquisados para o cultivo de macrofungos. No entanto, a produção de micoproteína partir destes resíduos em CES com *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* e *A. blazei*, como estratégia para enriquecimento nutricional e produção de compostos bioativos, ainda é pouco explorada.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de farinhas de micoproteínas a partir de diferentes matérias-primas vegetais colonizadas em CES com *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* e *A. blazei* como estratégia para enriquecimento nutricional e aumento da atividade biológica visando a sua potencial utilização em alimentos funcionais.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- obter farinhas de micoproteínas a partir de grãos (arroz integral, milho canjica ou trigo) colonizados com micélio de *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* ou *P. albidus* em CES e caracterizá-las quanto a composição nutricional, compostos bioativos (ergosterol, lovastatina e ergotioneína),

atividade biológica (antioxidante e de inibição de enzimas do trato digestório) e propriedades físicas e físico-químicas;

- obter farinhas de micoproteínas utilizando bagaços de malte de cevada e de uva colonizados com *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* ou *A. blazei* em CES e caracterizá-las quanto a sua composição nutricional, compostos bioativos, atividade biológica, propriedades físicas e físico-químicas;

- avaliar o uso de uma farinha de micoproteína selecionada em termos de enriquecimento proteico e de compostos bioativos, no enriquecimento nutricional e nas características de cor e de textura de biscoitos do tipo *cookie*, bem como na sua atividade antioxidante e inibição da enzima α -glicosidase, visando o desenvolvimento de um alimento funcional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Macrofungos comestíveis: características, importância e aspectos legais

Os macrofungos são seres multicelulares, constituídos por filamentos denominados hifas. O conjunto de hifas é denominado micélio, que se desenvolve formando a estrutura reprodutora dos macrofungos conhecida como corpo de frutificação, na qual podem ser encontrados os esporos (Putzke & Putzke, 2004). Na sua definição mais ampla, cogumelo é um macrofungo com um corpo de frutificação distinto, epígeo ou hipógeo. Cogumelos são macroscópicos e sua colheita é geralmente realizada manualmente, podendo estes ser comestíveis ou não (Chang & Miles, 1992). Os macrofungos pertencem ao filo Ascomycota e ao filo Basidiomycota do reino Fungi (Hibbett *et al.*, 2007).

Os macrofungos do filo Basidiomycota são conhecidos como basidiomicetos. São seres aeróbios, heterótrofos, com atividade ecológica de decomposição da matéria orgânica como, por exemplo, de resíduos lignocelulósicos. Por meio da secreção das enzimas fúngicas, as moléculas dos polímeros que compõem estes materiais são clivadas, liberando os monômeros ou compostos de menor massa molecular, que são assimilados como fonte de carbono e de energia (Madigan *et al.*, 2016). Devido a efetividade na biodegradação de materiais lignocelulósicos, estes fungos são chamados de fungos de decomposição branca ou “white-rot fungi” (Ferraz, 2010).

Segundo Chang (2008), os macrofungos são estudados em três principais áreas: ciência de cogumelos (cultivo e produção de cogumelos), biotecnologia (bioprocessos e produção de derivados de cogumelos) e biorremediação (impactos benéficos dos cogumelos no ambiente). Assim, os macrofungos podem ser aplicados com o objetivo de auxiliar na resolução de

problemas relacionados à escassez de alimentos, à saúde humana e à poluição do meio ambiente.

O uso de macrofungos como alimento vem sendo relatado há séculos. Porém, somente nos últimos anos, observa-se a popularização do consumo, que poderia estar associada a uma conscientização, por parte dos consumidores, de que melhores hábitos alimentares são importantes para a saúde. E neste sentido, os macrofungos comestíveis apresentam propriedades nutricionais para integrar uma alimentação equilibrada (Reis *et al.*, 2017).

De acordo com Resolução RDC nº 272/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “cogumelo comestível: é o produto obtido de espécie(s) de fungo(s) comestível(is), tradicionalmente utilizada(s) como alimento. Pode ser dessecado, inteiro, fragmentado, moído ou em conserva, submetido a processo de secagem e/ou defumação e/ou cocção e/ou salga e/ou fermentação ou outro processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos” (Brasil, 2005).

Existem centenas de espécies de macrofungos comestíveis na natureza. Porém, poucas são amplamente utilizadas como alimento ou regularmente cultivadas de forma significativa. São muito apreciados, não apenas pelos atributos sensoriais de sabor, aroma e textura, mas também, pela sua composição nutricional, com elevados conteúdos de proteínas, fibras alimentares e baixo teor de gorduras totais (Ghorai *et al.*, 2009). A respeito das fibras alimentares constituintes dos macrofungos, estas são compostas por polissacarídeos estruturais da parede celular dos fungos, tais como β -glucanos e quitina, para os quais não há enzimas capazes clivá-los no trato digestório humano (Cheung, 2010). Devido à sua composição, os macrofungos podem ser considerados alimentos funcionais (Chang, 2008; Côrrea *et al.*, 2016; Perera & Li, 2011; Yahaya *et al.*, 2014).

Legalmente no Brasil, alimento ou ingrediente com alegação de propriedade funcional é aquele que, além de nutrir, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde,

devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Na rotulagem de alimentos, somente são permitidas alegações mediante demonstração da sua eficácia, exceto para nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica (Brasil, 1999).

Diversos compostos bioativos com efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde foram identificados na composição química de macrofungos, entre eles, polissacarídeos, compostos fenólicos, terpenoides, glicoproteínas, peptídeos (Carrasco-González *et al.*, 2017; Sokovic *et al.*, 2018). Os efeitos incluem propriedades imunomodulatórias, antitumorais, anti-hipercolesterolemia, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, anti-hiperglicêmica, entre outras (Giavasis, 2014; Reis *et al.*, 2017).

O Brasil apresenta uma biodiversidade de cogumelos (Putzke & Putzke, 2004; Soccol *et al.*, 2017). Dentre as espécies nativas, *Agaricus blazei* Murrill merece destaque pelas propriedades medicinais (Dias, 2010). Há também espécies pouco estudadas, tais como *Pleurotus albidus* e *Auricularia fuscosuccinea*, recentemente isoladas do bioma Mata Atlântica no Estado do Rio Grande do Sul (Rosa *et al.*, 2016). Embora estas espécies já tenham sido pesquisadas em alguma das três áreas de aplicação dos cogumelos (produção de alimentos, obtenção de nutracêuticos e processos de biorremediação), os estudos ainda são escassos, principalmente quando se trata do enriquecimento proteico e da produção de compostos bioativos. Sendo assim, os macrofungos *Pleurotus albidus*, *Auricularia fuscosuccinea* e *Agaricus blazei* foram selecionados para o desenvolvimento do presente trabalho, sendo descritas a seguir informações sobre os mesmos.

2.1.1 Gênero *Pleurotus*

Pertencentes à classe dos Basidiomicetos, os fungos do gênero *Pleurotus* são popularmente conhecidos como cogumelo ostra, pois seus basidiomas (corpos de frutificação)

apresentam formato característico de concha ou ostra com haste concêntrica (Dias, 2010). São comestíveis, ricos em carboidratos, vitaminas, sais minerais, lipídios e proteínas (Chang, 2008) e estão entre os cogumelos mais produzidos comercialmente no mundo (Lechner & Albertó, 2011).

É um grupo cosmopolita, de alto valor nutricional, com propriedades terapêuticas e diversas aplicações ambientais e biotecnológicas. São muito apreciados na gastronomia devido às suas características sensoriais e reconhecidos pelas suas propriedades nutracêuticas (Carrasco-González *et al.*, 2017; Lavelli *et al.*, 2018). Espécies deste gênero destacam-se pela versatilidade e por crescerem em diferentes condições ambientais e substratos, desenvolvendo-se em resíduos agroindustriais (Lechner & Albertó, 2011).

Na literatura constam informações sobre a ocorrência da espécie *P. albidus* (Figura 1) no México e na Argentina (Lechner & Albertó, 2011; Moreno-Fuentes & Bautista-Nava, 2006). No Brasil, é uma das cinco últimas espécies do gênero *Pleurotus* certamente conhecidas. Porém, os estudos sobre a espécie ainda são escassos e fragmentados (Menolli Jr *et al.*, 2014).



Figura 1. *Pleurotus albidus* desenvolvido sobre madeira na natureza.

(FONTE: Laboratório de Enzimas e Biomassas – UCS)

Estudo com o objetivo de produzir cogumelos de *P. albidus* em escala laboratorial foi realizado por Gambato *et al.* (2016). Nesse trabalho, foi avaliada a produção de *P. albidus* em meios com diferentes matérias-primas, bem como a influência da composição dos meios de

cultivo no perfil antioxidante dos cogumelos. Os resultados indicaram que, dentre os meios testados, a mistura de serragem de *Pinus spp.* com resíduo de maçã resultou na maior eficiência biológica ($70,40 \pm 8,61\%$). A respeito da atividade antioxidante, os melhores resultados foram obtidos com cogumelos produzidos no meio contendo casca de arroz e resíduo de uva ($373,43 \pm 2,64$ mg GAE/mL de extrato e IC_{50} igual a 3,50 mg/mL no ensaio de DPPH). Num segundo estudo (Gambato *et al.*, 2018), foi analisada a composição centesimal do cogumelo *P. albidus* (Tabela 1), produzido em meio contendo por serragem de *Pinus spp.* e farelo de trigo, que demonstrou altos conteúdos de fibra alimentar total e de proteínas e baixo conteúdo de gorduras totais.

Tabela 1. Composição centesimal do cogumelo *Pleurotus albidus* desidratado

Componentes	Conteúdo (g/100 g)
Umidade	$8,73 \pm 0,03$
Cinzas	$5,87 \pm 0,09$
Proteínas	$21,82 \pm 0,12$
Fibra alimentar total	$42,20 \pm 0,10$
Gorduras totais	$3,72 \pm 0,06$
Carboidratos	$17,63 \pm 0,50$

Fonte: Gambato *et al.* (2018).

Devido à sua composição química, o interesse em espécies do gênero *Pleurotus* no desenvolvimento de novos alimentos funcionais vem crescendo. Para Lavelli *et al.* (2018), existem três principais estratégias para o desenvolvimento de alimentos funcionais utilizando *Pleurotus spp.*, que são a sua utilização como agente fortificante (aumento do valor nutricional dos alimentos, principalmente, a base de cereais), substituto de ingredientes proteicos (em

produtos de carne e frango processados, por exemplo, empanados) e ingrediente prebiótico (fibras alimentares, como beta-glucanas, que estimulam o crescimento da microbiota intestinal).

Os polissacarídeos presentes na composição dos macrofungos são reconhecidos como alimentos funcionais e merecem destaque devido a sua atividade imunomodulatória e antitumoral (Reis *et al.*, 2017). Polissacarídeos extraídos de basidiomas e de micélio de *P. albidus*, identificados como α e β -glucanos, apresentaram potencial efeito imunomodulatório em macrófagos, regulando a produção de óxido nítrico (NO), os fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a fagocitose (Castro-Alves *et al.*, 2017).

Os efeitos do extrato obtido do basidioma de *P. albidus* na disfunção mitocondrial induzida por hiperglicemia em células endoteliais EA.hy926 foram estudados por Gambato *et al.* (2018). Foi observado que o tratamento com *P. albidus* previu o aumento da atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Ainda, a geração de espécies reativas de oxigênio foi minimizada, bem como os danos à lipídios e às proteínas induzidos pela condição de hiperglicemia foram diminuídos. Os autores sugerem que os resultados podem estar associados a atividade antioxidante de compostos fenólicos e de ergotioneína presentes no extrato de *P. albidus*.

A produção de biomassa micelial de *P. albidus* em cultivo submerso foi reportada pela primeira vez em um estudo de Kirsch *et al.* (2016), que avaliou a influência dos parâmetros físico-químicos no processo. A maior quantidade de biomassa ($9,81 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida nas seguintes condições: 30 g.L^{-1} de sacarose, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, 180 rpm de agitação e pH 7,0. Segundo os mesmos autores, os resultados do trabalho podem contribuir para a produção de biomassa micelial para o consumo humano.

A biomassa de *P. albidus* também tem sido pesquisada com o objetivo de utilizá-la como um suplemento para a nutrição animal, conforme reportado no estudo de Sartori *et al.* (2015), que demonstrou que o micélio de *P. albidus* é uma fonte alimentar promissora para peixes.

2.1.2 Gênero *Auricularia*

Os fungos do gênero *Auricularia* pertencem a classe Basidiomicetos, ordem Auricularicales, família Auriculariaceae. Seus basidiomas se caracterizam por serem ressupinados ou pileados, em forma de orelha ou concha ou formando estreitas brácteas imbricadas, frouxamente elásticas ou duras e gelatinosos (Lowy, 1951; Wong, 1993; Choudhury & Sarma, 2014).

Os primeiros cogumelos cultivados pela humanidade foram os do gênero *Auricularia*, na China, por volta de 400 d.C. Diferentes espécies deste gênero são comestíveis e possuem importância medicinal, sendo utilizadas por vários séculos na tradicional medicina chinesa para reduzir os níveis de colesterol sanguíneo (Luo *et al.*, 2009, Nguyen *et al.*, 2012).

Polissacarídeos solúveis de *A. polytricha* são os componentes ativos considerados responsáveis pelas atividades biológicas de anticoagulante, antitumoral e imunológicas (Zeng *et al.*, 2012). Administração oral de polissacarídeos extraídos do basidioma de *A. polytricha*, durante 28 dias, reduziu os níveis de colesterol total, colesterol lipoproteico de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos em ratos com hipercolesterolemia, indicando o potencial uso deste cogumelo como alimento funcional (Zhao *et al.*, 2015).

Resultados de estudos recentes demonstram a extração de vários compostos de interesse em diferentes áreas. Chang *et al.* (2019) produziram quitosana a partir de micélio de *Auricularia* sp. que resultou em maior atividade antimicrobiana do que a quitosana comercial frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Em outros estudos, o interesse foi a produção e a extração de melanina em espécies *A. auricula*, visando a aplicação do pigmento como corante natural em alimentos, cosméticos ou medicamentos (Sun *et al.*, 2016; Zou & Ma, 2018). Slivinski *et al.* (2019) relataram o isolamento e a identificação de um alcaloide (éster metílico do ácido brotássico) extraído de *Auricularia* sp. Segundo os mesmos autores, existe

um interesse considerável em usar alcaloides derivados de cogumelos para terapias de tratamento da depressão e da dependência de drogas.

Basidiomas do gênero *Auricularia* possuem características peculiares, muito apreciadas por consumidores dos países asiáticos devido às características sensoriais de sabor e ao seu valor nutricional. Na Tabela 2 consta a composição nutricional do cogumelo *A. fuscosuccinea* comercializado em Taiwan (Mau *et al.*, 1998).

Tabela 2. Composição centesimal do cogumelo *Auricularia. fuscosuccinea*

Componentes	Conteúdo (g/100 g)
Carboidratos	71,19
Fibra bruta	11,69
Proteínas	8,62
Gorduras totais	4,48
Cinzas	4,02

Fonte: Mau *et al.* (1998)

O gênero *Auricularia* é cosmopolita, com espécies distribuídas em vários continentes, podendo ser encontradas em zonas tropicais, subtropicais e temperadas. A espécie *A. fuscosuccinea* (Figura 2), para a qual os estudos ainda são escassos, foi recentemente isolada no bioma Mata Atlântica no Estado do Rio Grande do Sul (Rosa *et al.*, 2015) e relatada no Estado de Goiás (Alvarenga *et al.*, 2015). Segundo Alvarenga *et al.* (2015), existem registros de utilização da espécie como alimento por tribos indígenas. *A. fuscosuccinea* se diferencia das outras espécies do gênero ter basidioma com coloração marrom vináceo a rosado e zona medular clara.



Figura 2. *Auricularia fuscosuccinea* desenvolvido sobre madeira na natureza.

(FONTE: Laboratório de Enzimas e Biomassas – UCS)

2.1.3 Gênero *Agaricus*

Os corpos de frutificação dos fungos do gênero *Agaricus* são geralmente carnosos, de tamanho médio à grande, de cor esbranquiçada à parda, caracterizando-se pela presença de píleo (chapéu) e estirpe (talo ou pé). Dentre as espécies deste gênero destacam-se *A. blazei* e *A. bisporus*, popularmente conhecidos no Brasil como Cogumelo do Sol® e “champignon”, respectivamente (Shibata & Demiate, 2003).

O cogumelo *A. blazei* Murrill (Figura 3) tem origem na cidade paulista de Piedade. Após sua descoberta na década de 1960, amostras foram enviadas ao Japão para estudo que revelou suas propriedades antitumorais. Após esta descoberta, os japoneses passaram a importar o cogumelo do Brasil. O interesse repentino pelo cogumelo, sem o devido estudo pela comunidade científica, gerou informações contraditórias sobre a sua classificação, surgindo outras denominações sinônimas (Dias *et al.*, 2004).



Figura 3. *Agaricus blazei* Murrill

Fonte: Sokovic *et al.* (2018)

Vários fatores como a idade, o ambiente, o local e a natureza do substrato de cultivo, podem influenciar na composição nutricional dos cogumelos, sobretudo o teor de proteínas. Em estudo realizado por Shibata & Demiate (2003), foi determinada a composição nutricional de diferentes linhagens de *A. blazei*. Os valores médios determinados constam na Tabela 3. Os autores observaram, ainda, que cogumelos menores (mais jovens) continham maiores teores de proteínas.

Tabela 3. Composição centesimal do cogumelo *Agaricus blazei*

Componentes	Conteúdo (g/100 g)
Carboidratos	45,30
Proteínas	37,40
Fibra bruta	8,82
Cinzas	7,49
Gorduras totais	0,99

Fonte: Adaptado de Shibata & Demiate (2003).

O cogumelo *A. blazei* é amplamente consumido como alimento funcional. Diversos estudos têm atribuído as atividades imunomodulatória e anticancerígena desse cogumelo ao conteúdo de polissacarídeos bioativos, particularmente os glucanos (Firenzouli *et al.*, 2008).

No entanto, Wang *et al.* (2018), ressaltam a identificação de um heteropolissacarídeo de caráter ácido contendo fucose como sendo o responsável pela sua atividade biológica. Outras importantes moléculas também foram identificadas na espécie *A. blazei*, como ergosterol (Gao & Gu, 2007; Dalla-Santa *et al.*, 2012), compostos fenólicos e ácidos orgânicos (Carvajal *et al.*, 2012), lovastatina, ergotioneína e ácido γ -aminobutírico (GABA) (Chen *et al.*, 2012).

Na maioria das vezes, *A. blazei* é comercializado e consumido na forma de cápsulas contendo o pó ou extrato concentrado do cogumelo (Firenzouli *et al.*, 2008). O uso do micélio é uma forma alternativa de consumo, que pode promover benefícios à saúde semelhantes aos obtidos com utilização dos basidiomas, especialmente com relação à atividade antioxidante (Carvajal *et al.*, 2012).

Diante do exposto, percebe-se aspectos relevantes dos macrofungos *P. albidus*, *A. fuscouscinea* e *A. blazei* quanto ao aporte nutricional e de compostos bioativos na alimentação. No entanto, o consumo de macrofungos comestíveis pode ser limitado devido ao seu alto custo, que pode ser consequência do período necessário para o cultivo, principalmente em países ocidentais sem tradição no seu consumo. Sendo assim, uma alternativa seria aproveitar os macrofungos na forma de micélio, pois sua obtenção é mais rápida (Mokochinski *et al.*, 2015). Estudos recentes destacam que os micélios, bem como os meios de cultivo utilizados para a sua produção, podem representar fonte de compostos de interesse como ácidos fenólicos e ergosterol, ambos com atividade antioxidante (Souilem *et al.*, 2017), e de micoproteínas (Adetunji & Adejumo, 2017).

2.2 Cultivo em estado sólido para obtenção de micoproteínas

O cultivo em estado sólido (CES) representa uma importância histórica para a humanidade, pois acredita-se que por meio deste processo tenha ocorrido o início da técnica de

fermentação pelos povos antigos (Pandey, 2003), e que há milhares de anos vem sendo utilizada para produção de pães, queijos, alimentos da culinária oriental, entre outros (Soccol *et al.* 2017).

Por definição, o CES é um processo biotecnológico em que os microrganismos crescem em um meio ou material na ausência ou baixo conteúdo de água livre. No entanto, o meio de cultivo deve possuir umidade suficiente para o metabolismo do microrganismo. O processo é conduzido em um material não solúvel, que atua tanto como suporte físico quanto como fonte de nutrientes (Pandey, 2003). O baixo conteúdo de umidade limita os microrganismos que podem ser utilizados no CES (Couto & Sanromán, 2006). Uma vez que a técnica simula seu habitat natural, fungos filamentosos são os mais adequados, sendo capazes de sintetizar enzimas e outros metabólitos de interesse industrial nestas condições (Soccol *et al.*, 2017).

São algumas vantagens do CES: as condições do cultivo são próximas das que se desenvolvem em meios naturais, a simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações devido ao menor teor de água livre, redução dos efluentes líquidos a tratar e produção concentrada de metabólitos. Por outro lado, as limitações da técnica ainda impedem sua ampla utilização industrial, como dificuldade de remoção de calor, tipos de substratos limitados e a dificuldade de se medir variáveis como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido (Singhania *et al.*, 2009).

A determinação da concentração celular também é uma dificuldade encontrada no CES, pois a biomassa celular não pode ser quantificada separadamente do substrato, devido ao fato de não ser possível separá-los, dificultando a determinação direta da biomassa. O crescimento dos microrganismos em CES pode ser monitorado por diferentes métodos de determinações indiretas, como a avaliação do consumo de oxigênio e produção de gás carbônico; o acompanhamento da produção de enzimas extracelulares e metabólitos primários; a medição do componente celular glicosamina (Zheng & Shetty, 1998) ou ergosterol (Dalla Santa *et al.*, 2012).

O processo de CES é utilizado para a produção comercial de cogumelos utilizando diferentes materiais como meio de cultivo, tais como os resíduos lignocelulósicos. As espécies de macrofungos comestíveis são capazes de converter os resíduos agroindustriais em proteína de alto valor biológico, a qual é utilizada na alimentação humana na forma do corpo de frutificação (cogumelo). Por outro lado, também pode enriquecer as matérias-primas vegetais em micoproteína por meio do crescimento do micélio em CES (Chang, 2010).

Neste sentido, a bioconversão dos resíduos sólidos oriundos de atividades agroindustriais está recebendo crescente atenção, uma vez que estes se apresentam como uma possibilidade para a síntese de produtos com valor agregado pelo cultivo de microrganismos em estado sólido (CES) (Sadh *et al.*, 2018). Além do mais, o reconhecimento dos resíduos sólidos reutilizáveis e recicláveis como um bem econômico e de valor social recebe o incentivo da Política Nacional dos Resíduos Sólidos (PNRS) (BRASIL, 2010).

De acordo com a PNRS, resíduos sólidos podem ser reciclados por meio de processos de transformação que envolvam a alteração de suas propriedades físicas, físico-químicas ou biológicas, com vistas à transformação em insumos ou novos produtos. E, somente após esgotadas todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e viáveis, e não haver outra possibilidade a não ser a disposição final ambientalmente correta, os resíduos sólidos são então denominados rejeitos (BRASIL, 2010).

2.3 Matérias-primas vegetais

A seguir são disponibilizadas informações sobre as matérias-primas vegetais (grãos de cereais e resíduos sólidos agroindustriais) utilizadas, em particular, para o desenvolvimento do presente trabalho, as quais foram utilizadas como matérias-primas em CES de macrofungos para a produção de farinhas de micoproteínas.

2.3.1 Grãos de cereais

Grãos de cereais constituem em uma importante fonte nutricional, principalmente de carboidratos (Blandino *et al.*, 2003; Dordevic *et al.*, 2010). Devido ao conteúdo de fibras alimentares e à presença de fitoquímicos como ácidos fenólicos, flavonoides, vitaminas e minerais, entre outros, confere benefícios à saúde humana, especialmente quando consumido na forma integral (Wang *et al.*, 2014).

O arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, sendo seu maior consumo na forma de grão. A estrutura do grão de arroz consiste em cariopse e casca, sendo esta composta por duas folhas modificadas, a pálea e a lema. O arroz integral é obtido a partir do descascamento do grão, no qual a casca é separada da cariopse. Do polimento do arroz integral para a retirada do farelo é obtido o arroz branco polido, processo que resulta na redução dos componentes nutricionais do grão (Walter *et al.*, 2010).

O cultivo do milho no Brasil é realizado em praticamente todo o território. No entanto, 90% da produção concentra-se nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A produção do milho é destinada tanto ao consumo humano como para ração animal (Garcia *et al.*, 2006). Para consumo humano, são cultivados os chamados milhos especiais, que envolve a produção de milho verde, milho pipoca, minimilho, milho com alto teor de óleo, milho para canjica, entre outros. A obtenção do milho canjica consiste na retirada da película externa e do germen do grão, o qual é utilizado na extração do óleo. Após então, os grãos são submetidos às etapas de polimento, lavagem, secagem e embalagem (Pereira Filho & Cruz, 2009).

O trigo possui importância nos aspectos econômicos e nutricionais da alimentação humana. Devido às propriedades de suas proteínas mediante hidratação, a sua farinha é utilizada na fabricação de produtos, principalmente pães e massas (Catteral & Cauvain, 2009). No Brasil,

o cultivo do trigo é realizado na Região Sul, principalmente nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul, sendo muitas vezes utilizado de rotação no inverno (COSTA *et al.*, 2008).

Diversos alimentos tradicionais na culinária oriental são produzidos em CES de grãos por microrganismos como, por exemplo, o produto japonês “natto” (grãos de soja cultivados com *Bacillus*) e o chinês “anka” (arroz cultivado com *Monascus*) (Liu *et al.*, 2013). Grãos de cereais podem ser utilizados como matéria-prima para obtenção do micélio de macrofungos em CES (Kang *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2015). Por meio deste bioprocesso, é possível ainda aumentar o conteúdo de compostos bioativos em cereais, promovendo a melhoria desta matéria-prima pelo incremento no valor nutricional (Đorđević *et al.*, 2010). No Quadro 1 estão relacionados os principais trabalhos (últimos 10 anos) que pesquisaram a utilização de grãos de cereais ou sementes de leguminosas em CES de micélio de macrofungos (basidiomicetos e ascomicetos), com diversos objetivos.

Quadro 1. Levantamento de trabalhos científicos com grãos e sementes cultivados em estado sólido com macrofungos.

Matéria-prima (grão/cereal)	Macrofungo	Objeto de estudo	Referência
Grão de arroz	<i>Cordyceps sinensis</i>	Composição química e bioativos	Zhang <i>et al.</i> (2008)
“Adlay”, soja preta, trigo sarraceno, arroz integral, arroz “embryo”, arroz polido, aveia, soja e trigo	<i>Cordyceps sinensis, Termitomyces albuminosus, Antrodia camphorata e A. salmonela</i>	Novos produtos e análise de compostos não voláteis	Liang <i>et al.</i> (2009)
“Adlay” e arroz	<i>Phellinus linteus</i>	Antioxidantes	Liang <i>et al.</i> (2009)
Trigo	<i>Cordyceps militaris</i>	Antioxidantes	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Sorgo	<i>Lentinus edodes, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus e Cordyceps sp.</i>	Ração para frangos	Hines <i>et al.</i> (2013)
Arroz	<i>Pleurotus eryngii</i>	Análise química	Liu <i>et al.</i> (2013)
Trigo	<i>Agaricus subrufescens Peck (= A. brasiliensis)</i>	Polissacarídeos	Camelini <i>et al.</i> (2013)
Trigo	<i>Ganoderma australe</i> (KUM60813), <i>G. neojaponicum</i> (KUM 61076) e <i>G. lucidum</i> (VITA GL)	Antioxidantes	Subramaniam <i>et al.</i> (2014)
Trigo	<i>Grifola frondosa, G. gargal e G. sordulenta</i>	Antioxidantes	Postemsky & Curvetto (2014)

Trigo sarraceno, aveia, arroz “embryo” e trigo	<i>Taiwanofungus salmoneus</i>	Antioxidantes e anti-inflamatório	Chiang <i>et al.</i> (2015)
Trigo e malte	<i>Agaricus brasiliensis</i>	Biomassa micelial e ergosterol	Mokoschinski <i>et al.</i> (2015)
Trigo, arroz, aveia, milho, milheto, sorgo e “broomcorn millet”	<i>Agaricus blazei</i> Murril	Composição nutricional e antioxidantes	Zhai <i>et al.</i> (2015)
Grão de bico	<i>Cordyceps militaris</i> SN18	Propriedades físico-químicas e funcionais	Xiao <i>et al.</i> (2015)
Trigo Sarraceno	<i>Agaricus blazei</i> Murril SH26, <i>A. bisporus</i> AS2196 e <i>A. bisporus</i> G1	Compostos fenólicos e antioxidantes	Kang <i>et al.</i> (2017)
Arroz integral, feijão vermelho, feijão mungo e soja	<i>Xylaria nigripes</i>	Atividade antioxidante, anti-inflamatória e efeito neuro-protetor	Divate <i>et al.</i> (2017)
Milho	<i>Agaricus brasiliensis</i> e <i>A. bisporus</i>	Teor proteico, compostos fenólicos e antioxidantes	Zhai <i>et al.</i> (2018)
Trigo	<i>Pleurotus ostrearus</i> e <i>Lentinus edodes</i>	Ração para peixes	Pascual <i>et al.</i> (2018)
Soja	<i>Tricholoma matsutake</i>	Composição nutricional e antioxidantes	Lee <i>et al.</i> (2019)

2.3.2 Bagaço de malte

O segmento de cervejas artesanais vem ganhando espaço mercado nacional de bebidas. De acordo com os dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o número de cervejarias artesanais registradas no Brasil cresceu 37,7% no ano de 2017, sendo que o Rio Grande do Sul é o Estado brasileiro com mais empreendimentos, seguido por São Paulo e Minas Gerais (Associação Brasileira de Cerveja Artesanal, 2018). O crescimento do segmento de cervejas artesanais também foi registrado no cenário mundial, sendo observado um aumento exponencial nos últimos anos (Albanese *et al.*, 2018).

O bagaço de malte é o principal resíduo sólido da produção cervejeira, representando 85% dos resíduos gerados nesta atividade. Consiste nas cascas dos grãos maltados obtidos após a produção do mosto (Mussatto *et al.*, 2006). Em média, para cada 100 L de cerveja fabricados são gerados 20 kg de bagaço de malte úmido. Assim, estima-se que sejam geradas, no mundo, mais de 30 milhões de toneladas do bagaço por ano. (Lynch *et al.*, 2016).

Com relação a composição química do bagaço de malte, esta pode variar de acordo com o tipo de cereal maltado, os processos de maltagem e de brassagem, bem como o uso de adjuntos cervejeiros. Basicamente, é um material lignocelulósico em que os compostos majoritários são fibras (30 a 50%), proteínas (19 a 30%) e lignina (12 a 28%). Também estão presentes, em menor quantidade, gorduras, minerais (fósforo, magnésio, cálcio), amido e compostos fenólicos (ácidos ferúlico e hidroxicinâmico). Quanto ao perfil de aminoácidos, o mais abundante é a lisina, um aminoácido essencial normalmente deficiente em alimentos à base de cereais (Lynch *et al.*, 2016).

Um dos principais destinos do bagaço de malte é a nutrição animal de ruminantes, mas devido aos elevados conteúdos de fibras alimentares e de proteínas, o bagaço tem despertado o interesse para alimentação humana (Lynch *et al.*, 2016, Steiner *et al.*, 2015). A expansão dos

campos de aplicação para o maior resíduo da indústria cervejeira está em estudo como, por exemplo, o CES do bagaço de malte pelo fungo *Rhizopus oligosporus* com o objetivo de incrementar o valor nutricional para uso na ração de pequenos animais (Canedo *et al.*, 2016).

De acordo com Cooray & Chen (2018), o CES do bagaço de malte por *Rhizopus oligosporus* é uma estratégia para agregar valor a este resíduo, pois as enzimas produzidas durante o crescimento microbiano auxiliam na liberação de nutrientes do bagaço de malte e os metabólitos produzidos pelo fungo seriam os responsáveis por agregar valor ao bagaço original.

O bagaço de malte é uma excelente matéria-prima para o cultivo de fungos e foi explorado para a produção de cogumelos (corpos de frutificação) *P. ostreatus* (Wang *et al.*, 2001, Gregori *et al.*, 2008). No entanto, estudos que abordem a sua valorização por meio do desenvolvimento de micélio de macrofungos em CES, conforme proposto no presente trabalho, ainda são escassos.

2.3.3 Bagaço de uva

De acordo com dados do IBRAVIN (Instituto Brasileiro do Vinho), em 2018 foram processados 663,2 milhões de kg de uvas no Estado do Rio Grande do Sul. Dentre os produtos fabricados, merece destaque a evolução na produção de derivados da uva e do vinho como, por exemplo, o suco de uva, que nos últimos 10 anos aumentou de 93,19 para 160,67 milhões de litros (Ibravin, 2019). O bagaço de uva, composto por cascas, sementes e engaces, é o principal resíduo sólido da industrialização da uva e requer uma disposição adequada para evitar impactos ambientais (Pereira *et al.*, 2018).

Os resíduos da fruta são ricos em compostos lignocelulósicos, açúcares, polifenois, taninos, entre outros. Apesar de ser uma matéria-prima promissora para extração de compostos

de interesse industrial ou para geração de energia renovável, as tecnologias para explorar este potencial ainda não são amplamente adotadas na vitivinicultura (Muhlack *et al.*, 2018).

O bagaço de uva pode ser usado na alimentação animal, especialmente na estação seca, quando as pastagens são escassas. Seu uso é limitado em até 30% da ração para ruminantes devido ao seu baixo valor nutricional e aos fatores antinutricionais, como componentes fenólicos, que inibem os simbiontes nutricionais (Mole *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 2002). Apesar das limitações, Rotava *et al.* (2009) testaram a adição de resíduos do processamento da uva como promotores de crescimento na ração para frangos de corte, pois estudos anteriores haviam comprovado a atividade antimicrobiana *in vitro* dos compostos fenólicos presentes nas sementes de uva. Porém, não foram evidenciadas influências nas variáveis zootécnicas avaliadas e não foi observado o efeito promotor de crescimento esperado com a administração de subprodutos da uva. Desta forma, os autores não recomendam a utilização de subprodutos da uva como aditivos na ração para frangos de corte.

Sánchez *et al.* (2002) estudaram a biodegradação de resíduos da atividade vitivinícola (poda da videira e bagaço de uva) em processo de bioconversão por linhagens de *Pleurotus* spp. por meio de CES, visando a produção de corpos de frutificação e a utilização do substrato, após coleta dos cogumelos, na alimentação de animais ruminantes. Foi reportada uma diminuição de aproximadamente 50% nos compostos fenólicos totais do substrato após a produção dos cogumelos. Como os fenólicos são considerados fatores antinutricionais na alimentação animal, a referida diminuição favorece o uso dos resíduos da vitivinicultura na ração de ruminantes.

Estudos têm reportado a utilização do bagaço de uva como matéria-prima na produção de cogumelos (Rettore *et al.*, 2011; Paz *et al.*, 2012; Gambato *et al.*, 2016; Koutrotsios *et al.*, 2014; Zangalli & Giovanni, 2013). No entanto, estratégia de produção de biomassa micelial (micoproteínas), sem induzir a frutificação, é pouco explorada. No Quadro 2 consta a relação

dos principais trabalhos (últimos 10 anos) que abordaram a utilização de resíduos agroindustriais em CES de micélio de macrofungos (basidiomicetos e ascomicetos).

Quadro 2. Principais trabalhos científicos com a utilização de resíduos agroindustriais em CES com macrofungos.

Matéria-prima (resíduo agroindustrial)	Macrofungo	Objeto de estudo	Referência
Polpa de oliveira	<i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>P. pulmonarius</i>	Ração animal	Brozzoli <i>et al.</i> (2010)
Torta de oliveira	<i>Fomes fomentarius</i>	Aumento teor nutritivo; rações	Neifar <i>et al.</i> (2013)
Bagaços de uva, de maçã, de abacaxi e casca de abacaxi	<i>Agaricus brasiliensis</i>	Produção de biomassa micelial	Mokoschinski <i>et al.</i> (2015)
Resíduo de tangerina	<i>Lentinus polychrous</i>	Crescimento micelial e condições de secagem	Nitayapat <i>et al.</i> (2015)
Resíduo de soja	<i>Morchella esculenta</i>	Propriedades físico- químicas	Li <i>et al.</i> (2016)
Farelo de trigo	<i>Pleurotus eryngii</i> e <i>P. ostreatus</i>	Uso em alimentos e rações	Wanzenböck <i>et al.</i> (2017)
Farelo de soja, casca de amendoim, casca de sementes de moringa oleífera, farelo de milho, espiga de milho, farinha de palmistre, farelo de arroz e casca de mandioca	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Produção de “Mycomeat”	Adetunji & Adejumo (2017)

Considerando a revisão da literatura sumarizada nos Quadros 1 e 2, anteriormente apresentados, observa-se que a utilização dos macrofungos *P. albidus* e *A. fuscosuccinea* em bioprocessos por meio de CES, tendo grãos de cereais (arroz integral, milho ou trigo) ou bagaços (de malte de cevada ou de uva) como matéria-prima para a produção de farinhas de micoproteínas ainda não foram explorados. A respeito do macrofungo *A. blazei*, sua utilização neste tipo de abordagem foi relatada no levantamento realizado, porém os estudos são escassos e consiste em um tema a ser estudado.

2.4 Enriquecimento proteico de matérias-primas por meio de CES de macrofungos

Grãos de cereais e resíduos sólidos agroindustriais, entre outros, são potenciais matérias-primas para obtenção de proteína microbiana, agregando valor aos mesmos por meio de processos biotecnológicos que resultam em alimentos com elevado perfil nutricional (Vendruscolo *et al.*, 2009). A obtenção de proteína microbiana a partir de matérias-primas vegetais fornece uma fonte alternativa de proteína para uso em alimentos, tanto para seres humanos como para animais (Zepka *et al.*, 2010).

2.4.1 Características gerais e fontes de alimentos proteicos

As proteínas são macromoléculas nitrogenadas fundamentais para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção das funções celulares dos organismos vivos. Atuam em processos biológicos, constituindo enzimas, hormônios, anticorpos, moléculas de transporte, de motilidade e de armazenamento, além de possuir função estrutural (Nelson & Cox, 2019).

As unidades elementares das proteínas são os aminoácidos, constituídos de um átomo de carbono α (alfa) ligado covalentemente a um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um

grupo carboxílico e um grupo *R* de cadeira lateral. Os grupos *R* variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando a solubilidade dos aminoácidos em água (Damodaran *et al.*, 2010; Nelson & Cox, 2019).

Para constituição das proteínas, os aminoácidos são polimerizados por ligações amida, também conhecidas como ligações peptídicas. Dentre os aminoácidos, nove são considerados essenciais para a dieta humana, ou seja, não podem ser sintetizados pelo organismo a partir de outros compostos, devendo ser ingeridos por meio da alimentação (Moran *et al.*, 2013; Rogero *et al.*, 2013).

A capacidade de uma proteína em fornecer os aminoácidos essenciais (histidina, fenilalanina, isoleucina, metionina, valina, lisina, triptofano, treonina e serina) está associada ao seu valor biológico. Proteínas consideradas completas ou de alto valor biológico são aquelas que contêm os aportes necessários dos aminoácidos essenciais como, por exemplo, as proteínas de origem animal. As proteínas de origem vegetal são consideradas incompletas ou de baixo valor biológico por não possuírem níveis adequados de alguns destes aminoácidos (Bobbio & Bobbio, 2001; Damodaran *et al.*, 2010). Dentre os aminoácidos essenciais, a metionina desempenha um papel importante no processo de síntese proteica, pois quase sempre é o primeiro aminoácido de uma cadeia crescente de polipeptídeo (Moran *et al.*, 2013).

A maioria das proteínas consumidas pelo ser humano são de origem animal ou vegetal (Bobbio & Bobbio, 2001). Damodoran *et al.* (2010) alertam para a necessidade de desenvolver fontes não tradicionais de proteínas para a alimentação humana com o objetivo de atender às demandas decorrentes do aumento da população mundial. De acordo com dados da “Food and Agriculture Organization of the United Nation” (FAO) (2017), a estimativa da população mundial para o ano de 2050 é de 9,8 bilhões de habitantes, crescendo principalmente nos países em desenvolvimento. Segundo a organização, para alimentar a todos será necessário um aumento de 50 % na produção de alimentos entre o ano de 2012 e meados do século.

Como fontes não convencionais de proteína para a alimentação vêm sendo estudados insetos comestíveis (Akhtar & Iasman, 2018; Dossey *et al.*, 2016), algas (Koyande *et al.* 2019; Patias *et al.*, 2018) e microrganismos como leveduras (Aruna *et al.*, 2017; Magalhães *et al.*, 2018) e fungos (Nigam & Singh, 2014). Se para alguns a utilização de microrganismos como alimento pode ser inaceitável, por outro lado, há milhares de anos, o ser humano consome biomassa de microrganismos juntamente com produtos como pães, bebidas alcoólicas, queijos, molho de soja, entre outros (Anupama & Ravindra, 2000).

Células microbianas possuem elevado conteúdo de proteínas e, na maioria das vezes, contém todos os aminoácidos essenciais (Villas Bôas & Esposito, 2000). De acordo com a revisão de Cheung *et al.* (2010), o conteúdo de aminoácidos essenciais em macrofungos pode variar entre 30 a 50 g/100 g de proteínas em massa seca. De modo geral, foram determinados aportes dos aminoácidos ácido glutâmico (130–240 mg/g proteína), ácido aspártico (91– 120 mg/g proteína), arginina (37–140 mg/g proteína), treonina (41–95 mg/g proteína), valina (36– 89 mg/g proteína) e cisteína (16–19 mg/g proteína) e metionina (1,2–22 mg/g proteína). Segundo os mesmos autores, os aminoácidos limitantes em macrofungos são lisina, leucina, isoleucina e triptofano.

2.4.2 Micoproteínas

As micoproteínas, também conhecidas pelos termos proteína fúngica ou biomassa fúngica, são produzidas pelo cultivo de fungos micro ou macroscópicos, sendo constituídas pelas suas estruturas celulares, separadas ou não do substrato empregado no meio de cultivo (Anupama & Ravindra, 2000). Litchfield (1983) propôs a ideia de microrganismo como alimento, denominando-o proteína unicelular, que consiste em células secas de microrganismos, cultivadas e utilizadas como fonte de proteína na alimentação humana ou na

ração animal, podendo contribuir no atendimento das crescentes demandas mundiais por alimentos (Guizani & Mothershaw, 2005). Segundo Zepka *et al.* (2010), o conceito de micoproteína não se refere apenas às proteínas, mas também outros componentes nutricionais, como aminoácidos, vitaminas e minerais.

Cultivos de microrganismos para a fabricação de alimentos ricos em proteínas, alternativos à proteína de origem animal, foram desenvolvidos (Guizani & Mothershow, 2005). Um exemplo comercial é a marca Quorn®, da Inglaterra, que produz alimentos utilizando micoproteína como principal matéria-prima, cujo consumo vem se generalizando e crescendo no mundo. Este produto consiste na biomassa celular oriunda do cultivo submerso do fungo filamentoso *Fusarium venenatum*, em reator de sistema contínuo (Williamson *et al.*, 2006).

Para a produção de Quorn®, o meio de cultivo contendo a biomassa celular produzida é removido do reator e aquecido, com objetivo de induzir enzimas nucleases naturalmente presentes no micélio, para minimizar o conteúdo de ácido ribonucleico (RNA). Em seguida, é realizada a centrifugação, para obtenção de uma pasta de micélio com aproximadamente 75% (m/m) de umidade, e o resfriamento da biomassa. Após estas etapas, a matéria-prima está pronta para ser usada na formulação dos produtos Quorn® (Finnigan *et al.*, 2016). A redução do conteúdo de RNA presente na biomassa celular é importante para o consumo humano, pois conteúdos elevados de material genético podem causar danos à saúde, como aumento dos níveis de ácido úrico no organismo de indivíduos com pré-disposição, levando ao desenvolvimento de patologias como a gota e os cálculos renais (Rodger, 2001). Adicionalmente, existe a preocupação com possíveis reações adversas após a ingestão de Quorn® por indivíduos alérgicos. Estudos demonstram que o nível de reações por alergênicos presentes nesta micoproteína são similares a outros alimentos proteicos, tais como leite e ovos (Guizani & Mothershaw, 2005).

Por outro lado, a proteína fúngica de Quorn® apresenta valor nutricional relevante, pois é fonte de fibras alimentares, compostas por quitina e β -glucanos, reconhecidas pela sua alegação de propriedade funcional, podendo atuar como prebiótico no trato digestório e auxiliar na prevenção do diabetes e da hipercolesterolemia. Seu teor lipídico varia entre 2 e 3,5%, com perfil de ácidos graxos poli-insaturados semelhantes às gorduras vegetais (Rodger, 2001).

Segundo Nasseri *et al.* (2011), além de *Fusarium venenatum*, outros fungos podem ser usados para a obtenção de micoproteínas. Na sua maioria são fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, entre outros. Na literatura são reportadas diferentes combinações de matérias-primas e fungos para a produção de micoproteínas em CES, como bagaço de cana, palha de milho e celulose de madeira no bioprocesso com *Neurospora sitophila* (Moo-Young *et al.*, 1993); resíduo da industrialização do abacaxi com os fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger* (Suhet & Fioreze, 2011), bagaço de maçã com *Gongronella butleri* (Vendruscolo *et al.*, 2007), farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo com *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae* (Silveira & Furlong, 2007), farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae* (Araújo *et al.*, 2011), farelo de arroz com *R. oryzae* (Christ-Ribeiro *et al.*, 2019), farelo de arroz com *R. oryzae* e *Trichoderma reesei* (Souza *et al.*, 2019).

A utilização de alguns fungos filamentosos como, por exemplo, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*, em CES para enriquecimento nutricional de matérias-primas vegetais para fins alimentares requer cuidados devido ao fato de que estes microrganismos produzem micotoxinas, tais como a aflatoxina B₁. A ingestão de alimentos com micotoxinas podem causar graves consequências para a saúde animal ou humana devido aos seus efeitos tóxicos, nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos (Bhat *et al.*, 2010).

Os macrofungos basidiomicetos (cogumelos) comestíveis, além de não produzirem estes tipos de toxinas, ainda apresentam capacidade de biorremediar toxinas que possam estar presentes nas matérias-primas que compõem os meios de cultivo. Estes fungos, também chamados de fungos da degradação branca, são reconhecidos por produzir um complexo enzimático capaz de degradar as moléculas poli heterocíclicas da estrutura química das toxinas. Um trabalho realizado por Branà et al. (2017), demonstrou que *Pleurotus eryngii* é capaz de degradar mais de 86% da aflatoxina B₁ presente no meio contaminado com a micotoxina após 28 dias em CES.

Neste sentido, a utilização de macrofungos é vista como uma possibilidade para a produção de micoproteína, devido às características sensoriais e a estrutura fibrosa do micélio, apresentando-se como potencial alternativa à proteína de origem animal na formulação de alimentos (Kim et al., 2011) e uma estratégia para agregar valor à resíduos agroindustriais para uso na ração animal (Azevedo et al., 2009).

2.4.3 Obtenção de micoproteínas de macrofungos por meio de CES

A produção de micoproteínas vem sendo estudada mediante a utilização de diferentes matérias-primas, espécies de macrofungos e processos. A seguir são descritas informações sobre trabalhos da literatura que reportam o emprego do CES para a obtenção de micoproteínas.

Resíduos agroindustriais de arroz e de trigo foram utilizados em estudos de bioconversão por *Pleurotus sajor-caju* em CES, visando o incremento do valor nutricional e da digestibilidade destes resíduos para uso em ração animal. Os resultados demonstraram que o teor de proteína bruta aumentou de 2,9% para 6,3% no resíduo de arroz, e de 3,1% para 7,5% no resíduo de trigo, ambos após 20 dias de cultivo, sem suplementação de nitrogênio no meio (Bisaria et al., 1997).

Han (2003) estudou a degradação de amido e o aumento nutricional na farinha de milho durante o CES com o basidiomiceto *Hericium erinaceum*, um cogumelo tradicionalmente usado na cultura chinesa. Os melhores resultados foram obtidos após 25 dias de cultivo a 25º C, em meio sólido contendo farinha de milho adicionada de 15% (m/m) de farinha de soja, em que o conteúdo de amido reduziu de 63% para 22% e de proteína aumentou de 12% para 17%. Ainda, foram observados aumentos nos teores de lisina (36 para 56 mg/g) e de triptofano (9 para 13 mg/g). Diante do estudo realizado, o autor constatou que a farinha de milho e de outros cereais poderiam ser processados em muitos tipos de alimentos funcionais após CES por fungos com propriedades medicinais.

O bagaço de azeitonas foi no CES de micélio dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *P. pulmonarius*, durante 6 semanas a 28º C (Brozzoli *et al.*, 2010). Foi observado aumento na proteína bruta e diminuição nos compostos fenólicos presentes no resíduo de azeitonas, o que significa uma redução nos fatores antinutricionais para alimentação de ruminantes. Outro trabalho, investigou a bioconversão da torta de oliveira, um resíduo da indústria de azeite de oliva, pelo de cultivo em estado sólido com o cogumelo medicinal *Fomes fomentarius*, no intuito de avaliar o aumento do valor nutricional e da digestibilidade, visando a sua utilização na ração para ruminantes (Neifar *et al.*, 2013). De acordo com os resultados obtidos, um incremento de mais de 22,3% no teor proteico da torta de oliveira foi obtido após o cultivo. Adicionalmente, foi verificada diminuição nas frações fibrosas e o aumento na digestibilidade deste resíduo, sugerindo que o CES de torta de oliveira com micélio de *F. fomentarius* é adequado para a convertê-la em um produto com valor agregado para ração animal.

O objetivo do estudo de Xiao *et al.* (2015) foi investigar os efeitos do CES com micélio do cogumelo medicinal e comestível *Cordyceps militaris* na composição proteica de farinha de grão de bico. Os resultados demonstraram incrementos de 19,4% no conteúdo de proteína bruta

e de 32,1% nos aminoácidos totais, após 7 dias de cultivo a 25º C. Os autores observaram ainda que a farinha de grão de bico apresentou aumento na digestibilidade proteica *in vitro* e melhorias nas propriedades funcionais após o cultivo (Xiao *et al.*, 2015).

Resíduos de tangerina cultivados em estado sólido com micélio de *Lentinus polychrous* (cogumelo comestível) durante 4 semanas, apresentaram um enriquecimento proteico de 16 vezes, apresentando um teor de proteína de 32,5%, em base seca (Nitayapat *et al.*, 2015a).

O CES de resíduo de coalhada com cogumelo medicinal *Morchella esculenta*, durante 21 dias a 22,6º C, resultou no aumento do valor nutricional do resíduo quando comparado ao não cultivado. Os aminoácidos livres apresentaram aumento de mais de 117,0 %, enquanto que polissacarídeos e polifenóis totais aumentaram 280 e 28%, respectivamente, indicando que o resíduo de soja cultivado com *M. esculenta* poderia ser uma fonte promissora de antioxidantes para alimentos funcionais (Li *et al.*, 2016).

2.5 Compostos bioativos e atividade biológica de micoproteínas

No processo de produção de micoproteínas diversas transformações podem ocorrer na matéria-prima utilizada para o crescimento dos fungos, os quais são capazes de modificar os constituintes das mesmas. Mudanças bioquímicas ocorrem durante o processo de cultivo, podendo alterar a proporção entre nutrientes e fatores antinutricionais das matérias-primas vegetais, afetando a sua bioatividade e digestibilidade (Zhang *et al.*, 2012). Desta forma, o uso de matérias primas vegetais em CES de micélio de macrofungos, além de representar uma fonte alternativa de proteína, pode ser uma estratégia promissora na produção de compostos bioativos.

Compostos bioativos consistem em substâncias que possuem efeitos biológicos em organismos, células ou tecidos. As moléculas dos compostos bioativos podem ser classificados de acordo com o tamanho, em alta massa molecular (polissacarídeos, proteínas e gorduras) ou

baixa massa molecular (terpenoides, alcaloides, polifenóis) (Silva *et al.*, 2013). Compostos bioativos identificados em macrofungos podem apresentar diversos efeitos biológicos, tais como antioxidante, hipoglicêmica, hipolipidêmica, anti-hipertensiva, imunomodulatória, anticâncer, entre outras (Carrasco-Gonzáles *et al.*, 2017).

2.5.1 Compostos com atividade antioxidante

Antioxidantes sintéticos, como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), bem como propil galato (PG), são aditivos empregados na formulação de alimentos para retardar oxidação lipídica. Porém, a segurança destes tem sido questionada devido a sua toxicidade e possível carcinogênese (Shahidi, 2000; Williams & Iatropoulos, 1999).

Flavonoides e polifenóis são metabólitos secundários dos macrofungos conhecidos pela sua capacidade antioxidante (Gutteridge & Halliwell, 2010). Neste sentido, o CES de diferentes macrofungos por pode ser utilizado para desenvolver ingredientes alternativos aos antioxidantes sintéticos (Dordevic *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que o CES de fungos comestíveis pode induzir atividade de enzimas que atuam no realce de compostos fenólicos com atividade antioxidante, em especial, aqueles compostos que se encontram ligados dentro da matriz alimentar do substrato (Liang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

Phellinus linteus foi inoculado em grãos de “adlay” e de arroz cozidos e incubados por 22 e 14 dias, respectivamente, até a completa colonização do micélio. A avaliação da atividade antioxidante mostrou que os grãos, após o cultivo, apresentaram efetiva propriedade antioxidante para uso em produtos alimentícios, devido a presença de polifenóis e flavonoides (Liang *et al.*, 2009).

Com o objetivo de produzir suplementos antioxidantes, grãos de trigo foram utilizados no CES de *Cordyceps militaris*, conduzido a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por aproximadamente 3 semanas, até a colonização do meio pelo micélio, para avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante. Foi detectada a presença dos ácidos fenólicos: ferúlico, p-cumárico, vanílico, siríngico e cafeico. Observou-se, ainda, que a concentração destes ácidos e a atividade antioxidante foi maior nos extratos de trigo colonizados do que nos extratos obtidos de grãos sem colonização (Zhang *et al.*, 2012).

Mokochinski *et al.* (2015) estudaram a produção do micélio de *A. blazei* em cultivo submerso e em CES, utilizando resíduos da indústria de alimentos (bagaços de frutas) como matéria-prima. De acordo os resultados, micélio obtido por meio do CES desenvolveu maior atividade antioxidante do que o micélio produzido em cultivo submerso, devido a concentração dos compostos fenólicos totais e ao conteúdo de flavonoides. Além disso, foi observado um perfil de ácidos graxos com predominância de poli-insaturados, como os ácidos linolênico, linoleico e oleico, sendo demonstrado que *A. blazei* é capaz de sintetizar ácido graxos que não estão originalmente presentes no substrato, em particular ácido palmítico.

Nitayapat *et al.* (2015) determinaram o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do resíduo de tangerina utilizado em CES de micélio de *Lentinus polychrous*. De acordo om os resultados, o material obtido por meio do processo biotecnológico constitui um ingrediente com potencial para manufatura de alimentos e/ou rações.

Ergotioneína é um metabólito secundário produzido pelos macrofungos, encontrados tanto no micélio como nos corpos de frutificação (Chen *et al.*, 2012). Ergotioneína é sintetizada por fungos e algumas cianobactérias e micobactérias a partir do aminoácido histidina com grupos sulfurados e metila fornecidos pelos aminoácidos cisteína e metionina (Kalaras *et al.*, 2017). Apesar de não ser sintetizada por organismos superiores, ergotioneína é encontrada em

várias células e tecidos humanos, principalmente nos eritrócitos, na medula óssea, no fígado, no rim, no fluido seminal e nos olhos (Cheah & Halliwell, 2012).

Foi demonstrado que ergotioneína possui atividade antioxidante *in vitro* (Dubost *et al.*, 2007; Kalaras *et al.*, 2017), podendo ser encontrada em diversos cogumelos, mas as espécies do gênero *Pleurotus* despertam a atenção devido ao conteúdo de ergotioneína produzido (Chen *et al.*, 2012). Recentemente, Gambato *et al.* (2018) reportaram determinaram ergotioneína em extrato de *P. albidus* ($2,13 \pm 0,01$ mg/g), sugerindo que o mesmo poderia ter contribuído para a atividade biológica mitocondrial do extrato que preveniu o declínio da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e minimizou o dano oxidativo induzido por hiperglicemia em células endoteliais (EA.hy926).

2.5.2 Inibição enzimática

A colonização de alimentos por diversos fungos vem sendo investigada quanto ao seu efeito inibitório contra a atividade de algumas enzimas importantes no metabolismo, como lipase pancreática (Cai *et al.*, 2012) e α -glicosidase (Oh *et al.*, 2012).

Extratos etanólicos de aveia colonizada por *Aspergillus oryzae* possuem capacidade de inibir até 86% da enzima lipase pancreática em ensaios *in vitro*. O estudo reportou que efeitos inibitórios estão relacionados com o conteúdo de compostos fenólicos presentes na aveia colonizada (Cai *et al.*, 2012). Um novo alimento, denominado Nilamadana, foi desenvolvido a partir de sementes de painço colonizadas com *Penicillium roqueforti* por CES. A determinação de inibição enzimática *in vitro* revelou uma capacidade de inibição da enzima lipase pancreática de 17% (Dwivedi *et al.*, 2015).

Akata *et al.* (2019) analisaram seis cogumelos (*Coprinus comatus* (O.F.Mull.) Pers., *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer, *Agaricus campestris* L., *Lycoperdon utriforme* Bull.,

Macrolepiota procera (Scop.) Singer, e *Leucoagaricus leucothites* (Vittad.) Wasser) quanto as capacidades de inibir a atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase. Dentre os fungos analisados, maior inibição das enzimas α -amilase ($0,22 \pm 0,01$ mmol equivalentes de acarbose/g de extrato) e α -glicosidase ($2,97 \pm 0,14$ mmol equivalentes de acarbose/g de extrato) foi observada no extrato de *Lycoperdon utriforme*.

Poucos estudos demonstram a capacidade de inibição de enzima α -glicosidase por produtos resultantes do CES de micélios de macrofungos. Recentemente, Lee *et al.* (2019) analisaram a inibição de α -glicosidase pelos extratos de soja colonizada em CES de micélio de *Tricholoma matsutake* (um cogumelo simbiótico popular na Ásia) reportando 84,9% de inibição da atividade da enzima.

Outras enzimas importantes, como a enzima conversora de angiotensina I (ACE) são inibidas pelos extratos de matérias-primas vegetais colonizados com micélios de macrofungos. Xiao *et al.* (2015) observaram que a farinha obtida de grão de bico colonizado por micélio de *Cordyceps militaris*, em CES durante 7 dias a 25° C, demonstrou significativa atividade inibitória de ACE nos ensaios *in vitro*. A inibição desta enzima sugere que o extrato possui atividade anti-hipertensiva.

Lovastatina é metabólito secundário que pode ser encontrado tanto no micélio como nos basidiomas dos macrofungos (Chen *et al.*, 2012). Trata-se de uma estatina natural inibidora da síntese endógena do colesterol pelo organismo sendo, portanto, um agente redutor do colesterol. Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilgluratil-coenzima A redutase (HMG-CoA), uma enzima que catalisa a biossíntese de colesterol. Como resultado, tem-se a redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade). Sendo assim, a administração oral da lovastatina é indicada para reduções dos níveis elevados de colesterol total e LDL em pacientes com hipercolesterolemia primária, ou seja, quando a resposta à dieta e a outras medidas não-

farmacológicas isoladas foram inadequadas, e para retardar a progressão da doença aterosclerótica coronariana (Chen *et al.*, 2012; Lavelli *et al.*, 2018; Sorrentino *et al.*, 2010).

O conteúdo de lovastatina foi determinado em micélios e em corpos de frutificação de diversos macrofungos. Para *Agaricus blazei* o conteúdo foi de $769,9 \pm 7,2$ mg/kg de micélio. Em espécies do gênero *Pleurotus* o conteúdo de lovastatina determinado no micélio variou entre $44,5 \pm 0,9$ e $168,3 \pm 4,5$ mg/kg e nos corpos de frutificação os valores variaram entre $101,1 \pm 0,5$ e $606,5 \pm 5,6$ g/kg. Uma espécie do gênero *Auricularia* foi analisada, *A. mesenterica*, mas não foi detectada a presença de lovastatina (Chen *et al.*, 2012).

2.6 Propriedades físicas e físico-químicas das micoproteínas

A produção de biomassa microbiana provoca mudanças importantes nas características físicas e físico-químicas das matérias-primas, dentre as quais pode-se citar as alterações nos parâmetros de cor e nas propriedades tecnológicas, como mudanças nas capacidades de absorção de gordura e de água, que são importantes para o processamento de alimentos. Além do mais, proteínas, polissacarídeos e fibras oriundos da biomassa fúngica podem ser explorados sob o ponto de vista tecnológico, sendo aplicados na formulação de alimentos, fornecendo aos produtos características desejáveis de cor, sabor, estabilização de emulsões, melhoria de textura e capacidade de retenção de água, entre outras (Kurt & Gençcelep, 2018).

Os atributos sensoriais dos alimentos são influenciados pelas propriedades funcionais das proteínas, as quais se referem às propriedades físico-químicas que influenciam o desempenho das proteínas nos sistemas alimentares durante seu processamento, armazenamento, preparo e consumo. As propriedades reológicas e de textura dos alimentos dependem da interação da água com outros componentes do alimento, principalmente proteínas e polissacarídeos. Em alimentos de umidade baixa ou intermediária, como os produtos de

panificação e as carnes trituradas, a capacidade das proteínas de se combinar com a água é importante para a aceitabilidade desses alimentos (Damodaran *et al.*, 2010).

Segundo Raghavendra *et al.* (2004), o índice de absorção de água (IAA) de um alimento ou ingrediente alimentar é definido como a quantidade de água que permanece ligada ao material hidratado após a aplicação de uma força externa como, por exemplo, a centrifugação. De acordo com os mesmos autores, a capacidade de retenção de água (CRA) é a quantidade de água ligada ao material sem a aplicação de nenhuma força externa (exceto a gravidade e a pressão atmosférica).

Em um estudo de Xiao *et al.* (2015) foi realizado o cultivo do cogumelo *Cordiceps militis* sobre grão de bico por meio do CES. Ao investigar os efeitos do CES nas características físico-químicas e nas propriedades tecnológicas da farinha de grão de bico, os autores constataram que houve aumento no índice de absorção de água, nas capacidades de retenção de água e de absorção de gordura e melhorias nas propriedades emulsificantes em comparação com farinhas de grão-de-bico não cultivadas.

Segundo Li *et al.* (2016) a cor pode ser um atributo importante para alimentos, podendo influenciar a aceitabilidade do produto pelo consumidor e podendo ser utilizada para controle do processamento. Em seu estudo, os parâmetros cromáticos de resíduos de soja foram avaliados antes e após o CES de *Morchella esculenta*, relevando amostras mais escuras, com tonalidades mais avermelhada e mais amarelada após o bioprocesso, devido à acumulação de pigmentos do fungo durante o cultivo.

2.7 Uso de micoproteínas no desenvolvimento de alimentos

Os corpos de frutificação de cogumelos são utilizados como alimento há muitos anos. Recentemente, tanto os corpos de frutificação como o micélio fúngico, tornaram-se atraentes

como alimentos funcionais e como fonte de componentes bioativos (Ulzijargal *et al.*, 2013).

De acordo com Villas Bôas & Esposito (2000), produtos enriquecidos com micoproteínas podem ser utilizados como suplemento proteico na alimentação humana, ou como ingredientes alimentícios que funcionam como aromatizantes ou ainda como ração animal.

Córdova *et al.* (2012), elaboraram barras de cereais adicionadas de grãos de trigo colonizados por meio do CES por *Agaricus brasiliensis* e avaliaram sua capacidade antioxidante, a concentração de compostos fenólicos e de β-glucanos. Os resultados deste trabalho sugerem que a adição de micélio de *A. brasiliensis* em produtos alimentícios pode torná-los mais saudáveis, devidos às propriedades nutritivas e compostos bioativos desse macrofungo.

Em outra pesquisa, Kirsch (2013) melhorou o valor nutricional de barras de cereais substituindo parcialmente a aveia em flocos e os flocos de arroz por biomassa de *Pleurotus albidus* produzida em cultivo submerso. As barras de cereais obtidas tiveram aumento no teor de fibras e de minerais e menores valores energéticos, em comparação com a formulação padrão, sem adição da biomassa.

Os micélios liofilizados dos fungos *Antrodia camphorata*, *Agaricus blazei*, *Hericium erinaceus* e *Phellinus linteus* foram utilizados para substituir a farinha de trigo em 5% (m/m) na produção de pães. Determinações de textura evidenciaram que a substituição de farinha de trigo por micélio não afetou negativamente o perfil de textura dos pães. No entanto, resultados da análise sensorial apontam que a incorporação de micélio fúngico diminui a aceitabilidade dos produtos, demonstrando necessidade de ajustes na formulação para melhorar a aceitação dos pães suplementados com micélio (Ulzijargal *et al.*, 2013).

Avaliar a aceitabilidade sensorial de formulações de iogurte adicionadas de micélio de *A. brasiliensis*, produzido por cultivo submerso com bagaço de uva, e determinar a sua composição físico-química foi o objetivo da pesquisa realizada por Amaral *et al.* (2014). Os

resultados demonstraram que um nível de adição de até 5% de micélio de *A. brasiliensis* foi aceito pelos provadores, obtendo um índice de aceitação global de 74%. Foi constatado ainda que a adição de 5% do micélio não interferiu na composição físico-química do iogurte, quando comparada ao padrão. Os pesquisadores consideram o micélio de *A. brasiliensis*, produzido por cultivo submerso em meio com bagaço de uva, um potencial ingrediente com propriedades funcionais a ser adicionado aos derivados lácteos.

Farinhas obtidas de grãos que foram colonizados por macrofungos, pela técnica de CES, vem sendo incorporadas na formulação de produtos de panificação com o objetivo de aumentar o valor nutricional, desenvolver alimentos diferenciados e atender a atual demanda por alimentos funcionais (Chien *et al.*, 2016, Xiao *et al.*, 2016). Xiao *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da adição de uma farinha obtida de grão de bico colonizado com *Cordyceps militaris* na qualidade e na atividade antioxidante de pão de trigo. No estudo, a farinha de trigo foi parcialmente substituída pela farinha de grão de bico em 5% e resultou em pães com maior valor proteico, de gorduras, de compostos fenólicos e atividade antioxidante, além de melhorar o volume específico, densidade, textura e propriedades sensoriais dos pães.

Farinhas obtidas de grãos (trigo sarraceno, aveia, arroz e trigo) colonizados com *Antrodia salmonela* durante 28 dias, a 25º C, foram testadas individualmente na formulação de pães em substituição à farinha de trigo refinada (7%). Não foram constatadas diferenças na composição proximal, no perfil de textura e nos componentes não voláteis entre os pães, sendo observada similaridade nos resultados da avaliação sensorial em comparação com o pão branco. Ainda, foram identificados compostos bioativos (ergosterol, ergotioneína e ácido γ -amino butírico) nos pães suplementados com a farinha de grãos colonizados, sugerindo o uso destas farinhas na obtenção de pães como alimento funcional (Chein *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, produtos análogos à carne tiveram um aumento na popularidade, pois muitos indivíduos têm evitado o consumo excessivo ou total de proteína animal por diversos

motivos, seja devido ao alto teor de gordura saturada e colesterol presente em alguns tipos de carnes, às questões religiosas ou preocupações com o bem-estar animal. Assim, muitos cientistas de alimentos estão interessados na pesquisa destes produtos, motivados pelo desafio de simular textura, sabor, cor e valor nutritivo equivalente à carne (Kumar *et al.*, 2019).

Kim *et al.* (2011) obtiveram micélio de *Agaricus bisporus* em cultivos em estado submerso, utilizando-o na fabricação de um produto análogo a hambúrguer de carne, o qual foi comparado à um produto similar preparado com soja na análise do perfil de textura (TPA). Os resultados demonstraram o alimento preparado com micélio de cogumelo obteve propriedades de textura superiores às do preparado com soja, com maiores valores de dureza, elasticidade e mastigabilidade. Ainda, foram obtidos valores de aceitação global 5 e 2 para os análogos de carne preparados com micélio de cogumelos e com soja, respectivamente.

Recentemente, micélios do basidiomiceto *Pleurotus sapidus*, obtidos no cultivo em meios com bagaço de maçã ou com isomaltulose, foram testados na elaboração de sistemas análogos a salsichas veganas em comparação com ingredientes proteicos de fonte vegetal e formulações tradicionais com carne e frango. Os resultados obtidos nas análises sensoriais e de textura demonstraram que os micélios são uma alternativa às proteínas vegetais comerciais na elaboração de salsichas veganas (Stephan *et al.*, 2018).

2.8 Uso de micoproteínas na nutrição animal

A produção de micoproteínas pode ser interessante para aumentar o teor proteico e agregar valor à resíduos gerados pelas atividades agroindustriais (Silveira & Furlong, 2007), podendo ser produzido um alimento com perfil nutricional aprimorado devido ao desenvolvimento da proteína fúngica (Vendruscolo *et al.*, 2009). Na alimentação animal, as

proteínas fúngicas podem servir como substitutos para suplementos proteicos tradicionais, tais como o farelo de soja e a farinha de peixe (Nigam & Singh, 2014).

O micélio do fungo *Agaricus blazei* foi obtido por meio de CES em grãos de trigo. Estes grãos, quando ingeridos por camundongos, não demonstraram toxicidade e ainda, estimularam a atividade antitumoral. Este efeito se deve às propriedades antitumorais das substâncias bioativas presentes no *A. blazei* como, por exemplo, os polissacarídeos (Dalla-Santa, 2006).

Grãos de trigo e sementes de painço, ambos cultivados com *Agaricus blazei* em CES, foram disponibilizados como ração para aves silvestres por Oliveira *et al.* (2009). Os resultados do experimento demonstraram uma excelente aceitabilidade dos grãos, assim como a sua preferência frente a outros alimentos, habitualmente ofertados para as aves, como frutas ou ração. Adicionalmente, o estudo revelou o efeito antiparasitário dos grãos cultivados no tratamento de coccídeos, quando ingerido durante 21 dias pelas aves.

Fungos basidiomicetos produzem substâncias capazes influenciar o sistema imunológico das aves. Desta forma, sua adição na alimentação de frangos vem sendo utilizada como forma de reduzir a utilização de antibióticos (Machado *et al.*, 2007). Azevedo *et al.* (2009) avaliaram o efeito da adição de um composto exaurido da produção do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* à ração de frango de corte, num período total de 39 dias. Foi observado que a adição do composto não teve influência sobre o consumo de ração e a conversão alimentar. Porém, houve efeito positivo sobre o ganho de massa nos primeiros 21 dias e aumento no rendimento da carcaça. Assim, a adição do composto de *P. sajor-caju* à ração para frango de corte pode ser recomendada numa concentração de 5% (m/m).

Bagaço de maçã foi usado como substrato pelo fungo *Gongronella butleri* em CES, visando o seu enriquecimento proteico para uso na ração de tilápias. Os alevinos tratados com a ração enriquecida com 30% (m/m) de bagaço de maçã tratado obtiveram um aumento de

massa corporal de 44% quando comparados com as tilápias alimentadas com ração convencional (Vendruscolo *et al.*, 2009).

A vinhaça, um resíduo gerado na manufatura do etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, foi utilizada como matéria-prima para o cultivo de quatro espécies do gênero *Pleurotus* (*P. sajor-caju*, *P. ostreatus*, *P. albidus* e *P. flabellatus*). Os micélios obtidos após 15 dias de cultivo foram oferecidos na dieta de peixes *Danio rerio* (“Zebra fish”) por 28 dias. Os resultados do estudo relevaram que o teste de ração não demonstrou toxicidade aos peixes e que, dentre os fungos testados, a espécie mais promissora é *P. albidus*, pois apresentou a maior produção de biomassa em comparação com as demais ($16,27 \text{ g.L}^{-1}$) (Sartori *et al.*, 2015).

Wang *et al.* (2017) estudaram os alvos moleculares antioxidantes em frangos de corte alimentados com ração suplementada com 10% farelo de trigo colonizado por *P. eryngii* durante 12 dias em CES. Os resultados indicaram que a expressão do gene antioxidante, como a hemoglobinase-1 e a glutationa-S-transferase de células mononucleares, do sangue periférico de frangos que receberam a ração suplementada foi significativamente maior que a do grupo controle em 35 dias. Para genes de NADPH oxigenase e a proteína moduladora de espécies reativas de oxigênio 1, a expressão do grupo de frangos com ração suplementada foi menor que a do grupo controle em 21 e 35 dias. Desta forma, a utilização de farelo de trigo colonizado por *P. eryngii* como aditivo nutricional na avicultura pode regular a expressão de alvos antioxidantes moleculares em frangos de corte.

Diante do informações reportadas nesta revisão da literatura, percebe-se a relevância do estudo e da aplicação das micoproteínas para alimentação humana e para nutrição animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Macrofungos

Foram utilizadas as linhagens selvagens *Pleurotus albidus* (88F.13) e *Auricularia fuscosuccinea* (78F.3), coletadas e isoladas do bioma Mata Atlântica na cidade de São Francisco de Paula (RS), sob autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para acesso e envio de amostras de componentes de patrimônio genético (Processo nº 02001.007656/2012-11), sendo as espécies identificadas por análise de biologia molecular (Cantelle *et al.*, 2017) e indexadas na seção micológica do Herbário da Universidade de Caxias do Sul (UCS) sob números MIUCS 1586 e MIUCS 1577, respectivamente. Foi utilizada também a linhagem *Agaricus blazei*, adquirida da empresa BRASMICEL – Biotecnologia em fungicultura (Suzano, SP). As linhagens fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas da UCS e foram mantidas em meio ágar batata dextrose, sendo repicadas trimestralmente (PDA, Merck) (Kang *et al.*, 2017).

Os inóculos para o cultivo em estado sólido foram obtidos pela transferência de 1 cm² de micélio para placas de Petri de 200 mm de diâmetro, contendo meio PDA estéril, em cabine de fluxo laminar vertical (Filterflux, Brasil), incubadas a 28 ± 1° C, por 15 a 20 dias, até completa colonização do meio.

3.2 Matérias-primas vegetais: grãos e resíduos agroindustriais

Foram adquiridos no comércio local de Caxias do Sul/RS: Arroz parboilizado integral classe longo fino tipo 1 marca Prato Fino (Pirahy Alimentos Ltda, São Borja, RS, Brasil);

Canjica de milho subgrupo despeliculada classe amarela tipo 1 marca Valore (UnidaSul Distribuidora Alimentícia S/A, Esteio, RS, Brasil) e trigo em grão à granel.

Os resíduos utilizados foram os bagaços de uva e de malte de cevada, cedidos por empresas da região. O bagaço de uva foi doado pela empresa Tecnovin do Brasil, situada no Vale dos Vinhedos, no município de Bento Gonçalves/RS, em um único lote. Oriundos do processamento de suco de uva, os resíduos eram compostos por cascas (64%), sementes (35%) e engaces (1%) de uva (*Vitis labrusca* cv. Bordô, composição do bagaço determinada mediante secagem de amostra, separação manual e pesagem dos componentes), com teor de umidade de $69,6 \pm 2,30\%$ (m/m) (determinado pelo método gravimétrico em estufa). O acondicionamento do bagaço de uva foi realizado em embalagens de poli(etileno) e armazenado em refrigeração a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

O bagaço de malte de cevada, conteúdo de umidade $75 \pm 1,5\%$ (m/m) (determinado pelo método gravimétrico em estufa), foi doado pela cervejaria artesanal Vitrola de Nova Petrópolis/RS, imediatamente após o processo de brassagem de uma cerveja estilo India Pale Ale (IPA), consistido de malte tipo Pilsen, Viena, Special B e Carared (proporção de maltes não relevada pela empresa), em um único lote. O bagaço de malte foi acondicionado em recipientes fechados e armazenados sob refrigeração a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.3 Cultivo em estado sólido (CES)

Os meios de cultivo foram constituídos pelas matérias-primas vegetais acima descritas, sem qualquer suplementação. No caso dos grãos de arroz integral, milho e trigo, estes foram preparados com base no método proposto por Zhai *et al.* (2015), com modificações. Primeiramente, os grãos foram cozidos em água (proporção 1:1) durante 1 h em autoclave a 1 atm. Após 24 h do cozimento, quantidades de 200 g de cada grão foram distribuídos,

separadamente, em frascos de vidro (frasco com formato cilíndrico com 180 mm de altura, 65 mm de diâmetro; altura ocupada pelo meio foi de aproximadamente 70 mm), fechados e autoclavados por 2 h a 1 atm. Quando da utilização dos bagaços de malte e de uva, estes foram preparados de acordo com Nitayapat *et al.* (2015), com modificações, que consistiu na distribuição em frascos de vidro (200 g em cada) e duas autoclavagens de 1 h a 1 atm, com intervalo de 24 h entre os procedimentos.

Após resfriamento, as matérias-primas foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar (Filterflux, Brasil), com o material contido em $\frac{1}{2}$ placa Petri (200 mm de diâmetro), composto pelo PDA colonizado com o micélio dos macrofungos anteriormente descritos. Cada matéria-prima foi inoculada com cada micélio, separadamente. Os frascos foram cobertos com uma camada fina de gaze e algodão estéril e incubados em local protegido, a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, até a completa colonização dos meios. Amostras de matéria-prima sem inóculo foram utilizadas para controle. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

3.4 Farinhas de matérias-primas colonizadas pelos micélios (micoproteínas)

Após a completa colonização dos meios com os micélios dos macrofungos, os conteúdos totais dos frascos (matérias-primas com micélio) foram coletados e secos em estufa (Medclave, Brasil) a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h e moídos em moinho de facas do tipo Willey (Solab, Brasil) para obtenção de uma farinha contendo o micélio fragmentado (10 mesh), denominadas farinhas de micoproteínas, que foram armazenadas em sacos de poli(etileno) vedados, em local seco, arejado e protegido da luz (Zhai *et al.*, 2015). Matérias-primas vegetais não inoculadas (controle) foram processadas da mesma forma e denominadas farinhas controle. Amostras das farinhas foram avaliadas quanto aos conteúdos de biomassa fúngica (determinada indiretamente pela determinação de ergosterol), composição nutricional, perfil de aminoácidos, características

físico-químicas e tecnológicas, compostos fenólicos totais, concentrações de ergotioneína e de lovastatina e atividades antioxidantes e biológicas.

3.5 Utilização de farinha de micoproteína na formulação de alimentos

O biscoito tipo cookie foi elaborado com uma farinha de micoproteína, obtida no presente trabalho, selecionada considerando os resultados mais relevantes e promissores em termos de enriquecimento proteico e compostos bioativos.

Para avaliar o efeito da substituição total ou parcial da farinha de trigo refinada pela farinha de micoproteína, na formulação de biscoitos tipo “cookie”, foi utilizado um delineamento de misturas simplex-centroide, aumentado com pontos interiores, conforme delineamento experimental com dois fatores mostrado na Tabela 4. As seguintes funções respostas foram avaliadas: proteína, fibra alimentar total, cor e textura dos biscoitos, conteúdo fenólicos totais, DPPH (atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH[·]), ABTS (atividade antioxidante determinada pelo ensaio ABTS^{·+}) e AGA (inibição enzima α -glicosidase). Adicionalmente, foram avaliadas outras características como atividade de água (A_w), umidade, cinzas e teor de gorduras totais dos biscoitos.

Tabela 4. Delineamento de misturas simplex-centroide aumentado

Corrida	Mistura de farinhas	
	<i>X₁</i> (farinha de trigo refinada)	<i>X₂</i> (farinha de micoproteína)
1	1	0
2	0	1
3	0,5	0,5
4	0,75	0,25
5	0,25	0,75

Os biscoitos foram preparados em uma planta de panificação em escala-piloto (Instituto Federal de Santa Catariana, São Miguel do Oeste, SC, Brasil), com ingredientes adquiridos no mercado local (São Miguel do Oeste, SC, Brasil), conforme a seguinte formulação base (fornecida por uma empresa de biscoitos): farinhas (80 g); açúcar refinado (48 g); manteiga (48 g); gotas de chocolate (48 g); ovo inteiro (20 g); açúcar mascavo (4,8 g); leite em pó integral (4,8 g); açúcar de baunilha (2 g); sal amoníaco (0,8 g) e bicarbonato de sódio (0,6 g). As farinhas foram adicionadas de acordo com o design proposto (Tabela 4).

Os ingredientes de cada corrida foram pesados e misturados até obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, as massas foram modeladas em formato cilíndrico, com aproximadamente 40 mm de diâmetro, e armazenadas a – 18 °C, em freezer (CVU26, Consul, Brasil), por 24 horas. Antes de assar, as massas foram mantidas em temperatura ambiente (24° C) por 10 minutos. Em seguida, os cookies foram cortados com espessura de 10 mm e assados em forno combinado (Wictory WC-03, Tedesco, Brasil), função seco, pré-aquecido a 180° C por 10 minutos. Após resfriamento, foram acondicionados em embalagens poliméricas seladas.

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 Biomassa fúngica (extração e quantificação de ergosterol)

A biomassa micelial dos fungos *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* ou *P. albidus* contida nas farinhas obtidas a partir da moagem das matérias-primas colonizadas com os micélios em CES, foram estimadas indiretamente pela extração e quantificação de ergosterol. Primeiramente, foram obtidas as biomassas de *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* e *P. albidus* em cultivos em meio submerso. Para *A. blazei* foi utilizado um meio a base de extrato de grão de trigo, peptona e maltose, de acordo com Zhai & Han (2016). As biomassas de *A. fuscosuccinea* e *P. albidus* foram produzidas em meio composto por caldo proveniente de batata conforme descrito por

Cantele *et al.* (2017). Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultura estéril (autoclave por 20 min a 1 atm).

Para inoculação, foram adicionados três discos de micélio com 1,5 cm de diâmetro, de cada um dos fungos, separadamente. Após cobertura dos frascos com uma fina camada de gaze e algodão estéreis, a incubação foi realizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com agitação recíproca de 180 rpm, durante 7 dias, com coletada de amostras destrutivas, em triplicata, a cada 24 h a partir do segundo dia de cultivo. O volume total coletado dos frascos distribuído em tubos de Falcon de 50 mL, centrifugado a 3220 *g* (Eppendorf 5840 R, Alemanha), 4°C , durante 20 min. Após a retirada do sobrenadante, a biomassa micelial foi transferida para recipientes (com massa previamente determinada em balança analítica) e armazenada a -18°C em freezer (CVU26, Consul, Brasil), para posterior liofilização e pesagem em balança analítica, sendo descontada a massa inicial dos recipientes, para obtenção da massa de micélio.

A extração do ergosterol foi realizada com base no método descrito na literatura (Seitz *et al.*, 1977; Heleno *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018), com modificações. As amostras, finamente moídas, foram extraídas com metanol P.A. na proporção 1:10 (amostra: solvente) durante 1 h a 24°C , agitadas vigorosamente em vórtex durante 10 s a cada 15 min, seguido de 5 min de banho de ultrassom (200 W, 40 kHz, 24°C , Ultronique, Brasil) e então, centrifugadas a 3220 *g* (Eppendorf 5840 R, Alemanha), durante 15 min, a 4°C e filtradas (filtros com tamanho de poro de 0,2 μm). O ergosterol extraído dos micélios e das amostras de farinhas foi identificado e quantificado em sistema HPLC (Shimadzu, Japão), com detector UV-Vis, coluna de fase reversa Inertsil ODS-3 (GL Science, Japão, 250 x 4.6 mm e tamanho de partícula de 5 μm). Foram injetados volumes de 20 μL de amostra, no sistema operando a 35°C , com fase móvel acetonitrila/metanol (70:30, v/v), com fluxo de 1 mL/min e detecção em 282 nm (Barreira *et al.*, 2014). A identificação do ergosterol foi baseada na comparação dos tempos de retenção do padrão (Sigma-Aldrich E6510, pureza $\geq 75\%$) e das amostras e a quantificação foi realizada

por comparação das áreas dos picos das amostras com as áreas da curva padrão externa (0,004 – 1 mg/mL). Os dados obtidos para a produção de ergosterol em meio submerso foram utilizados para determinar o fator de correlação entre biomassa e produção de ergosterol.

3.6.2 Determinação da composição centesimal

A composição centesimal foi determinada de acordo com os métodos analíticos oficiais da Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

3.6.2.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico em estufa (Medclave, Brasil) a 105° C em que 1 g de amostra foi seco até massa constante (método nº 935.29), sendo a umidade determinada pela Equação 1 (AOAC, 2016).

$$\% \text{ Umidade} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que: m_i é a massa da inicial amostra (g) antes da secagem; m_f é a massa final da amostra (g) após atingir massa constante.

3.6.2.2 Cinzas

O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado por incineração da amostra (2 a 5 g) em mufla a 550° C por 6 horas (método nº 923.03). Após resfriamento completo em dessecador, a

massa da amostra foi aferida em balança analítica. O conteúdo de cinzas é calculado pela Equação 2 (AOAC, 2016).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massa das cinzas (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (2)$$

3.6.2.3 Nitrogênio total (teor de proteínas)

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl, de acordo com a AOAC (2016), método nº 920.87, no qual 1,0 g da amostra foram colocados em frasco Kjeldahl de 500 mL, adicionados de 8 g de mistura catalítica (dez partes de sulfato de sódio anidro e uma parte de sulfato de cobre penta-hidratado) e de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. A amostra foi digerida a 400° C. Após digestão, 100 mL de água destilada foram adicionados no frasco para auxiliar no resfriamento da amostra. A etapa seguinte consistiu na destilação da amostra, que foi procedida em destilador de nitrogênio após a adição de 45 mL de solução de hidróxido de sódio a 50 % (m/v). Foram recolhidos, aproximadamente, 100 mL do destilado em Erlenmeyer contendo 50 mL de solução de ácido bórico a 4% (m/v) e 5-7 gotas de indicador misto. Por fim, foi realizada a titulação com ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ até a viragem do indicador verde para rosa. Em paralelo, foi processada a prova em branco para testar a qualidade dos reagentes. O percentual de proteínas foi determinado pela Equação 3.

$$\% \text{ proteína} = \frac{100 \times 0,014 \times 5,70 \times (V_a - V_b) \times f \times M}{P} \quad (3)$$

Em que: P = massa da amostra (g); Va = volume de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ gasto na titulação da amostra; Vb = volume de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ gasto na titulação da prova em branco; f = fator de correção da solução de ácido clorídrico; M = molaridade da solução do

ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹; 5,70: fator de conversão do nitrogênio em proteína para amostras a base de cereais, como farinhas.

3.6.2.4 Gorduras totais

O teor de gorduras totais foi determinado no extrator de Soxhlet, com base no método nº 920.85 proposto pela AOAC (2016), no qual 5 a 10 g de amostra previamente trituradas, homogeneizadas e secas em estufa a 105° C, foram colocadas num cartucho para extração em Soxhlet. Volume de 100 mL de solvente (*n*-hexano) foram colocados no frasco extrator. As gorduras da amostra foram extraídas, por aquecimento em refluxo, durante 6 horas. Após o solvente foi removido e o frasco extrator seco em estufa a 105° C, até massa constante. O conteúdo de gorduras totais (%) foi determinado pela Equação 4.

$$\% \text{ gorduras totais} = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (4)$$

Sendo: N = gramas de gordura (obtido por diferença de massa) do frasco extrator; P = massa inicial de amostra (g).

3.6.2.5 Fibra alimentar total

A fibra alimentar foi determinada pelo método gravimétrico-enzimático, nº 991.43, proposto pela AOAC (2016). Foram tomadas 2 alíquotas de amostra seca, moída e homogeneizada, na quantidade de 1 g cada e colocadas em Becker de 400 mL, separadamente. A amostra foi dispersa em 50 mL de solução tampão fosfato de sódio (pH 6) e adicionada de 50 µL de α-amilase termoestável. O Becker, coberto com papel alumínio, foi aquecido em

banho-maria a 95° C, com agitação, e incubado durante 30 min. Em seguida, o banho foi resfriado a 60° C, pH da amostra ajustado a 7,5 e adicionada de 100 µL de protease, sendo mantida sob agitação durante 30 min. Após, o pH da amostra foi ajustado a 4,3 e adicionado 100 µL de amiloglicosidase, sendo mantido em banho-maria a 60° C por 30 minutos, com agitação. Ao fim do processo de hidrólise, foram adicionados em cada amostra 225 mL de etanol a 95% pré-aquecido a 60° C, cobertos com papel alumínio e mantidos em repouso, a 24° C, durante 1 h. Na etapa seguinte, a solução alcoólica contendo o resíduo da hidrólise foi filtrada, quantitativamente, através de um cadinho sinterizado contendo uma camada de celite, previamente preparado e pesado. O resíduo foi lavado com duas porções de 15 mL de etanol a 95% e duas porções de acetona. Então, os cadinhos foram secos em estufa a 105° C, por 12 h. Após a pesagem, foi determinado o teor de cinzas de um dos cadinhos, e do outro, proteínas. Em paralelo foi procedida uma análise do branco, sem amostras. O teor de fibra alimentar total (%) foi determinado pela Equação 5:

$$\% \text{ Fibra alimentar} = \frac{\frac{(R1+R2)}{2} - P - C - B}{\frac{(M1+M2)}{2}} \times 100 \quad (5)$$

Em que: R1 e R2 = massa do resíduo (mg) para amostra em duplicata; P e C = massa de proteína e cinzas (mg), respectivamente; M1 e M2 = massa das amostras (mg); B = massa do branco (mg): $[(BR1-BR2)/2] - PB - CB$, sendo: BR1 e BR2 = massa dos resíduos (mg) da determinação do branco, em duplicata; PB e CB = massa (mg) de proteína e cinzas, respectivamente, determinados no primeiro e segundo resíduos do branco.

3.6.2.6 Carboidratos

Os carboidratos foram determinados por diferença, pela equação 6:

$$\% \text{ Carboídratos} = 100 - (\% \text{ U} + \% \text{ C} + \% \text{ G} + \% \text{ P} + \% \text{ F}) \quad (6)$$

Sendo: U = umidade; C = cinzas; G = gordura; P = proteína; F = fibra alimentar total.

3.6.3 Determinação da composição de aminoácidos

A avaliação da composição de aminoácidos foi realizada no Laboratório de Métodos, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com base em estudos anteriores (Camargo *et al.*, 2018; Siri *et al.*, 2006). Após hidrólise ácida das amostras com solução de ácido clorídrico (6 mol/L) a 110° C por 24 h e derivatização com NAD (Naphthalene -2,3-dicarboxaldehyde) em pH 9, os aminoácidos foram identificados e quantificados em HPLC Biotech modelo 525 (Hallertau, Germany), com sistema de detecção constituído por um detector LIF do sistema de eletroforese capilar modelo PNA8C (Rodrigues *et al.*, 2018). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Supercosil LC-18-DB (Supelco Analytical, Bellefonte, USA, 250 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula 5 µm), ajustada a 40° C, com fluxo de 1,0 mL/min e as fases móveis foram água acidificada com ácido trifluoracético (TFA), pH 2 (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O gradiente foi programado conforme o seguinte: 0-12 min, 30 % B; 12 – 14 min, 30-35 % B; 14-40 min, 35 – 80 % B; 40-41 min, 80-30 % B. Os resultados foram expressos em mg de aminoácidos por g de amostra de farinha seca.

3.6.4 Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*

3.6.4.1 Obtenção dos extratos

Para determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante foi preparado um extrato hidro alcoólico das amostras, com base no método proposto por Handa *et al.* (2016). A extração foi realizada a partir de 0,6 g de cada amostra com 6 mL de solução etanol: água (80: 20 v/v). Procedeu-se a agitação vigorosa em vórtex (Vortex Mixer, 2500 rpm, Brasil) durante 10 s, a cada 15 min por 1 h, a 25° C. Após, foram sonificadas (Cuba de Ultrassom Cristofoli, 42 Hz, Brasil) por 5 min a 25° C, centrifugadas (1800 g, 25° C, 20 min; centrífuga marca Centribio modelo 80-2B-15, Brasil), filtradas com papel filtro Whatmann nº 1 e mantidas ao abrigo da luz.

3.6.4.2 Determinação do conteúdo fenólico

O método colorimétrico Folin-Ciocalteu foi utilizado para mensurar o conteúdo fenólico livres dos extratos (Singleton and Rossi Jr., 1965). Para isso, 0,5 mL do extrato foi misturado com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica) e 0,5 mL de carbonato de cálcio 7,5% (m/v). Após 30 min de reação, a 25° C, ao abrigo da luz, foi procedida a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-vis (Q898U2M5/Quimis®, Brasil) a 765 nm. O conteúdo de fenólicos foi expresso em mg de ácido gálico equivalente (EAG/g), usando uma curva de calibração de ácido gálico (0,004 – 0,04 mg/mL).

3.6.4.3 Atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH•

Este método tem por base a redução do radical DPPH•, que ao fixar um H• leva a uma diminuição da absorbância. Para avaliar a capacidade de reduzir o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 200 µL dos extratos foram adicionados a 800 µL de tampão acetato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,0) e em seguida, 1000 µL da solução de DPPH (250 µmol/L em etanol).

Em paralelo, foi processada uma análise padrão em que no lugar do extrato da amostra foi acrescentado solvente de extração. Após 20 minutos ao abrigo da luz, foi realizada a leitura do produto da reação em espectrofotômetro UV-vis (Q898U2M5/Quimis®, Brasil) a 517 nm (Yamaguchi *et al.*, 1998). Os resultados foram expressos em micromols equivalentes de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (TEAC/g), utilizando uma curva de calibração de Trolox (0,0 – 0,5 µmol/mL) ou em % de captura do radical DPPH•, conforme Equação 7:

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(\text{Abs padrão} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs padrão}} \times 100 \quad (7)$$

Em que: *Abs padrão* é a absorbância do padrão a 517 nm; *Abs amostra* é a absorbância da amostra a 517 nm.

3.6.4.4 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{·+}

A medida da atividade antioxidante deste método dá-se pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado por reação química, eletroquímica ou enzimática. Segundo método adaptado de Re *et al.* (1999), o radical ABTS^{·+} foi obtido pela mistura de 5 mL da solução ABTS (7 mmol/L) com 88 µL da solução persulfato de sódio (140 mmol/L), mantido no escuro, a 25° C, por 16 h antes do uso. Para o ensaio, 30 µL de extrato fenólico foi adicionado de 3 mL de ABTS^{·+} (diluída em etanol absoluto até absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm). Em paralelo, foi processada uma determinação padrão em que no lugar do extrato da amostra foi acrescentado solvente de extração. A leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-vis Microprocessado (Q898U2M5/Quimis®, Brasil), a 734 nm, foi realizada após 6 min de reação, no escuro, a 25° C. Os resultados foram expressos

em micromols equivalentes de Trolox (TEAC/g), utilizando uma curva de calibração de Trolox (0,0 – 3,0 µmol/mL) ou em % de captura do radical ABTS•, conforme Equação 8:

$$\% \text{ ABTS} = \frac{(\text{Abs padrão} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs padrão}} \times 100 \quad (8)$$

em que: *Abs padrão* é a absorbância do padrão a 734 nm; *Abs amostra* é a absorbância da amostra a 734 nm.

3.6.5 Determinação de ergotioneína

A ergotioneína foi extraída de 0,5 g de amostra que foi adicionada de 7 mL de solução etanólica (10 mmol/L de ditiotreitol (DTT) em etanol 70%, 100 µmol/L betaína em etanol, 100 µMol/L de 2-Mercapto-1-metilimidazol (MMI) em etanol 70%) e 3 mL de água deionizada, agitada em vórtex por 10 s. Após, foram adicionados 2 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (m/v) em etanol e novamente agitada por 10 s, seguida de centrifugação (Eppendorf 5840 R, Alemanha) a 3220 g, 4° C, por 20 min. O sobrenadante (2 mL) foi lyophilizado e resuspensos em 2 mL de água deionizada (pH 7,3), centrifugado por 1 min a 8900 g, filtrado em membrana de 0,22 µm (Dubost *et al.*, 2006). Para identificação e quantificação da ergotioneína, volume de 20 µL do filtrado foram injetados no HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), acoplado a um detector UV-Vis, coluna de separação C 18 (Discovery®; 150 × 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm). O pH da fase móvel (solução de 0,7% de fosfato de sódio dibásico (m/v), 3% de acetonitrila (v/v) e 0,1% de trietilamina (v/v)) foi ajustado a pH 7,3, fluxo de 0,4 mL/min, 30° C e detecção em 254 nm. A determinação da ergotioneína foi baseada na comparação das áreas dos picos das amostras com as áreas da curva padrão externa (Sigma-Aldrich E7521; 0,006 - 0,1 µg/mL) (Gambato *et al.*, 2018).

3.6.6 Determinação de lovastatina

Para a quantificação de lovastatina, as amostras foram extraídas com metanol (Sorrentino *et al.*, 2010). Em resumo, 0,6 g de amostra e 6 mL de metanol foram agitadas por 2 h, centrifugadas (Eppendorf 5840 R, Alemanha) a 3220 g, 4° C por 20 min, filtradas em filtro de poro tamanho 0,22 µm e mantidas a - 20° C até análise em HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), acoplado a um detector UV-Vis, com coluna C 18 (Discovery®; 150 × 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila/água (70:30 v/v), 0,5% ácido acético, fluxo de 0,4 mL por min, a 30° C (Shen *et al.*, 1996). A identificação da lovastatina foi realizada a 254 nm, e quantificação comparando-se as áreas dos picos das amostras com as áreas da curva padrão externa (Sigma-Aldrich PHR1285; 0,001 - 0,015 µg/mL).

3.6.7 Inibição de enzimas do trato digestório

Foram realizados ensaios *in vitro* de inibição da atividade das enzimas lipase pancreática, α-glicosidase e α-amilase pelos extratos fenólicos obtidos das amostras de farinhas.

3.6.7.1 Inibição de lipase pancreática

Inibição da lipase foi avaliada por método colorimétrico usando 1-2-o-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico(6-metilresorufina)-ester (DGGR) como substrato (Wilcox *et al.*, 2014). Em resumo, 140 µL de solução de enzima lipase pancreática suína tipo II (Sigma; 0,2 mg/mL) em tampão Tris-HCl (0,05 M; pH 8,0) juntamente com 100 µL de extrato foram pré-incubadas a 37° C por 5 min. Após, foram adicionados 80 µL da solução de DGGR (Labtest; 270 µmol/L). Então, foi lida a absorbância, em espectrofotômetro UV-vis (Spectra Max

190/Molecular Devices, USA) a 570 nm, aos 90 e 180 s de reação. Dois controles foram utilizados nesta determinação, um controle de inibição (100% de inibição) com Orlistat (0.025 mg/mL) no lugar na amostra e um controle da enzima (0% de inibição) com água destilada no lugar da amostra. A diferença de absorbância (ΔA) entre as leituras nos dois tempos ($A_{180} - A_{90}$) foi utilizada na determinação, conforme Equação 9:

$$\text{Inibição lipase(\%)} = \frac{(\Delta_{\text{Ace}} - \Delta_{\text{Aa}})}{\Delta_{\text{Ace}}} \times 100 \quad (9)$$

Em que Δ_{Ace} é a diferença da absorbância do controle da enzima a 517 nm e Δ_{Aa} é a diferença da absorbância da amostra a 517 nm.

3.6.7.2 Inibição de α -glicosidase

A habilidade de inibição da α -glicosidase foi avaliada usando p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo como substrato (de Camargo *et al.*, 2016). Primeiramente, foram preparadas soluções de α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma; 0,1 mg/mL) e de substrato p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (Sigma; 0,1 mol/L) em tampão fosfato de potássio (0,1 mol/L; pH 6,8). Para reação, foram pré-incubados 185 μ L de extrato e 15 μ L da solução enzimática a 37° C por 5 min. Então, 800 μ L da solução de substrato foram adicionados e a reação realizada a 37° C por 10 min e terminada com a adição de 1 mL de carbonato de cálcio (1 mol/L). Em seguida, leitura da absorbância a 400 nm, em espectrofotômetro UV-vis (Spectra Max 190/Molecular Devices, USA). Paralelamente, foram realizadas as determinações do branco das amostras, sem a adição de enzima que foi substituída por solução tampão, e do controle da enzima, sem extratos. Para fins de comparação, como controle positivo de inibição, foi utilizada

acarbose (1 mg/mL). A inibição da atividade de α -glicosidase foi determinada pela Equação 10:

$$\text{inibição } \alpha - \text{glicosidase (\%)} = \frac{(Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra})}{Abs \text{ controle}} \times 100 \quad (10)$$

Em que: *Abs controle* é a absorbância do controle da enzima a 400 nm; *Abs amostra* é a absorbância da amostra a 400 nm.

3.6.7.3 Inibição de α -amilase

Foi avaliada pelo método Caraway modificado (Yang *et al.*, 2012; Zengin *et al.*, 2014). Primeiramente, 25 μL de amostra e 25 μL enzima α -amilase de pâncreas suíno tipo VI-B (Sigma; 1 mg/mL) em tampão fosfato de sódio (0,05 mol/L; pH 7,0) foram pré-incubados a 37° C por 10 min. Após, 25 μL de solução de amido (0,4 g/L) foram adicionados e incubados a 37° C por 10 min. Por fim, adicionou-se 25 μL de solução contendo iodato de potássio 16,7 mmol/L, iodeto de potássio 271 mmol/L e ácido clorídrico 112 mmol/L e 200 μL de água destilada. As amostras foram lidas a 660 nm, em espectrofotômetro UV-vis (Spectra Max 190/Molecular Devices, USA). Paralelamente, processou-se o controle negativo, com água destilada no local da amostra e um branco substituindo a enzima por água destilada. Como controle positivo de inibição foi utilizada acarbose (1 mg/mL). A inibição foi obtida pela equação 11:

$$\text{Inibição } \alpha - \text{amilase (\%)} = \left[1 - \frac{(Abs_a - Abs_b)}{(Abs_{c+} - Abs_{c-})} \right] \times 100 \quad (11)$$

Em que Abs_a , Abs_b , Abs_{c+} , Abs_{c-} são definidos como a absorbância da amostra (com enzima), a absorbância do branco da amostra (amostra sem enzima), absorbância de 100% de

atividade da enzima (somente enzima, sem inibidores), absorbância de 0% de atividade enzimática (somente substrato sem enzima).

3.6.8 Características físicas e físico-químicas

3.6.8.1 pH

Amostras das farinhas foram avaliadas quanto ao pH antes e após o CES, em potenciômetro, no qual 1 g de amostra foi misturada com 10 mL água deionizada e procedida a leitura do pH (Canedo *et al.*, 2016).

3.6.8.2 Atividade de água (Aw)

A atividade de água de amostras das farinhas e dos biscoitos foi determinada a 25° C, em equipamento LabMaster-AW (Novasina, Suíça). Amostras moídas e homogeneizadas foram colocadas em porta amostra e inseridas no equipamento para leitura da Aw.

3.6.8.3 Cor

A cor de amostras das farinhas e dos biscoitos foi avaliada instrumentalmente em colorímetro digital com esfera difusa d/0° (Delta Color, modelo Delta Vista, Brasil) com a leitura dos parâmetros cromáticos CIE (L^* a^* b^*). Em que o parâmetro L^* corresponde à luminosidade, variando de 0 (amostra escura) a 100 (amostra clara), o parâmetro a^* está relacionado à dimensão de cores verde (valores negativos) e vermelho (valores positivos), e o parâmetro cromático b^* está relacionado às cores azul (valores negativos) e amarelo (valores

positivos). Os resultados foram expressos com o parâmetro de avaliação da Diferença Total de Cores (TDC^{*}) das amostras antes e após o cultivo com os micélios, determinado pela equação 12 (Xiao *et al.*, 2016).

$$TCD = [(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)]^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

em que ΔL é a diferença no valor do parâmetro L^* , Δa é a diferença no valor do parâmetro a^* , Δb é a diferença no valor do parâmetro b^* .

3.6.8.4 Determinação de Textura

Um analisador de textura TAXT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), equipado com software Exponent versão 6.1.11.0, foi empregado na avaliação da textura do alimento desenvolvido com incorporação das farinhas miceliadas. Os ensaios realizados foram de acordo com as particularidades do alimento a ser analisado.

Para avaliação da textura dos cookies preparados com incorporação de micoproteína, após 24 horas do forneamento, os biscoitos foram avaliados quanto à dureza (“hardness”), sendo registrada a força máxima (N) necessária para cortar o biscoito, nas seguintes condições de teste: probe “blade set with knife”, célula de carga 5 N, velocidades pré-teste 1,5 mm.s⁻¹, do teste 1,0 mm.s⁻¹, velocidade pós-teste 5,0 mm.s⁻¹, distância inicial da faca 20 mm. Foram avaliadas cinco 5 amostras de cada formulação.

3.6.9 Propriedades tecnológicas das farinhas

3.6.9.1 Índice de absorção de água (IAA) e Indice de solubilidade em água (ISA)

Foram determinada com base na método descrito por Anderson (1982), no qual 1,0 g de amostra moida foi colocada dentro de um tubo de falcon (massa do tubo previamente determinada em balança analítica) e adicionada de 10 mL de água destilada, a 24º C. Os tubos foram agitados a 150 rpm durante 30 min e após, centrifugados (Eppendorf 5840 R, Alemanha, 3320 g, 20º C, 10 min). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e vertido numa placa de Petri (200 mm diâmetro), previamente pesada, e seco em estufa a 105º C até massa constante. A massa de sólidos remanescentes da evaporação foi utilizada para determinar o índice de solubilidade em água (ISA). O massa do material hidratado que permeceu no tubo foi considerada na determinação do índice de absorção de água (IAA). Os valores de IAA e ISA foram determinados pelas equações 13 e 14, a seguir:

$$\text{IAA } (\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{massa da amostra hidratada (g)}}{\text{massa inicial da amostra (g)}} \quad (13)$$

$$\text{ISA } (\%) = \frac{\text{massa do resíduo da evaporação (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (14)$$

3.6.9.2 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi analisada de acordo com método proposto por Raghavendra *et al.* (2004). Dentro de um tubo de Falcon (50 mL), 1 g de amostra foi mantido em hidratação com 30 mL de água destilada, durante 18 h, a 24º C. O material foi

filtrado à vácuo através de um cadrinho de vidro, previamente tarado. A massa do material úmido contido no cadrinho foi aferida. Após 2 h de secagem em estufa a 105° C, o cadrinho foi novamente pesado. A capacidade de retenção de água (CRA) foi obtida pela equação 15 que segue:

$$\text{CRA } (g \cdot g^{-1}) = \frac{\text{massa da resíduo hidratada (g)} - \text{massa do resíduo seco (g)}}{\text{massa do resíduo seco (g)}} \quad (15)$$

3.6.9.3 Capacidade de absorção de óleo

Para avaliar a capacidade de absorção de óleo foi utilizada o método descrito por Lin & Humbert (1974), com modificações. Dentro de um tubo previamente tarado, foram dispostos 0,5 g de amostra e 6 mL de óleo de soja, mantidos por 30 minutos a 24° C, centrifugados (3220 g, 20° C, por 30 min). O óleo sobrenadante foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pipeta e os tubos inclinados (45°) durante 25 min para drenar o restante do óleo. Após os tubos foram pesados e calculada a capacidade de absorção de óleo pela equação 16:

$$\text{CAO } (\%) = \frac{\text{massa do óleo absorvida pela amostra (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (16)$$

3.6.10 Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram avaliados em análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p<0,05$), com auxílio do software Origin versão 8.1 (OriginLab).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na forma de capítulos redigidos na forma de artigos científicos, os quais serão submetidos a periódicos internacionais.

O primeiro capítulo está intitulado como “**Chemical features and bioactivity of grain flours colonized by macrofungi as a strategy for nutritional enrichment**”. Foi objetivo deste manuscrito obter e avaliar farinhas de grãos colonizados por *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* ou *P. albidus* quanto ao enriquecimento proteico e à atividade biológica (tais como, atividades antioxidante anti-hiperglicêmica e capacidade de inibição da enzima lipase pancreática). Adicionalmente, características físicas e físico-químicas das farinhas obtidas foram analisadas.

O segundo intitula-se “**Production of edible fungi mycoprotein on agroindustry wastes: influence on nutritional, chemical and biological properties**”. O objetivo do manuscrito foi obter e caracterizar as farinhas de bagaços com micoproteína dos macrofungos comestíveis (*P. albidus*, *A. fuscosuccinea* ou *A. blazei*) quanto a sua composição nutricional, compostos bioativos (ergosterol, lovastatina e ergotioneína), atividade biológica (antioxidante e inibição de enzimas do metabolismo *in vitro*) além de propriedades físicas e físico-químicas.

O título do terceiro artigo é “**Physicochemical properties and biological activity of novel cookies produced with brewer spent grain flour colonized by Pleurotus albidus mycelia**”, que teve objetivo avaliar o efeito da farinha de bagaço de malte colonizada pelo micélio de *P. albidus* nas atividades antioxidantes e de inibição da enzima α-glicosidase de biscoitos tipo cookies, bem como os efeitos sobre os conteúdos de proteína, de fibra alimentar total, características de coloração e textura dos biscoitos também foram investigados.

4.1 Capítulo 1



Chemical features and bioactivity of grain flours colonized by macrofungi as a strategy for nutritional enrichment



Fernanda Stoffel^{a,b,*}, Weslei De Oliveira Santana^a, Roselei Claudete Fontana^a, Jean Guilherme Novello Gregolon^c, Tarso B. Ledur Kist^c, Felix Gonçalves De Siqueira^d, Simone Mendonça^d, Marli Camassola^a

^a Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS 95070-560, Brazil

^b Area of Production, Science and Food Technology, Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), São Miguel do Oeste, SC 89900-000, Brazil

^c Laboratory of Methods, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

^d Embrapa Agroenergia, Brasília, DF 70297-400, Brazil

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Ergosterol (PubChem CID: 444679)
 Gallic acid (PubChem CID: 370)
 DPPH radical (PubChem CID: 2735032)
 Trolox (PubChem CID: 40634)
 Ergothioneine (PubChem CID: 5352619)
 Lovastatin (PubChem CID: 53232)

Keywords:

Mycoprotein
 Antioxidant activity
 Enzymatic inhibition

ABSTRACT

Agaricus blazei, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus* mycelia were obtained in solid-state cultivation (SSC), using grains (brown rice, canjica corn and wheat) as raw material. Colonized grain flours were analysed for their nutritional, physical and physico-chemical characteristics and biological activity *in vitro*. Wheat flour with *P. albidus* showed higher values for protein (18.34 g/100 g), ergosterol (0.60 mg/g), mycelial biomass (183 mg/g) and total amino acids (58.34 mg/g). Corn flour with *A. fuscosuccinea* showed the highest total phenolic content (2.38 mg GAE/g), antioxidant activity in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (8.90 µmol TEAC/g) and 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (16.52 µmol TEAC/g) assay. Wheat flour with *P. albidus* were more effective at inhibiting of pancreatic lipase (74.5%) and of α-glucosidase (98.2%). In conclusion, grains colonized by macrofungi mycelia through SSC can enrich the nutritional value and the biological activity of the flours, which presents a potential for functional foods.

Chemical features and bioactivity of grain flours colonized by macrofungi as a strategy for nutritional enrichment

Fernanda STOFFEL^{1,2,*}, Weslei DE OLIVEIRA SANTANA¹, Roselei CLAUDETE FONTANA¹,
Jean Guilherme NOVELLO GREGOLON³, Tarso B. LEDUR KIST³, Felix GONÇALVES DE
SIQUEIRA⁴, Simone MENDONÇA⁴, Marli CAMASSOLA¹

1 Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil.

2 Area of Production, Science and Food Technology, Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), São Miguel do Oeste, SC, 89900-000, Brazil.

3 Laboratory of Methods, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

4 Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, 70297-400, Brazil.

***Corresponding author:**

Mailing address: Rua 22 de abril, s/n, bairro São Luiz, São Miguel do Oeste/SC, Brazil, CEP 89900-000

E-mail address: fernanda.stoffel@ifsc.edu.br

Phone/Fax: +55 49 3631-0400

Declaration of interest: None.

28 **Abstract**

29 *Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus* mycelia were obtained in solid-state
30 cultivation (SSC), using grains (brown rice, canjica corn and wheat) as raw material. Colonized grain
31 flours were analysed for their nutritional, physical and physico-chemical characteristics and biological
32 activity *in vitro*. Wheat flour with *P. albidus* showed higher values for protein (18.34 g/100 g), ergosterol
33 (0.60 mg/g), mycelial biomass (183 mg/g) and total amino acids (58.34 mg/g). Corn flour with *A.*
34 *fuscosuccinea* showed the highest total phenolic content (2.38 mg GAE/g), antioxidant activity in the 1,1-
35 Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (8.90 µmol TEAC/g) and 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-
36 sulfonic acid) (ABTS) (16.52 µmol TEAC/g) assay. Wheat flour with *P. albidus* were more effective at
37 inhibiting of pancreatic lipase (74.5 %) and of α-glucosidase (98.2 %). In conclusion, grains colonized by
38 macrofungi mycelia through SSC can enrich the nutritional value and the biological activity of the flours,
39 which presents a potential for functional foods.

40

41 **Keywords:** mycoprotein; antioxidant activity; enzymatic inhibition.

42

43 **Chemical compound studied in this article**

44 Ergosterol (PubChem CID: 444679); Gallic acid (PubChem CID: 370); DPPH radical (PubChem CID:
45 2735032); Trolox (PubChem CID: 40634); Ergothioneine (PubChem CID: 5352619); Lovastatin
46 (PubChem CID: 53232).

47

48 **1. Introduction**

49 Widely used in food, cereal grains are an important nutritional source, mainly supplying energy (Đorđević
50 et al., 2010). Grain consumption has already been shown to be beneficial to human health, particularly
51 when in whole form, due to the dietary fibre content, as well as the presence of phytochemicals, including
52 phenolic acids, flavonoids, vitamins and minerals, among others (Wang et al., 2014).

53 Macrofungi are fungi that can form fruiting bodies (basidiome), also known as mushrooms (edible or not).

54 Edible mushrooms have attracted the attention of the food industry for their use in the development of

55 functional foods. Mushrooms sometimes have secondary compounds that for many years have been

56 associated with health promotion (Gambato et al., 2016; Zhai, Wang, & Han, 2015). However, the

57 consumption of edible mushrooms may be limited due to their high cost, which is a consequence of the

58 time required for cultivation. Alternatively, using macrofungi in the form of mycelium produces a product

59 faster. Recent studies have demonstrated that mycelia, as well as the cultivation media used for their

60 microbial growth, can represent a source of bioactive compounds, such as phenolic acids and ergosterol,

61 both with antioxidant activity (Souilem et al., 2017). In addition, the combination of raw plant materials

62 and mycelial biomass from mushrooms is considered an alternative protein source, in this case a microbial

63 protein. Mycoproteins, single cell protein (SCP) or direct-fed microbials are terms that have been

64 expressed in human and animal nutrition as being proteins derived from fungi (yeast or filamentous)

65 processes in plant biomass. The consumption of such mycoprotein usually occurs through flour that can

66 be used in the formulations of food or animal feed (Anupama and Ravindra, 2000).

67 Cereal grains can be used as raw material for the production of macrofungi mycelium by solid-state

68 cultivation (SSC) (Kang, Zhai, Li, Cao, & Han, 2017; Zhai, Wang, & Han, 2015). This bioprocess has

69 advantages, such as the availability of bioactive compounds in the cereals, reduction of antinutritional

70 factors and an increase in the digestibility of the structural components of grain, in addition to the bioactive

71 microbial compounds, which increases the nutritional value of the foods (Đorđević et al., 2010). The

72 colonization of food by various fungi has been investigated as a tool for inhibiting the activity of some

73 enzymes that are important in metabolism, such as pancreatic lipase (Dwivedi et al., 2015) and α -

74 glucosidase (Zengin et al., 2016). The suppression of the activity of these enzymes is one of the

75 mechanisms of prevention and/or treatment of diseases such as obesity and diabetes (Dwivedi et al., 2015;

76 Zengin et al., 2016). Other advantages of this microbial bioprocess are in the exploration of mycelia flour,

77 which is rich in proteins and polysaccharides (fibres) from the mycelial biomass of macrofungi that can

78 be exploited for food technology. Such flours can be used in food formulation, providing products with

desirable characteristics of colour, flavour, emulsion stabilization, texture enhancement and water-holding capacity, among others (Kurt and Gençcelep, 2018). We hypothesize that the SSC of grains with edible macrofungi mycelia increases the availability of nutrients and the biological activity of the flours obtained from these colonized grains.

With proven bioactivity, edible macrofungi have been studied as functional foods (Castro-Alves et al., 2017). Among the native species in Brazil is *Agaricus blazei* Murrill, popularly known as the Sun Mushroom, which is consumed in several countries due to its potential health benefits (Zhai, Wang, & Han, 2015). There are reports that the polysaccharides (beta-glucans) in this mushroom have positive effects in disease prevention, due to its immunomodulatory and anticancer actions. Although the conventional form of *A. blazei* consumption is their basidiome, studies indicate that the nutritional and/or bioactive constituents found in the mycelium may be similar, or even larger, than those present in the basidiome (Zhai and Han, 2016).

The genus *Pleurotus* is among the most cultivated mushroom for human consumption in the world. Known as the oyster mushroom, it is much appreciated for its gastronomic, nutritional and medicinal characteristics (Lechner & Albertó, 2011). *Pleurotus albidus*, found in South and Central America, is one species of this genus recently isolated and identified in Brazil, on which the studies are scarce and fragmented (Menolli et al., 2014). However, it has potential to be used as an ingredient in functional foods or nutraceuticals, since several compounds with biological activity have already been extracted from this species, such as glucans with immunomodulatory effects (Castro-Alves et al., 2017), as well as phenolic compounds and ergothioneine with antioxidant activity and a capacity to minimize the oxidative damage induced by hyperglycaemia in endothelial cells (Gambato et al., 2018).

Basidiomes of the *Auricularia* genus, known as the ear mushroom, have been used for hundreds of years in traditional Chinese medicine for food and medicinal purposes (Souilem et al., 2017). *A. fuscosuccinea* is one of the species of this genus found in Brazil (Alvarenga et al., 2015).

To test the above-mentioned hypothesis, this study aimed to obtain and evaluate grain flours colonized by *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* or *P. albidus* in protein enrichment and in biological activity (i.e., antioxidant,

105 anti-obesity and anti-hyperglycaemic activity). Additionally, physical and physico-chemical
106 characteristics were also evaluated.

107

108 **2. Material and methods**

109

110 **2.1 Microorganisms**

111 Three macrofungi were used: *Agaricus blazei* Murrill (syn. *Agaricus brasiliensis* Wasser) from the
112 company Brasmicel Biotecnologia (Suzano, São Paulo, Brazil); *Pleurotus albidus* 88F.13 (MIUCS 1586)
113 e *Auricularia fuscosuccinea* 78F.3 (MIUCS 1577), collected from the Pampa and Mata Atlântica biomes
114 in São Francisco de Paula city (Rio Grande do Sul, Brazil) under special authorization from the Brazilian
115 Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), with access and sending of
116 genetic heritage component samples registered as part of process 02001.007656/2012-11. The isolates
117 were identified through molecular analyses, as described in the study (Cantelle et al., 2017). These belong
118 to the collection of microorganisms from the Laboratory of Enzymes and Biomass, Institute of
119 Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil) and were
120 deposited in the mycological section of the UCS Herbarium. Mycelia were maintained in potato dextrose
121 agar (PDA) medium (Merck, Germany). The inoculum for SSC was obtained by transferring 1 cm² of
122 mycelium to Petri dishes (200 mm diameter) containing 20 mL of sterile PDA medium in a vertical
123 laminar flow cabinet (Filterflux, Brazil), and then incubating at 28 ± 1°C for 15 to 20 days, until complete
124 colonization of the medium.

125

126 **2.2 Solid-state cultivation (SSC)**

127 Cultivation were carried out with three types of grain: brown parboiled rice (*Oryza sativa* L.), yellow
128 canjica corn (*Zea mays*) and wheat (*Triticum durum*), which were purchased in local markets (Caxias do
129 Sul, Rio Grande do Sul, Brazil) and tested to obtain colonized grain flours by cultivation of the macrofungi

130 mycelia of *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* or *P. albidus* through SSC. The cultivation medium was constituted
131 only of hydrated grains in water (1:1 ratio) and cooked in an autoclave at 1 atm for 1 h.
132 After 24 h, portions (200 g) of each grain (moisture of approximately 60 g/100 g) were distributed in glass
133 flasks, separately. The flasks were sealed and autoclaved at 1 atm for 2 h. After cooled, the flasks with
134 the sterile grains were inoculated in a vertical laminar flow cabinet (Filterflux, Brazil), with the contents
135 of half of the Petri dish (20 mm diameter) containing PDA with mycelium. Each type of grain was
136 inoculated with each microorganism, separately. Samples of grains without inoculum were kept under the
137 same cultivation conditions as controls. The flasks were covered with a layer of gauze and sterile cotton,
138 then incubated at $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The media colonization was monitored daily by visual inspection. Sampling
139 (collection of flasks) was performed three times: for *P. albidus*, samples were collected at 15, 21 and 28
140 days; *A. fuscosuccinea* at 21, 28 and 35 days; and *A. blazei* at 28, 35 and 42 days. For each treatment,
141 three replicates were prepared.

142

143 **2.3 Colonized grain flours**

144 Colonized grain flours were obtained from the total contents of the flasks; that is, the grains with
145 macrofungi mycelia. Based on the methodology of Zhai et al. (2015), the collected material was
146 homogenized and dried in an oven (Medclave, Brazil) at 60°C until at a constant mass. Then, the material
147 was ground in a Willey-type knife mill (Solab, Brazil) to obtain the colonized grain flours (standardized
148 in 40 mesh, particle size <0.42 mm). Non-inoculated samples of grains were submitted to the same
149 procedures and referred to as control flours. The flour was stored in polyethylene packages, away from
150 humidity and light, until the analysis.

151

152 **2.4 Mycelial biomass**

153 Mycelial biomass of the flour samples was estimated by extraction and quantification of ergosterol, using
154 a method described by Héleno et al. (2016), with modifications. First, the biomass of *A. blazei*, *A.*
155 *fuscosuccinea* and *P. albidus* were obtained by submerged cultivation. For *A. blazei* the medium was

156 composed of wheat extract, peptone and maltose, according to Zhai & Han (2016). The biomass of *A.*
157 *fuscosuccinea* and *P. albidus* were produced in medium consisting of potato broth, as described by Cantele
158 et al. (2017). The cultivation was conducted in Erlenmeyer flasks (500 mL), containing 100 mL of the
159 sterile cultivation medium and inoculated with 3 mycelial discs (1.5 cm in diameter), which were then
160 covered with a thin layer of cotton and gauze and incubated at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ with agitation (180 rpm) for 7
161 days. The contents of the flasks were collected every 24 h, starting on the 2nd day. The mycelial biomass
162 was separated by centrifugation (3220 g, 20 min, 4°C) and lyophilized for subsequent extraction and
163 quantification of ergosterol.

164 The extraction of ergosterol was carried out based on methodologies described in the literature (Heleno
165 et al., 2016), with modifications. The previously ground (40 mesh) samples, were extracted with methanol
166 at a ratio of 1:10 (sample:solvent) for 1 h at 24°C, then were vortexed vigorously for 10 s every 15 min
167 for 1 h, followed by 5 min of ultrasound (200 W, 40 kHz, Ultronique, Brazil). Samples were centrifuged
168 at 3220 g for 15 min at 4°C and filtered through 0.2 µm nylon filters.

169 The ergosterol extracted from the mycelial biomasses and the flour samples (colonized and controls) was
170 identified and quantified in an high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu,
171 Quioto, Japan) with UV-Vis detector and reverse phase column Inertsil ODS-3 (GL Science, Tokyo,
172 Japan, 250 x 4.6 mm and particle size 5 µm). Volumes of 20 µL of sample were injected into the system
173 at 35°C with mobile phase acetonitrile/ methanol (70:30, v/v), with a flow rate of 1 mL/min and detection
174 at 282 nm (Barreira et al., 2014). The identification of ergosterol (Sigma, Cod. 45480) was based on
175 comparing the peaks of the sample areas with the peaks of the areas of standard solutions with known
176 concentrations (0.0039–1 mg/mL). The data obtained for the production of ergosterol in submerged
177 medium were used to determine the correlation factor between biomass and ergosterol production (Dalla-
178 Santa et al., 2012).

179

180 **2.5 Evaluation of nutritional composition**

181 The analyses of the proximal composition of moisture, ash, total protein, total fats, total dietary fibre
182 and carbohydrates were determined. Moisture was determined gravimetrically in an oven at 105°C to a
183 constant weight. The ash content was quantified by incinerating the sample to 550°C for 6 h and fat
184 analysis was obtained by extraction of the sample in Soxhlet. Total protein content was determined by
185 the Kjeldahl method using a factor of 5.7 for conversion of nitrogen into protein. For total dietary fibre,
186 the gravimetric-enzymatic method was used (AOAC, 2016). Carbohydrates were determined by
187 difference, as follows:

188 % Carbohydrate = $100 - (moisture + ash + fat + total\ protein + total\ dietary\ fibre)$

189

190 **2.6 Amino acids composition**

191 The evaluation of the amino acid composition of colonized grain flours and control flours was performed
192 at the Laboratory of Methods, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, as
193 previously described (Camargo et al., 2018). The results of the 15 amino acids investigated (histidine,
194 arginine, serine, aspartic acid, glutamic acid, threonine, glycine, tyrosine, alanine, methionine, valine,
195 phenylalanine, leucine + isoleucine, lysine) were expressed as mg of amino acids per g of dry flour sample.

196

197 **2.7 Analyses of physical and physicochemical characteristics**

198 Samples were evaluated for pH by potentiometer, in which 1 g of the sample was mixed with 10 mL of
199 deionized water. The colours of the flours were evaluated using a digital colorimeter with a diffuse d/0°
200 sphere (Delta Color, Delta Vista model, Brazil) by reading the CIE (L^* , a^* and b^*) parameters. Where the
201 parameter L^* corresponds to the lightness, ranging from 0 (dark sample) to 100 (light sample), the
202 parameter a^* is related to the green colour dimension (negative values) and red (positive values), b^* is
203 related to the colours blue (negative values) and yellow (positive values). The results were expressed
204 through the Total Colour Difference (TCD^*) parameter of the control and colonized grain flour samples,
205 obtained using the following equation: $TCD^* = [(difference\ in\ the\ value\ of\ L^*)^2 + (difference\ in\ the\ value\ of\ a^*)^2 + (difference\ in\ the\ value\ of\ b^*)^2]^{1/2}$.

207 The water activity was determined at 25°C using LabMaster-AW equipment (Novasina, Switzerland).
208 Water absorption index (WAI) was determined according to a methodology adapted from Xiao et al.,
209 (2015). Sample (1 g) and distilled water (5 mL) was shaken at 150 rpm for 30 min at 23 ± 1°C and
210 centrifuged at 1800 g (Centribio 80-2B-15, Brazil) for 20 min. The supernatant was carefully removed,
211 and WAI determined as: WAI (g/g) = mass of the hydrated sediment (g)/initial sample mass (g).
212 For analysis of fat absorption capacity (FAC), samples (0.5 g) and soybean oil (6 mL) were maintained
213 for 18 h at 23 ± 1°C and then centrifuged at 3200 g (Eppendorf 5840 R, Germany) for 20 min. The
214 supernatant oil was removed, and tubes were inverted for 25 min to drain the excess oil. FAC was
215 determined as follows: FAC (%) = 100 × (mass of fat absorbed by the sample (g)/mass of the sample (g))
216 (Xiao et al., 2015).

217

218 **2.8 Extraction and determination of total phenolic content**

219 Total phenolic content was extracted as described by Zhai, Wang, & Han (2015), with modifications. The
220 extraction was performed using 0.6 g of each sample with 6 mL of ethanol:water solution (80:20 v/v).
221 Vigorous shaken by vortexing (Vortex Mixer, 2500 rpm, Brazil) was performed for 10 s, every 15 min
222 for 1 h at 25°C. Afterwards, the mixtures were placed in an ultrasonic bath (Cristofoli, 42 Hz, Brazil) for
223 5 min at 25°C, centrifuged at 1800 g and 25°C for 20 min (Centribio, 80-2B-15, Brazil), filtered
224 (Whatmann n1° filter paper).

225 The Folin-Ciocalteu colorimetric method was used to measure the total phenolic content of extracts
226 (Singleton and Rossi Jr., 1965), expressed in mg of equivalent gallic acid (EAG) per g of sample, using a
227 calibration curve of gallic acid (0.002–0.0012 mg).

228

229 **2.9 Analysis of antioxidant activity *in vitro***

230 The DPPH[·] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was performed based on the methodology described by
231 Gambato et al. (2016). The results were expressed as micromoles of Trolox Equivalent Antioxidant
232 Capacity (TEAC) per g of sample, using a Trolox calibration curve (0.0–0.2 µmol).

233 A previously published method was adapted for the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic
234 acid) (ABTS) radical assay (Re et al., 1999). The results were expressed as micromoles of Trolox
235 Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) per g of sample using a Trolox calibration curve (0.000–0.075
236 µmol).

237

238 **2.10 Ergothioneine and Lovastatin**

239 Ergothioneine was extracted from 0.5 g of sample, according to the methodology proposed by Dubost,
240 Beelman, Peterson, & Royse (2006). Identification and quantification of ergothioneine was performed in
241 an HPLC system (Gambato et al., 2018). Identification of ergothioneine was based on the comparison of
242 the sample area peaks with the peaks of the areas of standard solutions with known ergothioneine
243 concentrations (0.006–0.100 µg/mL).

244 For the quantification of lovastatin, the samples (0.5 g) were extracted with methanol (5 mL) (Sorrentino
245 et al., 2010), followed by identification and quantification through an HPLC system (Shen et al., 1996).
246 The lovastatin identification was performed at 254 nm, and samples were quantified by comparing the
247 sample area peaks with the peaks of the standard solution with known lovastatin concentrations (0.001–
248 0.015 µg/mL).

249

250 **2.11 Anti-obesity and anti-hyperglycaemic activity**

251 The phenolic extracts of colonized grain flours and control flours were evaluated in an *in vitro* assay to
252 detect inhibition of pancreatic lipase enzyme activity to evaluate their anti-obesity effects using the
253 colorimetric method using 1-2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid (6-methylresorufin)-ester (DGGR)
254 as a substrate (Wilcox et al., 2014). The results were expressed as percent inhibition of pancreatic lipase.
255 Anti-hyperglycaemic activity was determined by *in vitro* assays against the α-glucosidase enzyme using
256 p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside as a substrate (Camargo, Regitano-d'Arce, Telles Biasoto, & Shahidi,
257 2016), and against the α-amylase enzyme using the modified Caraway method (Zengin et al., 2016). The
258 results were expressed as percent of inhibition of α-glucosidase and α-amylase, respectively.

259

260 **2.12 Statistical analysis**

261 Results were expressed as the mean \pm standard deviation of triplicate values. For analysis of variance
262 (ANOVA) and Tukey's test ($p \leq 0.05$), Origin software version 8.1 (OriginLab®) were used.

263

264 **3. Results and discussion**265 **3.1 Mycelia colonized grains**

266 In this study, the three evaluated fungi were able to colonize each tested grain (Figure S1). Mycelial
267 growth was observed on surface and interior of the cultivation media. However, total colonization
268 occurred at different times: 28 days for *A. blazei*, 21 days for *A. fuscosuccinea* and 15 days for *P. albidus*
269 (Figure S1). In this way, it was possible to obtain mycelia growth in all the grains, making it possible to
270 obtain new formulations containing a flour with mycelium of different macrofungi. Some grain-based
271 foods colonized with microrganisms are already traditionally used, such as 'natto' (soybeans cultivated
272 with *Bacillus subtilis*) and 'anka' (rice cultivated with *Monascus* sp.). Most of the studies reporting the
273 beneficial health properties of macrofungi were performed with the fruiting bodies. However, mycelia
274 can also be exploited as potential sources of bioactive compounds, with the advantage of the shortest
275 incubation time (Souilem et al., 2017). Thus, it is an interesting strategy to use biotechnology to develop
276 new products with increased nutritional value, with claims of functional and bioactive properties, such as
277 antioxidant activity and inhibition of enzymes associated with the onset of diseases in humans (Dwivedi
278 et al., 2015).

279 Ergosterol content can be used for the indirect estimation of the amount of fungal biomass in SSC. The
280 mycelial biomass produced by submerged culture was used to establish a correlation between the
281 ergosterol concentration of each microorganism and the biomass. Afterwards, this correlation was used
282 to determine the biomass concentration in SSC. Comparing the ergosterol curves obtained for the different
283 mycelium, the highest quantities were identified in the *A. fuscosuccinea* mycelia and the lowest in *A.*
284 *blazei*. The following relations were obtained: each 1 g of mycelia biomass of *P. albidus*, *A. blazei* and *A.*

285 *fuscosuccinea* obtained by submerged cultivation contained 3.10, 1.20 and 6.40 mg of ergosterol,
286 respectively (Figures 1A and B). These data were calculated from the equations $y = 0.0012x - 0.0011$ (R^2
287 = 0.996) for *A. blazei*; $y = 0.0064x + 0.0037$ ($R^2 = 0.9965$) for *A. fuscosuccinea* and $y = 0.0031x + 0.003$
288 ($R^2 = 0.9972$) for *P. albidus*.

289 Figure 1C shows the ergosterol values determined in samples of colonized flour. The amount of ergosterol
290 varies with the type of grain and the microorganism used, and greater quantities of ergosterol were seen
291 in rice flour with *A. fuscosuccinea* (0.37 mg/g), as well as in wheat flour with *A. fuscosuccinea* (0.34
292 mg/g) and *P. albidus* (0.60 mg/g). In comparison, another study reported that wheat grains colonized with
293 *A. blazei* mycelium exhibited 0.29 mg ergosterol/g after 14 days of SSC (Dalla-Santa et al., 2012).

294 Due to the difficulty of separating the mycelial biomass from the grain, the indirect determination method
295 was used with the ergosterol dosage to estimate the amount of mycelium present in the colonized flours.
296 The results of ergosterol for the non-inoculated control samples are not presented, since they were below
297 the limit of detection for the method. Among the analysed flours, the highest amount of fungal biomass
298 was observed in wheat with *A. blazei* (178 mg/g) and *P. albidus* (183 mg/g) (Figure 1D).

299 Ergosterol is a primary sterol produced by macrofungi. Besides being useful in the indirect quantification
300 of mycelial biomass, it is a compound with recognized bioactivity (antioxidant, inhibition of low-density
301 lipoprotein cholesterol (LDL) synthesis, precursor of vitamin D2, anti-cancer and anti-inflammatory
302 effects) for the formulation of functional foods and still little explored (Heleno et al., 2016; Souilem et
303 al., 2017).

304

305 **3.2 Nutritional, physical and physico-chemical characteristics**

306 Bromatological analyses were performed with the objective of evaluating the nutritional composition of
307 flours, mainly in relation to total protein content (Figure S2). Colonized grain flours presented a significant
308 increase ($p < 0.05$) in total protein content in relation to the control.

309 Rice flour (Figure S2A) total protein content ranged from 6.91 ± 0.01 g/100 g (control) to 8.97 ± 0.40
310 g/100 g (when cultivated with *A. fuscosuccinea*). However, this protein value does not differ significantly

311 ($p < 0.05$) from that observed in the flour with *P. albidus* (8.54 ± 0.04 g/100 g), which has the advantage
312 of a shorter bioprocess time when compared to the others.

313 In relation to the protein content of corn flours (Figure S2B), the highest total protein value (6.80 ± 0.04
314 g/100 g) was observed after 35 days of cultivation with *A. fuscosuccinea*, which differed statistically from
315 the others ($p < 0.05$). Regarding the total protein content of wheat flour (Figure S2C), the value obtained
316 with *P. albidus* (18.34 ± 0.13 g/100 g) was significantly higher ($p < 0.05$) than the other fungi after 28
317 days of SSC. Thus, the total protein content results demonstrate the potential of *A. blazei*, *A. fuscosuccinea*
318 and *P. albidus* in the enrichment of microbial proteins with plant biomasses, as already reported in
319 tangerine residues with *Lentinus polychrous* (Nitayapat et al., 2015b), cereals with *A. blazei* (Zhai, Wang,
320 & Han, 2015) and wheat bran with *P. eryngii* and *P. ostreatus* (Wanzenböck et al., 2017). The increase in
321 protein content observed in this study needs to be carefully considered, since the increase in the absolute
322 amount of protein suggests an increase of nitrogen in the colonized grains. However, white degradation
323 fungi, such as those used in this work, are not able to fix nitrogen gas (Nayan, Sonnenberg, Hendriks, &
324 Cone, 2018). Although research by Jayasingheachchi & Seneviratne (2004) suggests that the
325 macrofungi are able to fix the nitrogen in the atmosphere, for this to occur, symbiotic interactions with
326 nitrogen-fixing bacteria or mycorrhizae are required. Since the grains were sterilized in this work, bacteria
327 cannot perform the nitrogen-binding role unless they are present in the isolated fungi. The most accepted
328 explanation for the increase in protein content is that it occurs at the expense of other nutrients. Degraded
329 carbohydrates are converted into fungal biomass and CO₂, leading to an increase in the nitrogen content.
330 White degradative fungi depolymerize the cell wall components and assimilate nitrogenous compounds
331 from the substrates, altering the solubility of the proteins and improving the degradability of plant
332 biomasses (Nayan, Sonnenberg, Hendriks, & Cone, 2018).

333 Considering the data collected in the analysis of total proteins in different cultivation times, for which most
334 of the results presented a higher concentration of this macronutrient in the last sampling, the other
335 analytical procedures were performed at the last sampling time.

336 Table 1 displays the general results of protein, total fat, ash, total dietary fibre and carbohydrates of the
337 flours obtained from grains colonized by *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* and *P. albidus*. In addition to
338 significantly concentrating ($p < 0.05$) the protein content, the microbial bioprocess also increased total
339 ash and total dietary fibre and significantly reduced ($p < 0.05$) the carbohydrate and total fat content.
340 In rice flour, SSC with *P. albidus* resulted in the greatest increase in total dietary fibre (175% or 2.75-
341 fold) and ash (213% or 3.14-fold). On the other hand, after cultivation with *P. albidus*, the carbohydrate
342 and fat values of the rice flours were the lowest, with reductions of 15% and 83%, respectively, compared
343 to the control.

344 Regarding the corn flour compositions, the presence of the *P. albidus* mycelium resulted in a higher
345 increase in total dietary fibre content (100% or 2.0-fold) and a decrease in the fat value (89%), unlike with
346 *A. blazei* that presented a significant increase ($p < 0.05$) in fat (59%). There was no significant change in
347 total ash content, although the highest value was obtained in corn flour with *A. fuscosuccinea* (0.63 g/100
348 g). Regarding the carbohydrate content, both colonization with *A. fuscosuccinea* and *P. albidus* caused
349 significant decreases ($p < 0.05$) of 7.50% and 7.46%, respectively, in relation to the control. According to
350 Xiao et al. (2015), the carbohydrate content decreases because they are used by the fungi during growth.
351 The nutritional composition of wheat flour colonized with *P. albidus* resulted in a higher enrichment of
352 total dietary fibre (112% or 2.12-fold) and ash (87%) and a decrease of 87% in fat content when compared
353 to control wheat flour. With *A. fuscosuccinea* and *A. blazei*, the fat content of colonized wheat flour nearly
354 doubled. Wanzenbock et al. (2017) previously observed a decrease in the fat content of wheat bran during
355 SSC by species of the genus *Pleurotus*, suggesting that they consume fats during mycelial formation. On
356 the other hand, some fungi are able to synthesize fatty acids during cultivation, as reported by Dwivedi et
357 al. (2015) and observed in our work with *A. fuscosuccinea* and *A. blazei*.

358 After the colonization of grains with macrofungi mycelia, there was an important nutritional enrichment,
359 mainly in the total protein content (Figure S2, Table 1). Other data have previously been reported by Zhai
360 et al. (2015) on the use of *A. blazei* in SSC of seven different grain types; however, literature data on grain
361 SSC using mycelium of the wild strains *A. fuscosuccinea* and *P. albidus* are scarce. Thus, this work

362 demonstrates interesting results regarding the possibility of enrichment and availability of bioactive and
363 important nutrients of cereal grains previously treated by edible macrofungi.

364 Table 2 shows the amino acid profiles of grains after SSC by macrofungi mycelia. Concerning colonized
365 rice flours, the bioprocess with *A. fuscosuccinea* and *P. albidus* did not significantly alter the value of
366 total amino acids when compared to the control, and with *A. blazei* this value was significantly reduced.
367 However, there was a significant increase ($p < 0.05$) in the contents of the essential amino acid tyrosine
368 and methionine with the three fungi. Furthermore, *A. fuscosuccinea* and *P. albidus* increased threonine
369 and glycine. Aspartic acid and glutamic acid showed increases in flours with *P. albidus*. Although not
370 essential, this result is interesting due to the fact that these amino acids are responsible for the umami
371 flavour and constituents of the food flavour enhancer monosodium glutamate (Ulzijargal et al., 2013).
372 In corn, *A. blazei* cultivation significantly reduced the total amino acid value. However, the significant
373 increases ($p < 0.05$) in the concentrations of the essential amino acid threonine, valine, phenylalanine and,
374 mainly, methionine after cultivation by *A. fuscosuccinea* should be highlighted. On the other hand, after
375 the bioprocess with *P. albidus*, the total amino acids increased 7.2% in relation to the control ($p < 0.05$),
376 with increases in all amino acids analysed except tyrosine and lysine (Table 2).
377 Colonized wheat flour with *A. blazei* maintained the total amino acid content and significantly increased
378 ($p < 0.05$) in *P. albidus* colonization, with an increase of 17.7% in relation to the control sample. However,
379 after colonization with *A. fuscosuccinea*, the total amino acid value decreased by 28.1%. Comparing the
380 amino acids analysed in the colonized samples with the respective controls, it was observed that in all
381 three flours there was increase of aspartic acid and that *P. albidus* increased all the amino acids
382 investigated, except glutamic acid and methionine (Table 2).
383 The increase in grain amino acid levels through SSC by macrofungi was reported in other studies. For
384 example, colonization of chickpeas flour by *Cordyceps militaris* for 7 days resulted in increases of 10.9%
385 in total amino acid content and 14.4% in total essential amino acids analysed, compared to uncultivated
386 grain (Xiao et al., 2015).

387 Table 3 shows the results of the physio-chemical properties (pH, water colour, water absorption index and
388 fat absorption capacity). In general, the pH decreased after SSC by macrofungi mycelia, except in wheat
389 with *A. fuscosuccinea*, in which the pH increased from 6.20 ± 0.01 (control) to 6.45 ± 0.01 .
390 Water activity (a_w) is an important factor for the conservation of fermented cereals. Colonized grain flours
391 presented greater a_w values than the respective control flours. Cultivation with *A. fuscosuccinea* resulted
392 in flours with higher a_w and those with *A. blazei*, at lower a_w values, regardless of the grain tested.
393 Instrumental colour evaluation of the colonized grain flours and controls indicated that the development
394 of the mycelia on the grains resulted in significant differences in the colour of the flours ($p < 0.05$, Table
395 3). Among the rice and wheat flours, those obtained from the grains colonized with *P. albidus* had the
396 highest total colour differences compared to the others. This result is associated with the greater
397 luminosity presented by the rice flour (84.22 ± 1.64) and wheat (72.48 ± 1.45) after the colonization of *P.*
398 *albidus* in the grain. It was also noted that these are lighter than the respective control flours, in which the
399 L^* value was 65.50 ± 1.42 for rice and 55.36 ± 1.84 for wheat. The higher the value of the L^* parameter,
400 the whiter the sample.
401 Comparing the values of Total Colour Difference (TCD) of corn flours, the greatest difference was
402 observed after colonization with *A. fuscosuccinea*. This was a consequence of a decrease in the chromatic
403 parameter b^* , which represents a decrease in the characteristic yellow colour of corn, from 44.24 ± 1.82
404 (before) to 14.03 ± 2.14 (after cultivation). In flours, the instrumental evaluation of colour is an important
405 factor for its use as an ingredient in various formulations of food products. Colour alteration in the flours
406 after SSC can be attributed to the presence of the mycelium or to the drying process, in which reactions
407 of non-enzymatic browning may occur, such as ‘Maillard’ or caramelization reactions (Nitayapat et al.,
408 2015b).
409 The water absorption index (WAI) for flours (controls and after colonization by macrofungi) was
410 evaluated, since it is an important property for food applications. This refers to the capacity of a
411 component to be soaked in water and hold it against a gravitational force within a food matrix (Zhao et
412 al., 2017). The SSC of grains with macrofungi resulted in a decrease in the water absorption index of

413 colonized grain flours when compared to controls, except for corn colonized by *P. albidus* (Table 3).
414 Among the macrofungi tested, *P. albidus* was found to have the highest water absorption index of all the
415 grains tested, being even greater than the capacity of the corn flour control. This property may be
416 associated with the insoluble dietary fibre content and the cellular structure of the grains. The reduction
417 of the WAI in the mycelium milled meal may be due to the decrease in the content of insoluble food fibre
418 after cultivation (Zhao et al., 2017). In the case of corn, for which the WAI after colonization with *P.*
419 *albidus* was higher than the control, there may have been an increase in the amount of insoluble food
420 fibre. This may be interesting for yield purposes in the preparation of products with these flours, as greater
421 water absorption index results in a higher yield.

422 As shown in Table 3, the SSC altered the fat absorption capacity (FAC) of colonized grain flours, which
423 generally presented lower FAC than the controls. Among the mycelia of fungi used in the bioprocess, *A.*
424 *fuscosuccinea* resulted in flours with the lowest FAC, while *P. albidus* resulted in the largest. Similar
425 studies have shown that the SSC changes the FAC of grains, such as in chickpeas, which may be related
426 to the amino acid profile of the mycelia, since fungi can synthesize different amino acids that present
427 radical groups with distinct apolar characteristics in their structures, with greater or lower affinity with
428 lipid molecules (Xiao et al., 2015). The addition of *L. edodes* mushroom flour in doughs prepared by
429 frying immersion reduced oil absorption by up to 51%, improving food crust barrier oil absorption
430 properties (Kim et al., 2010). Thus, from the point of view of food technology, it is suggested that grain
431 flours grown with *A. fuscosuccinea* could be incorporated in foods in order to reduce the absorption of fat
432 during processing, as in the case of fried foods.

433

434 **3.3 Total phenolic content and antioxidant activity *in vitro***

435 Table 4 shows the results of total phenolic compounds, antioxidant activity, lovastatin and ergothioneine.
436 A significant increase ($p < 0.05$) in phenolic compounds and antioxidants of colonized grain flours was
437 observed when compared to controls. Colonized rice flours presented total phenol content varying
438 between 0.44 and 1.36 mg GAE/g, and cultivation with *A. blazei* resulted in the highest value of phenolic

439 content that, consequently, presented the highest antioxidant activity among the colonized rice in DPPH·
440 and ABTS assays (8.75 ± 0.06 and 11.64 ± 0.25 $\mu\text{mol TEAC/g}$ of sample, respectively). The antioxidant
441 activity of *Agaricus* strains has been previously investigated in wheat, rice, oats, corn, millet, sorghum
442 and buckwheat (Kang et al., 2017; Zhai, Wang, & Han, 2015). According to the same authors, the total
443 phenolic content and grain antioxidant activity can be improved after SSC with *Agaricus* strains. Kang et
444 al. (2017) reported that the IC_{50} value in the DPPH· assay with extracts of buckwheat flour decreased from
445 1.53 mg/mL (before) to 0.76 and 0.85 mg/mL after 21 days of SSC with *Agaricus blazei* Murrill SH26
446 and *Agaricus bisporus* AS2796, respectively. Among the corn flours, those colonized with *A.*
447 *fuscosuccinea* presented higher total phenolic content (2.38 ± 0.05 mg GAE/g) and higher antioxidant
448 activity in the DPPH· (8.90 ± 0.02 $\mu\text{mol TEAC/g}$) and ABTS (16.52 ± 1.03 $\mu\text{mol TEAC/g}$) assays. For
449 wheat flours, the highest total phenolic content was also observed after SSC with *A. fuscosuccinea* (0.98
450 ± 0.03 mg GAE/g), which also had the highest scanning ability of the ABTS radical (16.04 ± 0.17 μmol
451 TEAC/g). However, in the DPPH· antioxidant capacity assay, the highest activity was observed with the
452 *A. blazei* colonized wheat (8.36 ± 0.04 $\mu\text{mol TEAC/g}$). Although *Auricularia* spp. is used for millennial
453 eastern culture, there is little information about their use after SSC regarding nutritional enrichment of
454 raw materials such as grains, this being one of the first studies to report total phenolic content and
455 antioxidant activity in *A. fuscosuccinea* colonized grain flours (Table 4). Grains and oilseeds have
456 important nutrients and phenolic antioxidants in their composition. However, the main phenolic
457 compounds of cereals, such as ferulic acid, are bound to cellulose and hemicellulose through ester bonds
458 in the cell wall, which can hinder their extraction (Dorđević et al., 2010). It is known that fungi excrete
459 enzymes capable of cleaving these bonds, facilitating the extraction of phenolics, which may explain the
460 significant increase of these compounds and the consequent increase in the antioxidant activity of grain
461 flours biotransformed by SSC (Kang et al., 2017). In addition, macrofungi are recognized by the phenolic
462 compounds produced in their secondary metabolism because they have a high capacity to sweep free
463 radicals (Gambato et al., 2016). However, products obtained through SSC and subjected to drying
464 processes need to be carefully handled with regard to temperature. On the one hand, the excess of heating

465 can degrade bioactive compounds, and on the other hand, new compounds can be formed by reactions
466 like ‘Maillard’ and can even increase the antioxidant activity (Nitayapat et al., 2015b).
467 The functional components lovastatin and ergothioneine were found in some flour samples after the SSC
468 bioprocess. Lovastatin was detected in small quantities in *A. fuscosuccinea* ($0.66 \pm 0.02 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) and *A.*
469 *blazei* ($0.10 \pm 0.01 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) colonized wheat flour. Lovastatin is a natural statin, an inhibitor of the rate-
470 limiting enzyme in cholesterol production (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
471 inhibitors), which assists in lowering total cholesterol and LDL cholesterol levels and is used in patients
472 who are at risk of coronary heart disease and atherosclerotic disease (Sorrentino et al., 2010).
473 The ergothioneine analysis revealed the presence of this compound only in grain flours colonized by *P.*
474 *albidus*, with the highest amount found in wheat ($26.01 \pm 0.12 \mu\text{g}/100 \text{ g}$). Ergothioneine has antioxidant
475 activity *in vitro*. It is a secondary metabolic enzyme that can be found in several edible macrofungi, but
476 species of the genus *Pleurotus* attract attention because of the content they present (Dubost et al., 2006;
477 Gambato et al., 2018). Recently, Gambato et al. (2018) reported the ergothioneine content in *P. albidus*
478 extracts ($2.13 \pm 0.01 \text{ mg/g}$), suggesting that it could have contributed to the mitochondrial biological
479 activity of the extract that prevented the decline of the activity of the complex I of the electron transport
480 chain and minimized the oxidative data induced by hyperglycaemia in endothelial cells (EA.hy926).
481

482 **3.4 Inhibition of enzymatic activity**

483 Extracts from the samples before (control) and after SSC by macrofungi mycelia were evaluated for their
484 ability to inhibit pancreatic lipase, α -glucosidase (Table 5) and α -amylase. Lipase is an important enzyme
485 involved in the absorption of triacylglycerol in the small intestine, as it acts by hydrolysing
486 triacylglycerols to glycerol and fatty acids (Dwivedi et al., 2015). In this work, the inhibition of pancreatic
487 lipase was different for each grain tested. Rice and corn control extracts (without mycelia) were more
488 effective in lipase inhibition and were even more efficient than their respective extracts of the colonized
489 grains. On the other hand, extracts of wheat grains flours colonized with macrofungi presented with
490 greater inhibition of pancreatic lipase ($p < 0.05$) than wheat extract (control). Extracts of wheat grain

491 flours with *P. albidus* and *A. fuscosuccinea* inhibited 74.5% and 45.5% of lipase activity, respectively.
492 These were the extracts with the highest anti-obesity activity after SSC with edible macrofungi mycelia
493 in this work. This suggests the use of colonized wheat flours in the formulation of functional foods, since
494 the suppression of triacylglycerol absorption by inhibition of lipase could be a strategy in the control of
495 obesity.

496 Recently, a new food called “nilamadana”, capable of inhibiting 17% of pancreatic lipase activity and
497 55% of the formation of advanced glycation end products (AGEs), was created from the SSC of the great
498 millet (*Paspalum scrobiculatum*) by *Penicillium roqueforti* (Dwivedi et al., 2015).

499 The α -glucosidase and α -amylase enzymes play important roles in the control of glycaemia, since they
500 regulate the absorption of glucose in the small intestine (Camargo et al., 2016). In the α -glucosidase
501 enzyme inhibition assay, all colonized grain flours extracts presented inhibitory action superior to the
502 controls ($p < 0.05$) and acarbose (1 mg/mL), used as a positive control. Among the colonized macrofungi
503 mycelia, *P. albidus* and *A. blazei* were the ones that most inhibited α -glucosidase activity (above 78.4%
504 inhibition), regardless of the cultivated grain. Akata, Zengin, Picot, & Mahomoodally (2018) evaluated
505 the inhibition of α -glucosidase in six species of macrofungi (*Lycoperdon utriforme*, *Macrolepiota*
506 *mastoidea*, *Agaricus campestris*, *Macrolepiota procera*, *Leucoagaricus leucothites* and *Coprinus*
507 *comatus*), obtaining values that varied between 0.24 ± 0.10 and 2.97 ± 0.14 mmol equivalents of acarbose.
508 The inhibitory action of the extracts against the α -amylase enzyme was also investigated. However, the
509 results pointed out that colonized grain flour extracts and controls were not able to inhibit the enzyme
510 during the assay. This fact may be related to the production of amylases by the fungi during their growth,
511 since the culture medium composed of grains is rich in starch. Other studies have reported that macrofungi
512 extracts are more efficient at inhibiting α -glucosidase than α -amylase (Akata et al., 2019; Zengin et al.,
513 2016). According to Zengin et al. (2016), the anti-glycaemic therapies currently used are characterized by
514 marked inhibition of α -amylase and, consequently, gastrointestinal discomfort due to undigested
515 carbohydrates. Thus, the development of hypoglycaemic agents that discretely act on the inhibition of α -
516 amylase and more strongly against α -glucosidase is a topic of interest (Akata et al., 2019).

517 The enzymatic inhibition by colonized grain flours extracts may be associated with the presence of several
518 compounds, such as phenolics (Akata et al., 2019; Zengin et al., 2016) and low molecular weight
519 polysaccharides (Zhu et al., 2016). The need to elucidate the mechanisms of action of colonized mycelial
520 extracts in inhibiting the activity of important enzymes in human metabolism is evident, as this is one of
521 the first studies to report the potential anti-obesity and anti-hyperglycaemic activities of cereal grain flours
522 previously treated and enriched with mycelial biomass from edible macrofungi *in vitro*.

523

524 **4. Conclusion**

525 The bioprocess used in this study was able to significantly concentrate protein in some treatments, as in
526 wheat grain flours cultivated with *P. albidus*. Flours of colonized grains also showed a change in
527 colouration. The water and fat absorption capacities were higher in flours with *P. albidus*, while *A.*
528 *fuscosuccinea* cultivation decreased the fat absorption capacity of the flours. Extracts of colonized grain
529 flours had increased total phenolic content after SSC and showed higher antioxidant activity, especially
530 in the cultivation of *A. blazei* and *A. fuscosuccinea*. Extracts of wheat grains with *P. albidus* and *A.*
531 *fuscosuccinea* showed anti-obesity activity *in vitro*. With regard to the anti-hyperglycaemic activity the
532 extracts were more effective against α -glucosidase than α -amylase, with the highest inhibitions occurring
533 in grains with *P. albidus* and *A. blazei*. In view of the results obtained, it can be noticed that the flour
534 obtained from cereal grains treated by SSC with edible macrofungi present potential food developments
535 with aggregate nutritional and bioactive value and suggest that further studies should be conducted with
536 the purpose of elucidating the mechanisms involved in biotransformation processes.

537

538 **Acknowledgments**

539 The authors thank the University of Caxias do Sul (UCS), Federal Institute of Santa Catarina (IFSC) at
540 the Campus São Miguel do Oeste and CAPES-Embrapa 15/2014 for technical and financial support.

541

542 **References**

543 Akata, I., Zengin, G., Picot, C.M.N., Mahomoodally, M.F., 2019. Enzyme inhibitory and antioxidant properties of

544

- 545 six mushroom species from the Agaricaceae family. South African J. Bot. 120, 95–99.
 546 https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2018.01.008
- 547 Albanese, L., Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Pagliaro, M., 2018. Innovative beer-brewing of typical, old and healthy
 548 wheat varieties to boost their spreading. J. Clean. Prod. 171, 297–311.
 549 https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.027
- 550 Alvarenga, R.L.M., Naves, L.R.R., Xavier-Santos, S., 2015. The Genus *Auricularia* Bull. ex Juss. (Basidiomycota)
 551 in Cerrado (Brazilian Savanna) areas of Goiás state and the Federal District , Brazil. Mycosphere 6, 532–
 552 541. https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/5/3
- 553 Anderson, R.A., 1982. Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain
 554 products. Cereal Chem. 59, 265–269.
- 555 Anupama, Ravindra, P., 2000. Value-added food: Single cell protein. Biotechnol. Adv. 18, 459–479.
 556 https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8
- 557 AOAC, 2016. Official Methods of Analysis, 20th ed. AOAC International.
- 558 Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Development of a Novel Methodology for the
 559 Analysis of Ergosterol in Mushrooms. Food Anal. Methods 7, 217–223. https://doi.org/10.1007/s12161-013-
 560 9621-9
- 561 Bisaria, R., Madan, M., Vasudevan, P., 1997. Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion.
 562 Bioresour. Technol. 59, 5–8. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00140-X
- 563 Bonny, S.P.F., Gardner, G.E., Pethick, D.W., Hocquette, J.F., 2015. What is artificial meat and what does it mean
 564 for the future of the meat industry? J. Integr. Agric. 14, 255–263. https://doi.org/10.1016/S2095-
 565 3119(14)60888-1
- 566 Brozzoli, V., Bartocci, S., Terramoccia, S., Contò, G., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M., 2010. Stoned
 567 olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. Enzyme
 568 Microb. Technol. 46, 223–228. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.008
- 569 Cai, S., Wang, O., Wang, M., He, J., Wang, Y., Zhang, D., Zhou, F., Ji, B., 2012. In vitro inhibitory effect on
 570 pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) and
 571 synergistic effect of three phenolic acids. J. Agric. Food Chem. 60. https://doi.org/10.1021/jf3009958
- 572 Camargo, L.R., Silva, L.M., Komeroski, M.R., Kist, T.B.L., Rodrigues, C.E., Rios, A. de O., Silva, M.M., Doneda,
 573 D., Schmidt, H. de O., Oliveira, V.R., 2018. Effect of whey protein addition on the nutritional, technological
 574 and sensory quality of banana cake. Int. J. Food Sci. Technol. 53, 2617–2623.
 575 https://doi.org/10.1111/ijfs.13857
- 576 Canedo, M.S., de Paula, F.G., da Silva, F.A., Vendruscolo, F., 2016. Protein enrichment of brewery spent grain
 577 from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. Bioprocess Biosyst. Eng. 39, 1105–1113.
 578 https://doi.org/10.1007/s00449-016-1587-8
- 579 Cantele, C., Fontana, R.C., Mezzomo, A.G., da Rosa, L.O., Poletto, L., Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2017.
 580 Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus*
 581 *palmivorus*. Biocatal. Agric. Biotechnol. 12, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.012
- 582 Castro-Alves, V.C., Gomes, D., Menolli, N., Sforça, M.L., Nascimento, J.R.O. do, 2017. Characterization and
 583 immunomodulatory effects of glucans from *Pleurotus albidus*, a promising species of mushroom for farming
 584 and biomass production. Int. J. Biol. Macromol. 95, 215–223. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.059
- 585 Cauvain, S.P., 2015. Cookies, Biscuits and Crackers: Formulation, Processing and Characteristics, 2nd ed,
 586 Encyclopedia of Food Grains: Second Edition. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-
 587 5.00119-4
- 588 Chauhan, A., Saxena, D.C., Singh, S., 2015. Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made
 589 from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour. LWT - Food Sci. Technol. 63, 939–945.
 590 https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.115
- 591 Cheng, Y.F., Bhat, R., 2016. Functional, physicochemical and sensory properties of novel cookies produced by
 592 utilizing underutilized jering (*Pithecellobium jiringa* Jack.) legume flour. Food Biosci. 14, 54–61.
 593 https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.03.002
- 594 Cooray, S.T., Chen, W.N., 2018. Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to
 595 enhance nutritional value. J. Funct. Foods 42, 85–94. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.027
- 596 Corrêa, R.C.G., Barros, L., Fernandes, Â., Sokovic, M., Bracht, A., Peralta, R.M., Ferreira, I.C.F.R., 2018. A natural
 597 food ingredient based on ergosterol: Optimization of the extraction from: *Agaricus blazei*, evaluation of
 598 bioactive properties and incorporation in yogurts. Food Funct. 9, 1465–1474.
 599 https://doi.org/10.1039/c7fo02007d
- 600 Dalla-Santa, H.S., Rubel, R., Vítola, F.M.D., Rodrigues-Leon, J.A., Dalla-Santa, O.R., Brand, D., Alvaréz, D.C.,
 601 Macedo, R.E.F., Carvalho, J.C., Soccol, C.R., 2012. Growth parameters of *Agaricus brasiliensis* mycelium on

- wheat grains in solid-state fermentation. *Biotechnology* 11, 144–153.
- de Camargo, A., Regitano-d'Arce, M.A.B., Telles Biasoto, C., Shahidi, F., 2016. Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chem.* 212, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.047>
- Dias, E.S., 2010. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. *Ciência e Agrotecnologia*. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000400001>
- Dorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I., 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.* 119, 957–963. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.049>
- Doreau, M., Ferlay, A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livest. Prod. Sci.* 43, 97–110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226\(95\)00041-I](https://doi.org/10.1016/0301-6226(95)00041-I)
- Dubost, N.J., Beelman, R.B., Peterson, D., Royse, D.J., 2006. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *Int. J. Med. Mushrooms* 8, 215–222. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v8.i3.30>
- Dubost, N.J., Ou, B., Beelman, R.B., 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.* 105, 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.030>
- Dwivedi, M., Vasantha, K.Y., Sreerama, Y.N., Haware, D.J., Singh, R.P., Sattur, A.P., 2015. Nilamadana, new fungal fermented cereal based food. *J. Funct. Foods* 15, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.023>
- FAO, 2017. The State of Food and Agriculture. Leveraging Food Systems for Inclusive Rural Transformation.
- Fărcaş, A.C., Socaci, S.A., Dulf, F. V., Tofană, M., Mudura, E., Diaconeasa, Z., 2015. Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *J. Cereal Sci.* 64, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.003>
- Gambato, G., Pavão, E.M., Chilanti, G., Fontana, R.C., Salvador, M., Camassola, M., 2018. Pleurotus albidus modulates mitochondrial metabolism disrupted by hyperglycaemia in EA . hy926 endothelial cells. *Biomed Res. Int.* 2018, 1–10. [https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/2859787](https://doi.org/10.1155/2018/2859787)
- Gambato, G., Todescato, K., Pavão, E.M., Scortegagna, A., Fontana, R.C., Salvador, M., Camassola, M., 2016. Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi Pleurotus albidus and Pycnoporus sanguineus. *Bioresour. Technol.* 207, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.121>
- Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M., Pohleven, F., 2008. The use of spent brewery grains for Pleurotus ostreatus cultivation and enzyme production. *N. Biotechnol.* 25, 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.08.003>
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>
- Handa, C.L., De Lima, F.S., Guelfi, M.F.G., Georgetti, S.R., Ida, E.I., 2016. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chem.* 197, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.124>
- Heleno, S.A., Diz, P., Prieto, M.A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain myco sterols from Agaricus bisporus L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chem.* 197, 1054–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>
- Jakubczyk, A., 2018. Effect of addition of fermented bean seed flour on the content of bioactive components and nutraceutical potential of wheat wafers. *LWT - Food Sci. Technol.* 98, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.052>
- Jayasinghearachchi, H., Seneviratne, G., 2004. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen ? *J. Biosci.* 29, 293–296.
- Kaewnarin, K., Suwannarach, N., Kumla, J., Lumyong, S., 2016. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. *J. Funct. Foods* 27, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.008>
- Kang, M., Zhai, F.H., Li, X.-X., Cao, J.-L., Han, J.-R., 2017. Total phenolic contents and antioxidant properties of buckwheat fermented by three strains of Agaricus. *J. Cereal Sci.* 73, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.12.012>
- Kim, J., Lim, J., Bae, I.Y., Park, H.G., Gyu Lee, H., Lee, S., 2010. Particle size effect of lentinus edodes mushroom (chamsong-i) powder on the physicochemical, rheological, and oil-resisting properties of frying batters. *J. Texture Stud.* 41, 381–395. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2010.00231.x>
- Kurt, A., Gençcelep, H., 2018. Enrichment of meat emulsion with mushroom (Agaricus bisporus) powder : Impact on rheological and structural characteristics. *J. Food Eng.* 237, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.028>

- 659 Lavelli, V., Proserpio, C., Gallotti, F., Laureati, M., Pagliarini, E., 2018. Circular reuse of bio-resources: The role
 660 of: Pleurotus spp. in the development of functional foods. *Food Funct.* 9, 1353–1372.
 661 <https://doi.org/10.1039/c7fo01747b>
- 662 Lechner, B.E., Albertó, E., 2011. Search for new naturally occurring strains of Pleurotus to improve yields.
 663 Pleurotus albidus as a novel proposed species for mushroom production. *Rev. Iberoam. Micol.* 28, 148–154.
 664 <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.12.001>
- 665 Li, S., Chen, Y., Li, K., Lei, Z., Zhang, Z., 2016. Characterization of physicochemical properties of fermented
 666 soybean curd residue by *Morchella esculenta*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 109, 113–118.
 667 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.01.020>
- 668 Liang, C.H., Syu, J.L., Lee, Y.L., Mau, J.L., 2009. Antioxidant properties of solid-state fermented adlay and rice
 669 by *Phellinus linteus*. *Food Chem.* 116, 841–845. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.024>
- 670 Lin, M., Humbert, E., Sosulski, F., 1974. Certain Functional Properties of Sunflower meal Products. *J. Food Sci.*
 671 39, 368–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x>
- 672 Lynch, K.M., Steffen, E.J., Arendt, E.K., 2016. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health.
 673 *J. Inst. Brew.* 122, 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- 674 Menolli, N., Breternitz, B.S., Capelari, M., 2014. The genus Pleurotus in Brazil: A molecular and taxonomic
 675 overview. *Mycoscience* 55, 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.12.001>
- 676 Mole, S., Rogler, J.C., Butler, L.G., 1993. Growth reduction by dietary tannins: Different effects due to different
 677 tannins. *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 667–677. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90071-X)
- 678 Moran, L.A., Horton, H.R., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D., 2013. Bioquímica, 5th ed. Pearson Education do Brasil,
 679 São Paulo.
- 680 Moreira, C., Furlong, E.B., 2007. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em
 681 estado sólido. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 27, 805–811. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400021>
- 682 Muhlack, R.A., Potumarthi, R., Jeffery, D.W., 2018. Sustainable wineries through waste valorisation : A review of
 683 grape marc utilisation for value-added products. *Waste Manag.* 72, 99–118.
 684 <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>
- 685 Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., 2006. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential
 686 applications. *J. Cereal Sci.* 43, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- 687 Nayan, N., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H., Cone, J.W., 2018a. Screening of white-rot fungi for bioprocessing
 688 of wheat straw into ruminant feed. *J. Appl. Microbiol.* 125, 468–479. <https://doi.org/10.1111/jam.13894>
- 689 Nayan, N., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H., Cone, J.W., 2018b. Variation in the solubilization of crude protein
 690 in wheat straw by different white-rot fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.* 242, 135–143.
 691 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.06.009>
- 692 Neifar, M., Jaouani, A., Ayari, A., Abid, O., Ben, H., Boudabous, A., Najar, T., Ellouze, R., 2013. Improving the
 693 nutritive value of Olive Cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomes fomentarius*.
 694 *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.015>
- 695 Ng, S.H., Robert, S.D., Wan Ahmad, W.A.N., Wan Ishak, W.R., 2017. Incorporation of dietary fibre-rich oyster
 696 mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) powder improves postprandial glycaemic response by interfering with starch
 697 granule structure and starch digestibility of biscuit. *Food Chem.* 227, 358–368.
 698 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.108>
- 699 Nitayapat, N., Prakarnsombut, N., Lee, S.J., Boonsupthip, W., 2015a. Bioconversion of tangerine residues by solid-
 700 state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the final products. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 773–
 701 779. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.016>
- 702 Nitayapat, N., Prakarnsombut, N., Lee, S.J., Boonsupthip, W., 2015b. Bioconversion of tangerine residues by solid-
 703 state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the final products. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 773–
 704 779. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.016>
- 705 Öztürk, S., Cerit, İ., Mutlu, S., Demirkol, O., 2017. Enrichment of cookies with glutathione by inactive yeast cells
 706 (*Saccharomyces cerevisiae*): Physicochemical and functional properties. *J. Cereal Sci.* 78, 19–24.
 707 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.019>
- 708 Pardo, A., Perona, M.A., Pardo, J., 2007. Indoor composting of vine by-products to produce substrates for
 709 mushroom cultivation. *Spanish J. Agric. Res.* 5, 417–424.
 710 [https://doi.org/https://doi.org/10.5424/sjar/2007053-260](https://doi.org/10.5424/sjar/2007053-260)
- 711 Pardo, A., Perona, M.A., Pardo, J., 2005. Use of grapevine stem in the elaboration of specific substrates for
 712 *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer cultivation. *ITEA Inf. Tec. Econ. Agrar.* 101, 59–69.
- 713 Perera, P.K., Li, Y., 2011. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. *Funct.*
 714 *Foods Heal. Dis.* 1, 161–171.
- 715 Petre, M., Pătrulescu, F., Teodorescu, R.I., 2015. Controlled Cultivation of Mushrooms on Winery and Vineyard

- 716 Wastes, in: *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications.* pp. 31–47.
 717 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802794-3.00003-5>
- 718 Petre, M., Teodorescu, A., Ricu, G., 2005. The growing effect of vineyard and winery wastes on the production of
 719 mycelia and fruit bodies of edible and medicinal fungi. *Int. J. Med. Mushrooms* 7, 444–445.
 720 <https://doi.org/https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v7.i3.830>
- 721 Postemsky, P.D., Bidegain, M.A., González-Matute, R., Figlas, N.D., Cubitto, M.A., 2017. Pilot-scale
 722 bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through
 723 solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Bioresour. Technol.* 231, 85–93.
 724 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- 725 Raghavendra, S.N., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Tharanathan, R.N., 2004. Dietary fiber from coconut
 726 residue: Effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *Eur. Food Res. Technol.*
 727 218, 563–567. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0889-2>
- 728 Ramakrishna, R., Sarkar, D., Schwarz, P., Shetty, K., 2017. Phenolic linked anti-hyperglycemic bioactives of barley
 729 (*Hordeum vulgare L.*) cultivars as nutraceuticals targeting type 2 diabetes. *Ind. Crops Prod.* 107, 509–517.
 730 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.033>
- 731 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Min Yang, A., Catherine, R.-E., 1999. Antioxidant Activity
 732 Applying an improved ABTS radical. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- 733 Rodrigues, C.E., Tonial, M., Schäfer, L., Pasquali, G., Kist, T.B.L., 2018. Performance of
 734 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a derivatization reagent for the analysis of medium
 735 and long chain fatty acids using HPLC with LIF detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*
 736 1100–1101, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.043>
- 737 Rosa, L.O., Wasum, R.A., Dillon, A.J.P., 2016. Macrofungos (Filo basidiomycota) do Sul do Brasil: levantamento
 738 e verificação da capacidade de secreção de enzimas ligninolíticas., 1st ed. Novas Edições Acadêmicas,
 739 Saarbrücken.
- 740 Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-García, M., Esqueda, M., 2002. Biodegradation of Viticulture Wastes by
 741 Pleurotus : A Source of Microbial and Human Food and Its Potential Use in Animal Feeding. *J. Agric. Food
 742 Chem.* 50, 2537–2542. <https://doi.org/10.1021/jf011308s>
- 743 Shen, P., Shiao, M.-S., Chung, H.-R., Lee, K.-R., Chao, Y.-S., Hunt, V.M., 1996. Liquid chromatographic
 744 determination of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *J. Chinese Chem. Soc.* 43,
 745 451–457.
- 746 Silva, D.D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., Hyde, K.D., 2013. Bioactive metabolites
 747 from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Divers.* 62, 1–40.
 748 <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0265-2>
- 749 Singleton, V.L., Rossi Jr., J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid
 750 Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>
- 751 Siri, N., Lacroix, M., Garrigues, J.C., Poinsot, V., Couderc, F., 2006. HPLC-fluorescence detection and MEKC-
 752 LIF detection for the study of amino acids and catecholamines labelled with naphthalene-2,3-
 753 dicarboxyaldehyde. *Electrophoresis* 27, 4446–4455. <https://doi.org/10.1002/elps.200600165>
- 754 Sorrentino, F., Roy, I., Keshavarz, T., 2010. Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in
 755 *Aspergillus terreus* cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2722-0>
- 756 Souilem, F., Fernandes, Â., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R.,
 757 2017. Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory
 758 and cytotoxic properties. *Food Chem.* 230, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.026>
- 759 Steiner, J., Procopio, S., Becker, T., 2015. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food
 760 industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 303–315.
 761 <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>
- 762 Stephan, A., Ahlborn, J., Zajul, M., Zorn, H., 2018. Edible mushroom mycelia of *Pleurotus sapidus* as novel protein
 763 sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory tests in comparison to commercial
 764 proteins and meat sausages. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 913–924. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3012-1>
- 765 Ulziijargal, E., Yang, J.-H., Lin, L.-Y., Chen, C.-P., Mau, J.-L., 2013. Quality of bread supplemented with
 766 mushroom mycelia. *Food Chem.* 138, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.051>
- 767 Vendruscolo, F., Ribeiro, C.S., Espósito, E., Ninow, J.L., 2009. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição
 768 em dietas para alevinos. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 13, 487–493. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662009000400018>
- 769 Wang, C.-Y., Wu, S.-J., Shyu, Y.-T., 2014. Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade
 770
 771
 772

- bacteria fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 449–456. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2013.10.002>
- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M., 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour. Technol.* 78, 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00002-5)
- Wanzenböck, E., Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Zitz, U., Kracher, D., Schedle, K., Kneifel, W., 2017. Wheat bran biodegradation by edible *Pleurotus* fungi – A sustainable perspective for food and feed. *LWT - Food Sci. Technol.* 86, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.051>
- Wilcox, M.D., Brownlee, I.A., Richardson, J.C., Dettmar, P.W., Pearson, J.P., 2014. The modulation of pancreatic lipase activity by alginates. *Food Chem.* 146, 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.075>
- Xiao, Y., Huang, L., Chen, Y., Zhang, S., Rui, X., Dong, M., 2016. Estudio comparativo de los efectos de la adición de harina de garbanzo fermentado y no fermentado en la calidad y las propiedades antioxidantes del pan de trigo. *CYTA - J. Food* 14, 621–631. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1188157>
- Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2015. Effect of solid-state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 on physicochemical and functional properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 1317–1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.046>
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J., 1998. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1201–1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>
- Yang, H., Zhou, H., Wu, Z., Yang, H., Zhang, M., 2018. Production, physico-chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Biosci.* 26, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.008>
- Yang, X.W., Huang, M.Z., Jin, Y.S., Sun, L.N., Song, Y., Chen, H.S., 2012. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia* 83, 1169–1175. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.07.005>
- Zengin, G., Karanfil, A., Uren, M.C., Kocak, M.S., Sarikurkcu, C., Gungor, H., Nancy Picot, C.M., Mahomoodally, M.F., 2016. Phenolic content, antioxidant and enzyme inhibitory capacity of two: *Trametes* species. *RSC Adv.* 6, 73351–73357. <https://doi.org/10.1039/c6ra09991b>
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., Ceylan, O., 2014. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Ind. Crops Prod.* 53, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>
- Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L.A., Queiroz, M.I., 2010. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothecace microscopica* Nägeli. *Bioresour. Technol.* 101, 7107–7111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>
- Zhai, F.-H., Han, J.-R., 2016. Mycelial biomass and intracellular polysaccharides yield of edible mushroom *Agaricus blazei* produced in wheat extract medium. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.010>
- Zhai, F.-H., Wang, Q., Han, J.-R., 2015. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. *J. Cereal Sci.* 65, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.010>
- Zhao, H.M., Guo, X.N., Zhu, K.X., 2017. Impact of solid state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran. *Food Chem.* 217, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.062>
- Zhu, Z.Y., Guo, M.Z., Liu, F., Luo, Y., Chen, L., Meng, M., Wang, X.T., Zhang, Y.M., 2016. Preparation and inhibition on α-D-glucosidase of low molecular weight polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.058>
- Zou, Y., Ma, K., 2018. Screening of *Auricularia auricula* strains for strong production ability of melanin pigments. *Food Sci. Technol.* 38, 41–44. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.00117>

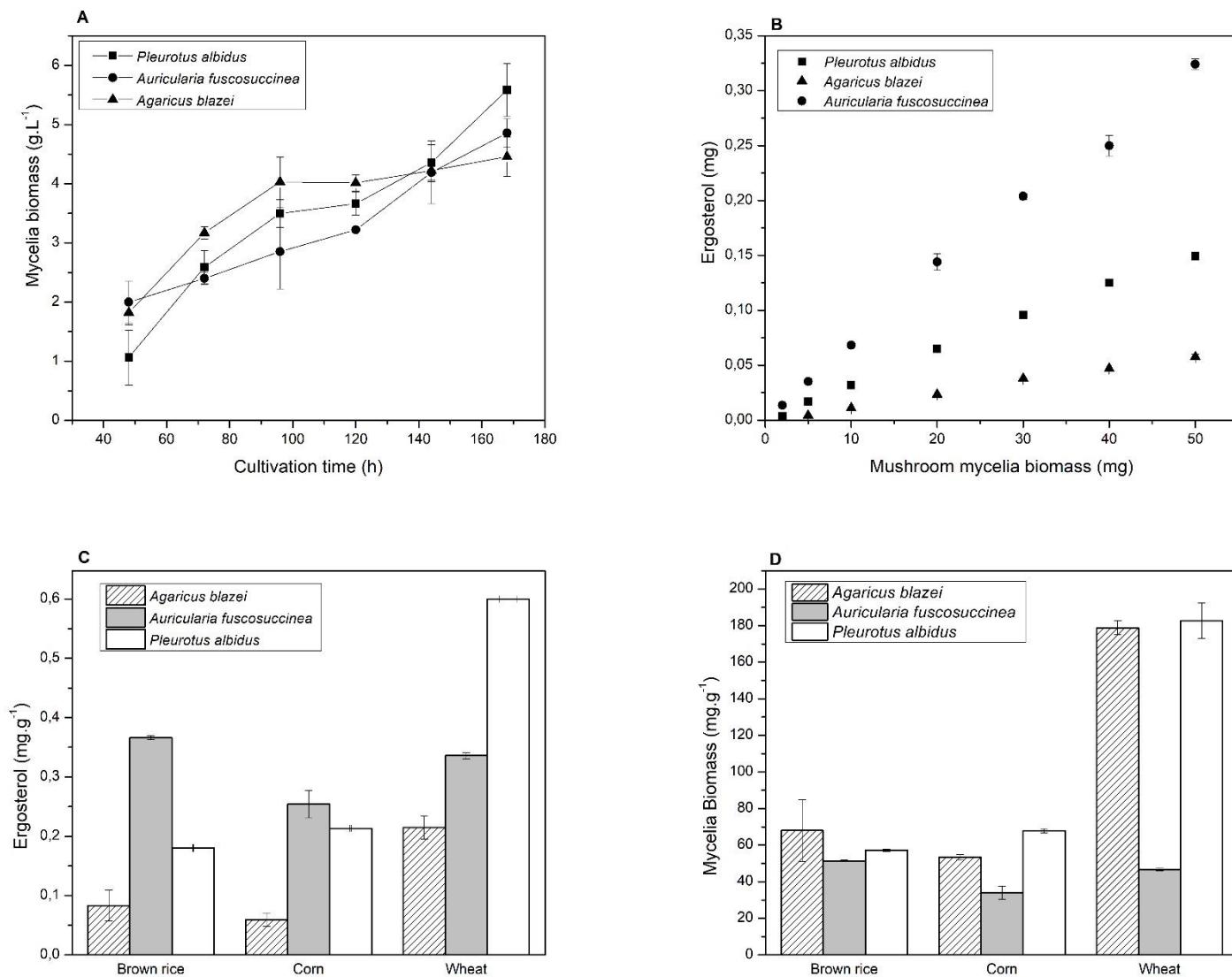


Figure 1. Mycelial biomass (g/L) produced by submerse culture during 168 h (A); Ergosterol curve of mycelial biomass (B); Ergosterol determined (mg/g) of colonized grain flours (C); Indirect determination of mycelial biomass (mg/g) of colonized grain flours (D).

Table 1. Contents of the nutritional constituents (dry matter) of grains flours control and colonized by mushrooms mycelia (*Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus*).

Grain	Macrofungi mycelia	Protein	Fat	Ash	Total dietary fiber (g/100g)	Carbohydrate ³ (g/100g)
		(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)		
Brown rice	Control ¹	6.91 ± 0.01 ^c	2.13 ± 0.10 ^a	0.93 ± 0.31 ^d	6.16 ± 0.17 ^d	83.86 ± 0.46 ^a
	<i>A. blazei</i> ²	8.38 ± 0.02 ^b	0.48 ± 0.10 ^b	1.56 ± 0.18 ^c	10.54 ± 0.31 ^c	79.02 ± 0.18 ^b
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	8.97 ± 0.40 ^a	1.50 ± 0.88 ^{ab}	2.27 ± 0.20 ^b	15.81 ± 0.26 ^b	71.53 ± 0.95 ^c
	<i>P. albidus</i> ²	8.54 ± 0.04 ^{ab}	0.36 ± 0.11 ^b	2.92 ± 0.14 ^a	16.98 ± 0.27 ^a	71.17 ± 0.47 ^c
Corn	Control ¹	5.70 ± 0.13 ^c	0.63 ± 0.17 ^b	0.37 ± 0.04 ^a	6.60 ± 0.04 ^c	86.60 ± 0.32 ^a
	<i>A. blazei</i> ²	6.06 ± 0.14 ^b	1.00 ± 0.10 ^a	0.34 ± 0.06 ^a	11.05 ± 0.47 ^b	81.51 ± 0.43 ^b
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	6.80 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.05 ^c	0.63 ± 0.19 ^a	12.18 ± 0.11 ^a	80.08 ± 0.37 ^c
	<i>P. albidus</i> ²	6.17 ± 0.14 ^b	0.07 ± 0.03 ^c	0.46 ± 0.01 ^a	13.25 ± 0.64 ^a	80.13 ± 0.79 ^c
Wheat	Control ¹	12.56 ± 0.14 ^c	0.85 ± 0.09 ^b	1.77 ± 0.10 ^c	13.53 ± 0.02 ^d	71.25 ± 0,26 ^a
	<i>A. blazei</i> ²	14.72 ± 0.10 ^b	1.72 ± 0.26 ^a	1.94 ± 0.08 ^{bc}	16.43 ± 0.06 ^c	66.17 ± 0.24 ^b
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	12.87 ± 0,11 ^c	1.79 ± 0.46 ^a	2.00 ± 0.04 ^b	18.24 ± 0.53 ^b	64.33 ± 1.25 ^b
	<i>P. albidus</i> ²	18.34 ± 0.13 ^a	0.11 ± 0.03 ^c	3.31 ± 0.01 ^a	28.74 ± 0.13 ^a	49.50 ± 0.27 ^c

^{a,b,c} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same grain, indicate that there is no significant difference at 5 % (p < 0.05) in the parameter evaluated.

¹Grain non-cultivated with macrofungi mycelia; ²Sample collected 15 days after total colonization; ³Carbohydrate, other than total dietary fiber.

Table 2. Amino acids composition (mg/g of sample) of grains flours control and colonized by mushrooms mycelia (*Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus*).

Aa	Brown rice				Corn				Wheat			
	Control ¹	<i>A. blazei</i> ²	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	<i>P. albidus</i> ²	Control ¹	<i>A. blazei</i> ²	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	<i>P. albidus</i> ²	Control ¹	<i>A. blazei</i> ²	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	<i>P. albidus</i> ²
His	0.98 ± 0.14 ^a	0.67 ± 0.04 ^b	0.73 ± 0.10 ^b	0.82 ± 0.03 ^{ab}	1.03 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.01 ^d	0.74 ± 0.00 ^c	1.14 ± 0.06 ^a	1.46 ± 0.06 ^a	1.21 ± 0.03 ^b	0.72 ± 0.04 ^c	1.45 ± 0.10 ^a
Arg	2.84 ± 0.03 ^a	1.98 ± 0.01 ^b	1.84 ± 0.03 ^b	2.11 ± 0.12 ^b	1.09 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.00 ^d	1.00 ± 0.04 ^c	1.22 ± 0.00 ^a	2.70 ± 0.04 ^b	2.46 ± 0.04 ^b	1.85 ± 0.02 ^c	3.09 ± 0.29 ^a
Ser	1.76 ± 0.02 ^a	1.14 ± 0.03 ^d	1.37 ± 0.02 ^c	1.62 ± 0.02 ^b	1.46 ± 0.06 ^b	0.27 ± 0.02 ^c	1.38 ± 0.04 ^b	1.91 ± 0.06 ^a	2.69 ± 0.08 ^b	2.18 ± 0.00 ^c	1.94 ± 0.00 ^d	2.93 ± 0.12 ^a
Asp	3.67 ± 0.06 ^b	2.99 ± 0.07 ^d	3.48 ± 0.04 ^c	3.93 ± 0.10 ^a	2.24 ± 0.13 ^b	0.47 ± 0.00 ^c	2.44 ± 0.15 ^b	2.85 ± 0.07 ^a	3.25 ± 0.01 ^d	4.32 ± 0.03 ^b	3.64 ± 0.09 ^c	5.14 ± 0.01 ^a
Glu	6.58 ± 0.02 ^b	4.94 ± 0.20 ^d	5.42 ± 0.06 ^c	7.15 ± 0.21 ^a	6.15 ± 0.20 ^b	0.99 ± 0.03 ^d	5.16 ± 0.23 ^c	6.66 ± 0.15 ^a	11.19 ± 1.10 ^a	8.15 ± 0.26 ^b	5.48 ± 0.02 ^c	9.22 ± 0.50 ^b
Thr	1.54 ± 0.01 ^c	1.38 ± 0.01 ^c	1.74 ± 0.08 ^b	2.06 ± 0.13 ^a	1.20 ± 0.03 ^c	0.32 ± 0.02 ^d	1.36 ± 0.08 ^b	1.78 ± 0.00 ^a	2.16 ± 0.03 ^{bc}	2.27 ± 0.07 ^b	1.77 ± 0.03 ^c	3.20 ± 0.36 ^a
Gly	1.85 ± 0.02 ^c	1.51 ± 0.03 ^d	2.12 ± 0.03 ^a	1.97 ± 0.03 ^b	1.09 ± 0.01 ^b	0.34 ± 0.00 ^c	1.39 ± 0.16 ^a	1.49 ± 0.03 ^a	2.34 ± 0.04 ^{bc}	2.60 ± 0.20 ^{ab}	2.05 ± 0.02 ^c	2.74 ± 0.18 ^a
Tyr	0.00 ± 0.00 ^c	0.32 ± 0.02 ^{ab}	0.29 ± 0.04 ^b	0.45 ± 0.14 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.09 ± 0.02 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.28 ± 0.07 ^b	0.25 ± 0.04 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.59 ± 0.06 ^a
Ala	2.40 ± 0.08 ^a	1.89 ± 0.02 ^b	2.36 ± 0.03 ^a	2.44 ± 0.04 ^a	2.41 ± 0.08 ^b	0.44 ± 0.00 ^c	2.20 ± 0.18 ^b	2.80 ± 0.03 ^a	2.28 ± 0.03 ^c	2.74 ± 0.13 ^b	2.36 ± 0.02 ^c	3.09 ± 0.22 ^a
Met	0.05 ± 0.01 ^d	0.12 ± 0.00 ^c	0.36 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.02 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.99 ± 0.10 ^a	0.22 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.03 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Val	2.67 ± 0.05 ^a	2.06 ± 0.05 ^b	2.49 ± 0.00 ^a	2.61 ± 0.15 ^a	1.86 ± 0.04 ^c	0.37 ± 0.00 ^d	2.13 ± 0.06 ^b	2.27 ± 0.01 ^a	2.76 ± 0.10 ^{bc}	2.81 ± 0.05 ^b	2.56 ± 0.00 ^c	3.28 ± 0.08 ^a
Phe	2.15 ± 0.09 ^a	1.70 ± 0.00 ^b	1.97 ± 0.04 ^a	2.07 ± 0.12 ^a	1.84 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.01 ^c	1.80 ± 0.05 ^b	2.09 ± 0.00 ^a	2.75 ± 0.06 ^a	2.26 ± 0.12 ^b	2.05 ± 0.00 ^b	2.80 ± 0.07 ^a
Leu + Ile	5.44 ± 0.11 ^a	4.21 ± 0.10 ^b	5.10 ± 0.05 ^a	5.32 ± 0.28 ^a	5.90 ± 0.11 ^b	0.98 ± 0.02 ^d	5.62 ± 0.16 ^c	6.41 ± 0.07 ^a	6.29 ± 0.30 ^b	6.01 ± 0.10 ^b	5.26 ± 0.01 ^c	6.98 ± 0.37 ^a
Lys	8.37 ± 0.88 ^a	7.11 ± 0.80 ^a	7.64 ± 1.03 ^a	8.97 ± 1.24 ^a	7.70 ± 0.40 ^a	2.02 ± 0.43 ^c	5.29 ± 0.15 ^b	5.57 ± 0.23 ^b	9.27 ± 1.34 ^b	7.98 ± 0.13 ^{bc}	5.95 ± 0.74 ^c	13.84 ± 0.68 ^a
Total	40.31 ± 1.48 ^{ab}	32.02 ± 1.32 ^c	36.92 ± 1.22 ^b	41.85 ± 2.35 ^a	33.96 ± 1.02 ^b	6.90 ± 0.50 ^d	31.61 ± 0.36 ^c	36.41 ± 0.73 ^a	49.57 ± 2.97 ^b	45.35 ± 1.06 ^b	35.63 ± 0.62 ^c	58.34 ± 2.07 ^a

¹Grain non-cultivated with macrofungi mycelia; ²Sample collected 15 days after total colonization.

Aa: Amino acid; His: histidine; Arg: arginine; Ser: serine; Asp: Aspartic acid; Glu: Glutamic acid; Thr: threonine; Gly: glycine; Tyr: Tyrosine; Ala: alanine; Met: methionine; Val: Valine; Phe: phenylalanine; Leu + Ile: Leucine + Isoleucine; Lys: Lysine.

^{a,b,c} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same row, for the same grain, indicate that there is no significant difference at 5 % (p < 0.05) in the parameter evaluated.

Table 3. Physicochemical properties of grains flours control and colonized by mushrooms mycelia (*Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus*).

Grain	Macrofungi	pH	A_w	Color	WAI	FAC
				mycelia	TCD*	(g/g)
Brown rice	Control ¹	6.22 ± 0.01^a	0.21 ± 0.00^d	-	3.40 ± 0.03^a	60.2 ± 8.8^{ab}
	<i>A. blazei</i> ²	4.90 ± 0.01^c	0.32 ± 0.00^c	8.98 ± 2.41^b	2.72 ± 0.03^b	54.4 ± 1.6^{ab}
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	4.64 ± 0.03^d	0.39 ± 0.00^a	8.50 ± 2.18^b	2.80 ± 0.17^b	47.4 ± 3.9^b
	<i>P. albidus</i> ²	5.05 ± 0.02^b	0.35 ± 0.00^b	20.58 ± 1.53^a	3.17 ± 0.03^a	61.4 ± 2.8^a
Corn	Control ¹	5.74 ± 0.01^a	0.15 ± 0.00^d	-	3.06 ± 0.01^a	57.0 ± 4.5^a
	<i>A. blazei</i> ²	5.32 ± 0.02^b	0.37 ± 0.00^c	31.80 ± 0.75^b	2.84 ± 0.06^b	57.4 ± 2.9^a
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	4.84 ± 0.08^c	0.51 ± 0.00^a	37.92 ± 1.65^a	2.79 ± 0.04^b	51.6 ± 2.0^a
	<i>P. albidus</i> ²	4.72 ± 0.12^c	0.47 ± 0.00^b	16.46 ± 1.92^c	3.17 ± 0.03^a	56.9 ± 1.6^a
Wheat	Control ¹	6.20 ± 0.01^b	0.11 ± 0.00^d	-	3.27 ± 0.03^a	61.5 ± 3.5^a
	<i>A. blazei</i> ²	5.42 ± 0.01^d	0.33 ± 0.00^c	11.08 ± 1.48^b	3.00 ± 0.03^b	51.6 ± 2.6^{ab}
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	6.45 ± 0.01^a	0.38 ± 0.00^a	9.63 ± 1.52^b	2.80 ± 0.06^c	48.0 ± 1.4^b
	<i>P. albidus</i> ²	5.56 ± 0.06^c	0.34 ± 0.00^b	17.51 ± 0.79^a	3.07 ± 0.04^b	58.4 ± 5.3^a

A_w : Water activity; TCD*: Total color difference; WAI: Water absorption capacity; FAC: Fat absorption capacity.

¹Grain non-cultivated with macrofungi mycelia; ²Sample collected 15 days after total colonization.

^{a,b,c,d} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same grain, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

Table 4. Antioxidant profile and functional components of grains flours control and colonized by mushrooms mycelia (*Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus*).

Grain	Macrofungi	Total phenolic*	DPPH**	ABTS**	Lovastatin	Ergothioneine
	mycelia	(mgGAE/g)	(μmol TEAC/g)	(μmol TEAC/g)	(μg/100g)	(μg/100g)
Brown rice	Control ¹	0.12 ± 0.00 ^d	1.53 ± 0.11 ^d	0.47 ± 0.07 ^d	n.d.	n.d.
	<i>A. blazei</i> ²	1.36 ± 0.07 ^a	8.75 ± 0.06 ^a	11.64 ± 0.25 ^a	n.d.	n.d.
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	0.96 ± 0.01 ^b	8.13 ± 0.07 ^b	8.70 ± 0.39 ^b	n.d.	n.d.
	<i>P. albidus</i> ²	0.44 ± 0.01 ^c	5.52 ± 0.10 ^c	3.70 ± 0.13 ^c	n.d.	15.96 ± 0.10 ^a
Corn	Control ¹	0.08 ± 0.02 ^d	0.83 ± 0.08 ^d	0.30 ± 0.05 ^d	n.d.	n.d.
	<i>A. blazei</i> ²	1.16 ± 0.03 ^b	8.31 ± 0.03 ^b	11.46 ± 0.53 ^b	n.d.	n.d.
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	2.38 ± 0.05 ^a	8.90 ± 0.02 ^a	16.52 ± 1.03 ^a	n.d.	n.d.
	<i>P. albidus</i> ²	0.42 ± 0.02 ^c	4.26 ± 0.02 ^c	2.45 ± 0.16 ^c	n.d.	1.27 ± 0.10 ^a
Wheat	Control ¹	0.17 ± 0.03 ^d	1.84 ± 0.08 ^d	0.44 ± 0.20 ^d	n.d.	n.d.
	<i>A. blazei</i> ²	0.92 ± 0.02 ^b	8.36 ± 0.04 ^a	12.60 ± 0.39 ^b	0.10 ± 0.01 ^b	n.d.
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	0.98 ± 0.03 ^a	7.88 ± 0.07 ^b	16.04 ± 0.17 ^a	0.66 ± 0.02 ^a	n.d.
	<i>P. albidus</i> ²	0.55 ± 0.01 ^c	7.32 ± 0.24 ^c	6.10 ± 0.55 ^c	n.d.	26.01 ± 0.12 ^a

^{a,b,c,d} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same grain, indicate that there is no significant difference at 5 % (p < 0.05) in the parameter evaluated.

* Total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents/g of sample; ** DPPH and ABTS scavenging was expresses as μmol of Trolox equivalents antioxidant activity/g of sample;

¹Grain non-cultivated with macrofungi mycelia; ²Sample collected 15 days after total colonization.

n.d.: not detected.

Table 5. Enzyme inhibitory activities of grain flours control and colonized by mushrooms mycelia (*Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus*).

Grain	Macrofungi mycelia	Lipase inhibition (%)	α -glycosidase inhibition (%)
Brown rice	Control ¹	70.1 ± 2.6 ^a	0.0 ± 0.0 ^c
	<i>A. blazei</i> ²	51.9 ± 1.2 ^c	98.2 ± 0.4 ^a
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	60.0 ± 3.2 ^b	95.7 ± 0.4 ^b
	<i>P. albidus</i> ²	11.5 ± 3.9 ^d	97.3 ± 0.6 ^a
Corn	Control ¹	44.7 ± 4.6 ^a	0.0 ± 0.0 ^d
	<i>A. blazei</i> ²	28.9 ± 2.4 ^b	78.4 ± 2.7 ^b
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	20.6 ± 3.5 ^{b,c}	61.5 ± 0.9 ^c
	<i>P. albidus</i> ²	17.9 ± 2.3 ^c	96.4 ± 0.3 ^a
Wheat	Control ¹	14.5 ± 4.3 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
	<i>A. blazei</i> ²	45.5 ± 2.9 ^b	98.5 ± 1.0 ^a
	<i>A. fuscosuccinea</i> ²	20.3 ± 2.6 ^c	53.5 ± 1.9 ^b
	<i>P. albidus</i> ²	74.5 ± 0.9 ^a	98.2 ± 0.5 ^a
Orlistat		100.0 ± 0.0	-
Acarbose		-	32.5 ± 1.0

^{a,b,c,d} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same grain, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

¹Grain non-cultivated with macrofungi mycelia; ²Sample collected 15 days after total colonization.

Supplementary material

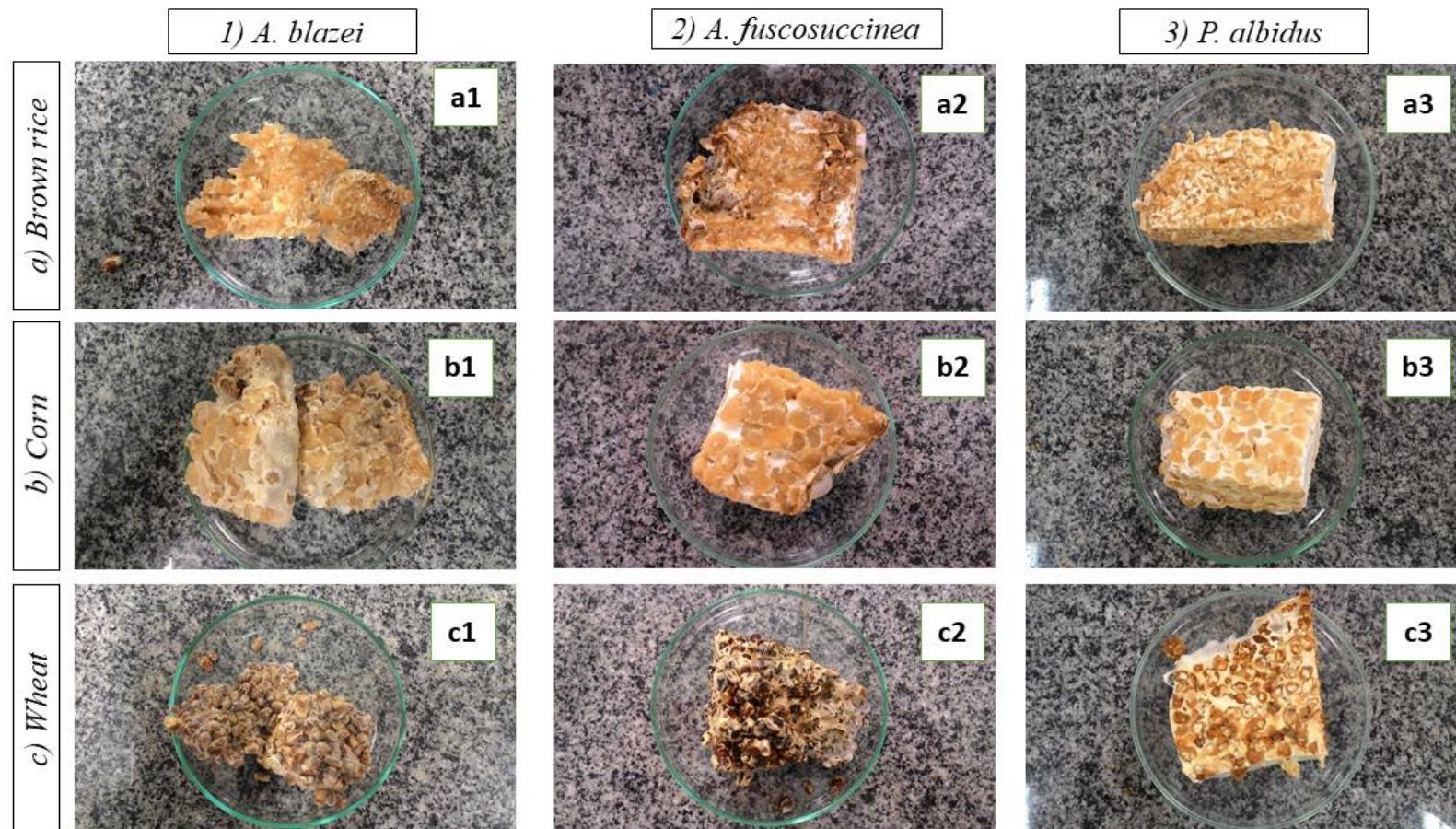


Figure S1. Grains colonized by macrofungi mycelia in solid-state cultivation.

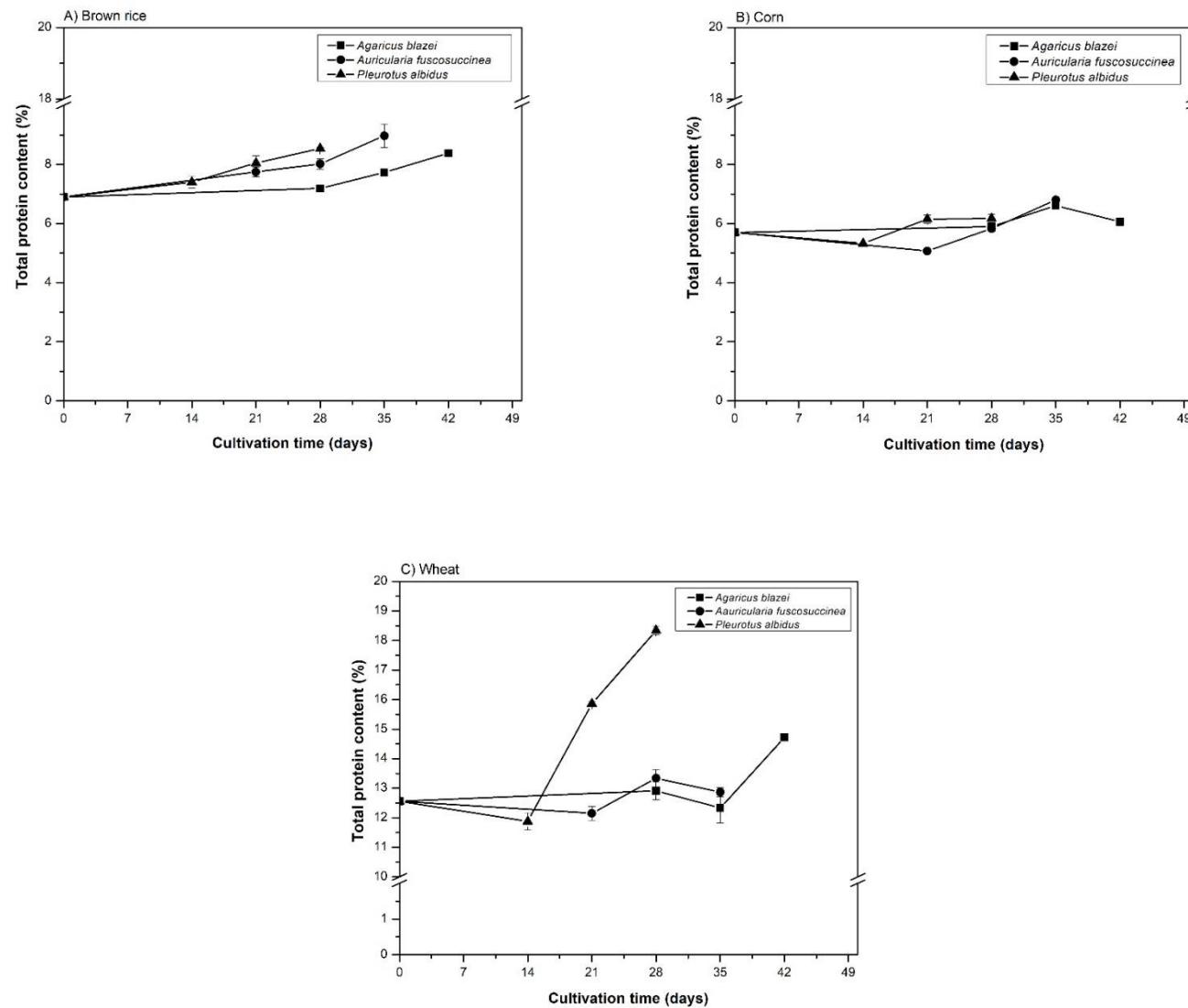


Figure S2. Total protein content (%) determined of flours obtained from macrofungi mycelia colonized grains in solid-state cultivation: brown rice (A); corn (B); wheat (C).

4.2 Capítulo 2

Production of edible fungi mycoprotein using agroindustrial wastes: influence on nutritional, chemical and biological properties

Fernanda Stoffel^{1,2*}, Weslei de Oliveira Santana¹, Jean Guilherme Novello Gregolon³, Tarso B. Ledur Kist³, Roselei Claudete Fontana¹, Marli Camassola¹

¹ Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

² Area of Production, Science and Food Technology, Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), São Miguel do Oeste, SC, Brazil.

³ Laboratory of Methods, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.

***Corresponding author:**

Mailing address: Rua 22 de abril, s/n, bairro São Luiz, São Miguel do Oeste/SC, Brazil,

CEP 89900-000

E-mail address: fernanda.stoffel@ifsc.edu.br

Phone/Fax: +55 49 3631-0400

1 **Abstract**

2 The production of *Agaricus blazei*, *Auricularia fuscosuccinea* and *Pleurotus albidus*
3 mycoproteins in malt (BSG) and grape (GB) by solid-state cultivation was studied, including
4 an investigation of their nutritional value and biological activity. The production of *P. albidus*
5 mycoprotein in BSG resulted in the highest increase of protein (42.0%) and total amino acids
6 (20.2%), with the highest values of ergosterol ($0.39 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1}$) and mycelial biomass
7 ($125.60 \pm 3.30 \text{ mg.g}^{-1}$). The *A. fuscosuccinea* mycoprotein in BSG resulted in the highest
8 increase in phenolic content (51.4%) and higher antioxidant activity. Using GB, the *P. albidus*
9 mycoprotein increased the proteins (23.9%) and reduced total fats (15.5%) and phenolics
10 (77.0%). Capacity of α -glycosidase inhibition was observed in the *P. albidus* and *A. blazei*
11 mycoproteins produced in BSG (inhibition greater than 98%). Mycoproteins produced in BSG
12 and GB could be a strategy to increase the nutritional value and biological activity of these
13 agroindustrial residues.

14

15 **Keywords:** macrofungi, solid-state cultivation, brewer spent grain, grape bagasse, enzyme
16 inhibition.

17

18 **1. Introduction**

19 According to estimates by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
20 (2017), it will be necessary to double the world food production from 2012 until the middle of
21 the century, when the world population could reach 9.8 billion inhabitants (FAO, 2017).
22 Because of the environmental impacts caused by livestock and issues related to animal welfare,
23 the meat industry will not be able to respond to this increase in demand with the use of more
24 resources (Bonny et al., 2015).

25 Fungal protein or mycoprotein are terms that refer to proteins derived from the cultivation
26 processes of fungi (yeast or filamentous) in plant biomass. They are considered alternative
27 sources of protein, which can be used for human food or animal nutrition (Moreira and Furlong,
28 2007). The concept of mycoproteins involves other nutritional components besides proteins,
29 such as amino acids, fats, carbohydrates, vitamins and minerals (Zepka et al., 2010).

30 An alternative to the production of mycoprotein is the use of agroindustrial residues as raw
31 material to obtain fungi mycelia in solid-state cultivation (SSC). Thus, in addition to obtaining
32 an alternative protein source to animal protein, it is possible to add value to the substrate through
33 its nutritional enrichment (Canedo et al., 2016; Cooray and Chen, 2018; Moreira and Furlong,
34 2007).

35 Brewer spent grain (BSG) is the main solid waste generated by the brewing industry, accounting
36 for 85% of all solid waste (Mussatto et al., 2006). Considering the growth of the craft beer
37 sector on the world stage, and that a volume of 20 kg of wet BSG is generated for every 100
38 litres of beer produced, there is an estimated annual average generation of more than 30 million
39 tons of BSG in the world (Lynch et al., 2016). Generally, BSG is used for ruminant feed
40 (Canedo et al., 2016; Mussatto et al., 2006), but it can also be used as a raw material for fungi
41 cultivation (Cooray and Chen, 2018; Gregori et al., 2008).

42 The grape is one of the most cultivated fruits in the world. During industrial processing, waste
43 is generated, consisting of bark, seeds and stalk, denominated grape bagasse, rich in
44 lignocellulosic compounds, sugars, and phenolic compounds, among others. Grape bagasse is
45 a promising raw material for the extraction of industrial substances of interest or for renewable
46 energy generation, however, the technologies to exploit this potential are still not widely
47 adopted in viticulture (Muhlack et al., 2018). Different winery wastes have been previously
48 proposed for producing substrates for use in the cultivation of the most widely consumed edible
49 mushrooms (Pardo et al., 2007, 2005, Petre et al., 2015, 2005; Sánchez et al., 2002).

50 Different species of edible fungi can be used in bioprocesses, with the objective of adding value
51 to the bagasse or wastes through the development of mycoprotein (Canedo et al., 2016; Cooray
52 and Chen, 2018). The edible macrofungi, popularly known as mushrooms, are appreciated for
53 their sensorial and nutritional characteristics, containing high levels of dietary fibre and proteins
54 and a low percentage of total fats (Perera and Li, 2011). Also, there has been interest in edible
55 macrofungi due to the biological activity of their secondary metabolites, with their use
56 associated with the promotion of health (Gambato et al., 2018; Zhai et al., 2015).

57 However, factors such as the period required for production are onerous and limit the
58 consumption of mushrooms, especially in Western countries with no tradition involving the use
59 of mushrooms. Thus, the use of macrofungi in the form of mycelia is an alternative, since it is
60 quicker to obtain them (Souilem et al., 2017). Both the mycelia and the cultivation media used
61 for their production may represent a source of mycoproteins (Moreira and Furlong, 2007) and
62 bioactive compounds, such as phenolic acids and ergosterol, both with antioxidant activity
63 (Souilem et al., 2017).

64 The genus *Pleurotus*, popularly known as oyster mushroom, has several edible species that are
65 among the most commercially-produced mushrooms in the world. It is appreciated for its
66 sensorial, nutritional and medicinal characteristics (Lechner and Albertó, 2011). *Pleurotus*
67 *albidus* (Berk.) Pegler occurs in South and Central America, being recently isolated and
68 identified in Brazil, but its studies are still fragmented and scarce (Menolli et al., 2014). It is a
69 species with easy cultivation in agroindustrial residues, from which several compounds with
70 biological activity can be extracted, such as glucans with immunomodulatory effects (Castro-
71 Alves et al., 2017) and phenolic compounds with antioxidant activity (Gambato et al., 2018).

72 Macrofungi of the *Auricularia* genus, known as shell or ear mushroom, have been used for
73 hundreds of years in traditional Chinese medicine for food and medicinal purposes (Souilem et

74 al., 2017). *Auricularia fuscosuccinea* (Mont.) Henn is one of the species of the genus that has
75 recently been reported in Brazil (Alvarenga et al., 2015).

76 *Agaricus blazei* Murrill (syn. *Agaricus subrufescens* Peck), known as the sun mushroom, is a
77 native species of Brazil. It is widely consumed due to the potential benefits of its
78 polysaccharides (beta-glucans), including reports of immunomodulatory and anticancer
79 activities (Kang et al., 2017; Zhai et al., 2015).

80 BSG (Wang et al., 2001) and GB (Gambato et al., 2018; Sánchez et al., 2002) were explored
81 for the production of mushrooms, with a particular study of the production parameters, chemical
82 analysis of the mushrooms and the characterisation of the spent cultivation material after the
83 collection of fruiting bodies. The present research has as a differential the cultivation of edible
84 macrofungi mycelia using BSG and GB by SSC, without the induction of fruiting bodies, as a
85 strategy to add value to waste through the development of fungal biomass (mycoprotein) and
86 the production of bioactive compounds, with the total utilisation of the colonised material in
87 the form of a flour, with the potential for its use in feed.

88 In this context, the objective of this study was to obtain and characterise flours containing the
89 mycoprotein of edible macrofungi (*P. albidus*, *A. fuscosuccinea* or *A. blazei*) produced from
90 BSG and GB, with regards to their nutritional composition, bioactive compounds (ergosterol,
91 lovastatin and ergothioneine), biological activity (antioxidant and inhibition of metabolic
92 enzymes *in vitro*), and physical and physicochemical properties.

93

94 **2. Material and methods**

95 **2.1 Raw material**

96 Agroindustrial residues were used: brewer spent grain (BSG) and grape bagasse (GB). The BSG
97 (moisture content determined by gravity of $75.0 \pm 1.5\%$ (w/w)) was donated by the craft
98 brewery Vitrola (Nova Petrópolis, RS, Brazil), immediately after the production of an India

99 pale ale (IPA)-style beer. The GB, from the processing of grape juice (*Vitis labruca* var. Bordô,
100 Safra 2018), was donated by Tecnovin (Bento Gonçalves, RS, Brazil), containing a moisture
101 content determined by a gravity of $69.60 \pm 2.30\%$ (w/w), and composed of bark (64%), seeds
102 (35%) and stalks (1%). BSG and GB were stored in poly(ethylene) packages, under
103 refrigeration (5 ± 2 °C), and used as raw material, without any supplementation, to produce
104 macrofungal mycelia in solid-state cultivation (SSC). Raw material (200 g) was distributed in
105 glass flasks, separately, closed and autoclaved at 1 atm for 2 h. After 24 hours, the autoclaving
106 process was repeated.

107

108 **2.2 Macrofungi**

109 Three macrofungi, belonging to the collection of the Laboratory of Enzymes and Biomasses
110 (LEB) of the Biotechnology Institute of the University of Caxias do Sul (UCS) (Caxias do Sul,
111 RS, Brazil) were used: the commercial strain *Agaricus blazei* Murrill (Brasmicel, Suzano, SP,
112 Brazil); and the wild strains *Pleurotus albidus* 88F.13 and *Auricularia fuscosuccinea* 78F.3,
113 identified by molecular analysis and isolated from Mata Atlântica (São Francisco de Paula, RS,
114 Brazil) under the authorisation of the Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable
115 Resources (IBAMA) nº 02001.007656/2012-11 and deposited into the mycological collection
116 of UCS Herbarium under numbers MIUCS 1586 and MIUCS 1577, respectively. The
117 macrofungal mycelia were kept in potato agar dextrose medium (PDA; Himedia®, India) at 4
118 °C. The inoculum for SSC was obtained by transferring 1 cm² of mycelium to Petri dishes (200
119 mm diameter) with sterile PDA medium, and incubation at 28 ± 1 °C for 15 to 20 days, until
120 complete colonisation.

121

122 **2.3 Solid-state cultivation and mycoprotein flours**

123 Solid-state cultivation (SSC) was conducted according to the methodology proposed by Kang
124 et al. (2017) and Zhai et al. (2015), with modifications. After cooling, each flask containing
125 sterile material was inoculated with the contents of half of a Petri dish (200 mm) with mycelia
126 of the respective macrofungi. The flasks were then covered with a layer of sterile gauze and
127 cotton, and incubated at 28 ± 2 °C until complete colonisation. After colonisation, the total
128 contents of the flasks (bagasse + mycelia) were collected, manually homogenised, dried
129 (Medclave, Brazil) at 60 ± 2 °C for 24 h, ground in a Willey-type knife mill (Solab, Brazil) and
130 sieved to obtain mycoprotein or colonised waste flours, which were kept away from moisture
131 and light in polyethylene packages. Uninoculated wastes (control) were processed in the same
132 way to produce the control flours.

133

134 **2.4 Ergosterol and the indirect determination of mycelial growth**

135 The extraction and quantification of ergosterol was performed as an indirect estimate of
136 mycelial growth on BSG and GB. The method for extracting ergosterol was based on the
137 literature (Heleno et al., 2016; Souilem et al., 2017). Briefly, 0.6 g of the flour sample was
138 extracted with 6 mL of methanol; this was stirred for 10 s in vortex, every 15 min, for 1 h at 24
139 °C, followed by 5 min in an ultrasonic bath (200 W, 40 kHz, 24 °C, Ultronique, Brazil),
140 centrifuged (3220 g, 15 min, 4° C, Eppendorf 5840 R, Germany) and filtered on 0.2-µm pore
141 filters. Then, 20 µL of the sample was analysed using the HPLC system (Shimadzu, Quioto,
142 Japan), with a UV-Vis detector and Inertsil ODS-3 reverse phase column (250 x 4.6 mm and 5
143 µm particle size; GL Science, Tokyo, Japan) at 35 °C, with mobile phase acetonitrile/methanol
144 (70:30, v/v), a flow rate of 1 mL/min and detection at 282 nm (Barreira et al., 2014).
145 Identification of ergosterol was based on comparison of standard retention times (Sigma-
146 Aldrich E6510, purity ≥ 75%) and the samples and quantification was performed by comparing
147 the peak areas of the samples with the areas of the standard external curve (0.004 - 1 mg / mL).

148 For the indirect estimation of cell growth, a standard curve (between 1 and 50 mg) was obtained
149 with mycelium from each macrofungi, after which the amount of ergosterol present in the
150 mycelium was correlated with the content present in the solid cultivation samples.

151

152 **2.5 Nutritional characterisation of mycoprotein**

153 *2.5.1 Proximal composition*

154 The composition of macronutrients was evaluated by analyses of the proximal composition.
155 Moisture (method 935.29) was determined at 105 °C until constant weight. Ash content (method
156 923.03) was quantified by the incineration of the sample in muffle oven at 550 °C for 6 h. Fat
157 (method 920.85) was determined by Soxhlet, with solvent n-hexane for 6 h, crude protein was
158 determined by Kjeldahl (method 920.87) and the gravimetric-enzymatic method (method
159 991.43) was used to determine total dietary fibre (AOAC, 2016). Carbohydrates were
160 determined by the difference Canedo et al. (2016), as follows: carbohydrate (g/100 g) = 100 –
161 (moisture + ash + fat + crude protein + total dietary fibre).

162

163 *2.5.2 Analysis of amino acids*

164 Amino acid analysis was performed with the Laboratory of Methods, Institute of Biosciences,
165 Federal University of Rio Grande do Sul, according to the methodologies used in previous
166 studies (Siri et al., 2006). Samples were hydrolysed with HCl solution (6 mol.L⁻¹) at 110 °C for
167 24 h. After NAD (Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde) derivatisation at a pH of 9, the amino
168 acids were identified and quantified in the Biotech model 525 HPLC system (Hallertau,
169 Germany), with the detection system consisting of a LIF detector of the capillary
170 electrophoresis system model PNA8C (Rodrigues et al., 2018). Chromatographic separation
171 was performed on a Supercosil LC-18-DB column (250 x 4.6 mm, particle size 5 µm; Supelco
172 Analytical, Bellefonte, USA), at 40 °C and a flow rate of 1.0 mL/min; the mobile phases were

173 water acidified with trifluoroacetic acid (TFA), pH 2 (mobile phase A) and acetonitrile (mobile
174 phase B). The gradient was programmed as follows: 0–12 min, 30% B; 12–14 min, 30–35% B;
175 14–40 min, 35–80% B; 40–41 min, 80–30% B. The results are expressed in mg of amino acids
176 per g of dry flour sample.

177

178 **2.6 Physical and physico-chemical properties of mycoprotein**

179 *2.6.1 pH and water activity (aw)*

180 The pH was analysed from 1 g samples of flour, mixed with 10 mL of deionised water. After
181 30 minutes, the pH was measured in a previously-calibrated potentiometer. Water activity (a_w)
182 was determined at 25 °C in LabMaster-AW (Novasina, Switzerland).

183

184 *2.6.2 Colour*

185 The colour was evaluated by reading the parameters defined by the Commission Internationale
186 de l'Eclairage (CIE; L* a* b*) in a digital colorimeter with a diffuse sphere d/0°, illuminant D65
187 (Delta Color, Delta Vista model, Brazil), where L* corresponds to lightness, a* is related to the
188 green and red colour dimensions and b* is related to the blue and yellow colour dimensions.
189 Differences in the colour parameters between the samples of mycoprotein flours and the control
190 flours were identified, and the results were expressed as the total colour difference (TCD*), as
191 follows: $TCD^* = [(L^* \text{ difference value})^2 + (a^* \text{ difference value })^2 + (b^* \text{ difference value})^2]^{1/2}$.

192

193 *2.6.3 Technological properties of hydration and fat absorption*

194 The following properties were analysed: water absorption index (WAI) and water solubility
195 index (WSI; Anderson, 1982); water holding capacity (WHC) (Raghavendra et al., 2004) and
196 fat absorption capacity (FAC; Lin et al., 1974).

197

198 **2.7 Phenolic content and antioxidant activity *in vitro* of mycoprotein**

199 *2.7.1 Extraction of phenolic compounds*

200 The extractions were performed using 80% (v/v) ethanolic solution at a ratio of 1:10 for the
201 sample: solvent for 1 h at 24 °C (Handa et al., 2016).

202

203 *2.7.2 Phenolic content*

204 The Folin–Ciocalteu colorimetric method was used to measure the phenolic content of extracts
205 (Singleton and Rossi Jr., 1965). The phenolic content was expressed in mg of gallic acid
206 equivalent per gram of sample (mg EAG/g), using the calibration curve of gallic acid (0.004 –
207 0.04 mg/mL).

208

209 *2.7.3 DPPH· radical scavenging capacity*

210 A DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was carried out based on a previously-
211 described method (Gambato et al., 2018). The results were expressed as Trolox (6-hydroxy-
212 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalent micromols ($\mu\text{mol TEAC/g}$) using a
213 Trolox calibration curve (0.0 – 0.5 $\mu\text{mol/mL}$).

214

215 *2.7.4 ABTS⁺radical scavenging capacity*

216 For the ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assay, the method
217 described by Hand et al. (2016) was used. The results were expressed as Trolox (6-hydroxy-
218 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalent micromols ($\mu\text{mol TEAC/g}$) using a
219 Trolox calibration curve (0.0 – 3.0 $\mu\text{mol/mL}$).

220

221 **2.8 Extraction and quantification of ergothioneine and lovastatin of mycoprotein**

222 *2.8.1 Ergothioneine determination*

223 Ergothioneine was extracted from the samples using an ethanolic solution (10 mmol/L of
224 ditiotreitol (DTT), 100 µmol/L of betaine and 100 µMol/L of 2-Mercapto-1-metilimidazol
225 (MMI) in 70% ethanol; the identification and quantification of the analyte was performed in
226 the HPLC system (Shimadzu, Quioto, Japan), with a UV-Vis detector (254 nm) and column C
227 18 (Discovery®; 150 × 4.6 mm and 5 µm particle size) (Gambato et al., 2018). The
228 quantification of ergothioneine was based on the comparison of the peak areas of the samples
229 with the areas of the peaks of standard solutions with known concentrations (Sigma E7521;
230 0.006–0.1 µg/mL).

231

232 *2.8.2 Lovastatin determination*

233 The extraction of the samples for the quantification of lovastatin was carried out with solvent
234 methanol P.A. (Sorrentino et al., 2010). The HPLC System (Shimadzu, Quioto, Japan), with a
235 UV-Vis detector (254 nm) and C 18 (Discovery®; 150 × 4.6 mm and 5 µm particle size), was
236 used for the identification and quantification of lovastatin (Shen et al., 1996), by comparison of
237 the peak areas of the samples with the areas of the peaks of standard solutions with known
238 concentrations (Sigma PHR1285; 0.001–0.015 µg/mL).

239

240 **2.9 Enzymatic inhibition *in vitro* of mycoprotein**

241 The phenolic extracts obtained from the samples were evaluated for their enzymatic inhibition
242 capacity against pancreatic lipase, α-glucosidase and α-amylase enzymes.

243

244 *2.9.1 Lipase inhibition assay*

245 To test the lipase inhibition capacity, a swine pancreatic lipase a type II (Sigma; 0.2 mg/mL)
246 inhibition assay was performed using a colorimetric method with 1-2-o-dilauryl-rac-glycero-3-
247 glutaric acid (6-methylresorufin)-ester (DGGR) as a substrate of the enzymatic reaction

248 (Wilcox et al., 2014). The percentage of lipase inhibition was obtained by the absorbance
249 difference of the readings at two reaction times, at 90 and 180 s ($\Delta A = A_{180s} - A_{90s}$), as follows:
250 Pancreatic lipase inhibition (%) = $[(\Delta_{Aec} - \Delta_{As}) / \Delta_{Aec}] \times 100$, where Δ_{Aec} and Δ_{As} are defined as
251 the absorbance difference for the enzyme control and samples, at 570 nm.

252

253 *2.9.2 α -glucosidase inhibition assay*

254 To evaluate the inhibition ability of *Saccharomyces cerevisiae* α -glucosidase (Sigma; 0.1
255 mg/mL), p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside was used as a substrate (de Camargo et al., 2016).
256 The percent inhibition of α -glycosidase activity was determined as follows: α -glucosidase
257 inhibition (%) = $[(Abs_{control} - Abs_{sample}) / (Abs_{control})] \times 100$.

258

259 *2.9.3 α -amylase inhibition*

260 The modified Caraway method was used to evaluate the percentage of inhibition of the enzyme
261 α -amylase of porcine pancreas type VI-B (Sigma; 1 mg/mL) by sample extracts (Zengin et al.,
262 2014). The percent inhibition of α -amylase activity was calculated as follows: α -amylase
263 inhibition (%) = $[1 - (Abs_s - Abs_w) / (Abs_{c+} - Abs_{c-})] \times 100$, where Abs_s , Abs_w , Abs_{c+} , Abs_{c-} are
264 defined as the sample absorbance (with enzyme), the absorbance of white (sample without
265 enzyme), the absorbance of 100% enzyme activity (only enzyme, without inhibitor) and the
266 absorbance of 0% enzyme activity (only substrate without enzyme), respectively. The
267 absorbances were read at 660 nm.

268

269 **2.10 Statistical analyses**

270 Results are expressed as the mean value \pm standard deviation, obtained in triplicate. For the
271 analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p \leq 0.05$), Origin software version 8.1
272 (OriginLab) was used.

273

274 **3. Results and discussion**

275 **3.1 Mycelial growth**

276 The mycoprotein flours obtained in this study refer to the material resulting from the complete
277 mycelial colonisation of the cultivation media constituted by raw materials (BSG or GB) in
278 CES; that is, the agroindustrial residues colonised with the fungal biomass, which were dried
279 and ground. Cultivation of macrofungi in BSG was maintained until the complete colonisation
280 of the medium, which was 15 days for *P. albidus*, 21 days for *A. fuscouscinea* and 28 days for
281 *A. blazei*. When using GB, only the growth of *P. albidus* mycelium was observed, with
282 complete colonisation after 35 days. *A. fuscouscinea* and *A. blazei* did not grow on GB,
283 probably due to the pH value of the medium which was 3.6. After the colonisation period, cell
284 growth was indirectly determined considering the metabolite ergosterol.

285 Figure 1 shows the results of the ergosterol content and cell growth for *P. albidus*, *A.*
286 *fuscouscinea* and *A. blazei*. Only the samples in which mycelial growth occurred were
287 obtained and characterised. The results for the controls are not presented, since ergosterol was
288 not detected in these samples. The highest concentration of ergosterol (0.39 ± 0.01 mg/g) was
289 in the *P. albidus* mycoprotein flour produced in BSG (Figure 1 A).

290 Macrofungi produce ergosterol as primary sterol (Barreira et al., 2014; Héleno et al., 2016); it
291 is a compound of interest because, besides being considered in the indirect estimation of
292 mycelial biomass, it has antioxidant and antimicrobial activities in food (Corrêa et al., 2018).
293 The quantity of fungal biomass (mycelium) present in the mycoprotein flours were estimated
294 by the correlation between the fungal biomass obtained in the submerged culture and the
295 respective ergosterol concentration determined in a previous study by the group (unpublished
296 data). The *P. albidus* and *A. blazei* mycoproteins produced in BSG contained the highest

297 amounts of fungal biomass, equivalent to 125.60 ± 3.30 mg/g and 106.50 ± 13.40 mg/g,
298 respectively (Fig. 1B).

299

300 **3.2 Nutritional properties of mycoprotein**

301 The nutritional value of the mycoprotein flours was determined by analyses of the proximal
302 composition (Fig. 2A and B). There were significant increases in the amount of crude protein,
303 and in the present study, no nutritional supplementation was used in the cultivation medium.
304 With the use of BSG, the crude protein content increased from 15.9 ± 0.1 g/100 g (control) to
305 22.6 ± 0.02 , 20.5 ± 0.1 and 19.6 ± 0.2 g/100 g for the production of mycoproteins by *P. albidus*,
306 *A. fuscosuccinea* and *A. blazei*, respectively (Fig. 2A). In GB, the protein content increased
307 from 10.51 ± 0.26 g/100 g (control) to 13.03 ± 0.03 g/100 g with the production of *P. albidus*
308 mycoprotein (Fig. 2B).

309 The fungi used in this work, belonging to the group of white rot fungi, have the characteristic
310 of depolymerising the components of the plant cell wall and assimilating nitrogenous
311 compounds from the substrates, in this case BSG or GB, to provoke an alteration in protein
312 solubility and nitrogen concentration (Nayan et al., 2018b). It is suggested that this is the
313 explanation for the protein enrichment reported in the present work. However, other hypotheses
314 can be considered, such as the macrofungi being able to fix the nitrogen of the atmosphere
315 (Jayasinghearachchi and Seneviratne, 2004). According to the same authors, for this to occur,
316 symbiotic interactions with nitrogen-fixing bacteria or mycorrhizae are required. Considering
317 that the raw materials were sterilised, there would be no bacteria to perform the role of nitrogen
318 fixation unless they are present in the isolated fungi. However, this research wasn't part of the
319 objectives of the present study. Thus, more studies are needed to elucidate the protein
320 enrichment of plant biomass by CES with macrofungi.

321 The protein enrichment of agroindustrial waste from breweries or vitiviniculture by the
322 development of fungi in CES has been previously reported. Sánchez et al. (2002), when
323 studying the biodegradation of viticulture residues, observed a 34.3% increase in the protein
324 content of GB in the CES of *Pleurotus ostreatus* CCMC H-041. In a study by Canedo et al.
325 (2016), the protein content of BSG doubled with the development of *Rhizophorus oligosporus* in
326 CES.

327 There were significant differences in the total dietary fibre content of the mycoprotein flours in
328 relation to the respective controls. In BSG, increases of 38.7, 29.8 and 18.9% were verified in
329 the production of *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* and *A. blazei* mycoprotein, respectively (Fig.
330 2A). Increases in the total dietary fibre content may be associated with the growth of mycelia
331 in BSG, since fungal biomass is composed of polysaccharides such as glucans, which are
332 considered to be dietary fibres (Castro-Alves et al., 2017; Kang et al., 2017). In GB with *P.*
333 *albidus* mycoprotein, although mycelial growth was observed, the total dietary fibre content
334 decreased by 3.4% (Fig. 2B). This may be associated with the activity of the enzyme complex
335 produced by the fungus, which is capable of degrading lignin and increasing the quantity of
336 fermentable structural carbohydrates by microorganisms, improving the degradability of plant
337 biomasses for animal feed (Nayan et al., 2018b).

338 In terms of the ash content, significant differences were observed only for the mycoprotein
339 flours obtained in the BSG cultivation (Fig. 2A). An increase in the ash content from $2.33 \pm$
340 0.39 g/100 g (control) to 4.05 ± 0.11 g/100 g was observed with the development of *P. albidus*
341 mycoprotein. This result agrees with the literature. Postemsky et al. (2017) evaluated the
342 residual substrate of the macrofungi *Ganoderma lucidum* in rice hulls and sunflower seeds and
343 suggested that mycelium can absorb or translocate mineral elements. They observed increases
344 in the calcium, magnesium and sulphur contents amongst others, compared to the initial
345 composition of the substrate (Postemsky et al., 2017).

346 The total fat content decreased significantly with the production of mycoproteins in both wastes,
347 regardless of the fungus, compared to the respective controls. Reductions in total fat content
348 were identified in the *P. albidus* mycoprotein flours, representing a decrease of 67.5% when
349 produced in BSG and 15.5% in GB (Fig. 2A and B). This result agrees with the literature; the
350 degradation of fats in substrates colonised with the mycelium of fungi of the genus *Pleurotus*
351 was previously reported by Wanzenböck et al. (2017), who observed a decrease of
352 approximately 66% in wheat bran fats at SSC of *P. ostreatus*. These results suggest the
353 consumption of fats by macrofungi cells during mycelial growth (Wanzenböck et al., 2017).
354 Species of the *Pleurotus* genus may remove saponifiable or unsaponifiable lipophilic
355 substances from lignocellulosic substrates (Brozzoli et al., 2010). Although one of the uses for
356 BSG and GB is the feeding of ruminants (Mussatto et al., 2006; Sánchez et al., 2002), the
357 bioconversion of fats during the colonisation of agroindustrial waste by the species of the genus
358 *Pleurotus* may be of interest to the animal nutrition sector, since high levels of fat may trigger
359 ruminal fermentation dysfunction (Doreau and Ferlay, 1995).
360 Also, the production of mycoprotein in BSG represents a significant decrease in carbohydrate
361 content in relation to the control, independent of the fungus used, with the lowest value obtained
362 in *P. albidus* mycoprotein flour. This result is consistent with the study by Nitayapat et al.
363 (2015), in which there was a 67% reduction in the carbohydrate content of the tangerine residue
364 at CES of *Lentinus polychrous* for 4 weeks (Nitayapat et al., 2015a).
365 The amino acid profiles of the flours obtained from the colonised raw materials and the control
366 flours are shown in Table 1. Significant differences were observed in the concentration of total
367 amino acids determined in the mycoprotein flours produced in BSG, in comparison to the
368 control. *P. albidus* mycoprotein flour in BSG contained a greater availability of total amino
369 acids, representing an increase of 20.2%. BSG flour with *A. blazei* mycoprotein did not differ
370 statistically from the control flour in the content of total amino acids. On the other hand, in the

371 production of *A. fuscosuccinea* mycoprotein in BSG, the lowest concentration of total amino
372 acids was observed, representing a decrease of 15.7% (Table 1). About essential amino acids,
373 only tryptophan has not been determined. The essential amino acids in the control BSG (before
374 the SSC) represented 50% in relation to the total of determined amino acids. With *P. albidus*
375 and *A. blazei*, the essential amino acids represent 56.4 and 56.8% of the total determined,
376 respectively.

377 Comparing the total amino acid data (Table 1) with the quantity of fungal biomass (Fig. 1B),
378 there is a relationship between mycelial biomass and the availability of total amino acids, since
379 mycoproteins containing a higher amount of biomass led to the best results with respect to the
380 concentration of total amino acids, such as the *P. albidus* and *A. blazei* mycoproteins produced
381 in BSG. Among the amino acids identified and quantified in the flour of mycoprotein of *P.*
382 *albidus* and *A. blazei* in BSG, methionine was not found in the control, but was available after
383 the bioprocess with the macrofungi; it is an essential amino acid that has relevance in the protein
384 synthesis process because it is, for the most part, the first amino acid of a sequence of
385 polypeptides (Moran et al., 2013). Additionally, there was also an increase in the contents of
386 other analysed essential amino acids, such as serine, threonine, isoleucine and lysine, in the *P.*
387 *albidus* mycoprotein flours produced in BSG. For lysine, an increase of 128.0% was obtained,
388 in relation to the control BSG. In the flour of *A. fuscosuccinea* mycoprotein produced in BSG,
389 increases in the content of the essential amino acid threonine (23.5%) were observed, in addition
390 to increases in other non-essential amino acids. Recently, Cooray and Chen (2018) reported that
391 the total amino acid content in BSG was doubled by the SSC of *Rhizopus oligosporus* (Cooray
392 and Chen, 2018). According to the literature (Xiao et al., 2015), changes in amino acid levels
393 occurring by SSC may be related to the conversion of amino acids, due to the action of
394 transaminases produced by fungi during mycelial growth. In the determination of the amino

395 acid profile of the GB samples (Table 1), there was a 19% reduction in the total amino acids
396 determined in *P. albidus* mycoprotein flour in relation to GB control flour.

397

398 **3.3 Physical and physico-chemical properties of mycoprotein**

399 The physical and physico-chemical characteristics of the mycoprotein and the control flours
400 were determined, namely the pH, water activity and colour analysis (Table 2). The pH of the
401 mycoprotein flours produced in BSG was significantly lower than the pH of the control flours.

402 The lowest pH was observed in *A. fuscosuccinea* mycoprotein. Decreases in pH values indicate
403 the formation of pH-lowering metabolites, which is a characteristic of the degrading enzymatic
404 secretions of lignin, in addition to the production of organic acids (Nayan et al., 2018a, 2018b).

405 On the other hand, the production of mycoprotein in GB resulted in an increase in the pH value
406 (Table 2). This increase in pH may be associated with the degradation of GB phenolic acids
407 during the growth of *P. albidus* mycelium or, according to Nayan et al. (2018a; 2018b), the
408 increase in pH may indicate that the fungus did not grow well. This can be observed by
409 determining the fungal biomass of mycoprotein flour produced in GB (Fig. 1B), in which the
410 amount of biomass was lower compared to the mycoprotein flour produced in BSG with the
411 same fungus.

412 With regards to the A_w , the value determined in the control BSG flours (0.455 ± 0.003) was
413 lower than that obtained in the mycoprotein flours produced on BSG, which was 0.472 ± 0.002
414 (*P. albidus*) and 0.512 ± 0.002 (*A. blazei*). In GB, no significant changes in the A_w value of the
415 flours were observed with the development of the mycoprotein (Table 2).

416 The evaluation of the colour parameters showed significant differences in the colouration of the
417 flour of mycoproteins produced in BSG and GB (Table 2). Mycoprotein flour from *P. albidus*
418 produced in BSG had higher luminosity, that is, it was whiter than the control flour, whereas
419 through the production of *A. fuscosuccinea* mycoprotein, the determined luminosity in the flour

420 decreased, making it darker. This darkening may be related in part to the production of dark
421 pigments (melanin) by the fungus, because species of the *Auricularia* genus have the ability to
422 produce melanin in SSC (Zou and Ma, 2018). Darkening can also be explained by the formation
423 of dark-coloured compounds due to the Maillard reaction during the drying of the colonised
424 cultivation medium, since the substrates for this reaction (amino acids and reducing sugars) are
425 available (Nitayapat et al., 2015a).

426 Additionally, in terms of the colour analysis of the BSG flours, the parameter a^* , which
427 represents the red-green chromatic coordinate, was influenced by the production of *A. blazei*
428 mycoprotein, consisting of a redder than the control. The colour changes in parameter b^* , which
429 represents the yellow-blue chromatic coordinate, were discrete and did not differ statistically
430 from the control. The total colour difference (TCD) parameter identified that the production of
431 *P. albidus* mycoprotein in BSG resulted in the greatest colour difference in relation to the
432 control, which is attributed, mainly, to the change in the luminosity parameter (Table 2).

433 In the samples of mycoproteins produced in GB, significant changes were identified in the
434 chromatic parameters a^* and b^* ; the value of a^* decreased and the value of b^* increased. In this
435 way, the growth of *P. albidus* mycelium in grape bagasse reduced the intensity of the red colour
436 and increased the yellow colour, in comparison to the control sample (Table 2).

437 The functional hydration (WAI, WSI and WHC) and fat absorption (FAC) properties of the
438 mycoprotein and control flours are shown in Table 3.

439 In comparison to the control, the WAI of the colonised BSG flours increased significantly,
440 whereas the WSI decreased. Similar observations were also reported for chickpea flour with
441 *Cordyceps militaris* mycelium, in which higher WAI and lower WSI values were observed in
442 comparison to the control (Xiao et al., 2015). According to the same authors, these results may
443 be due to protein denaturation and starch damage that occurred during the SSC process. It may
444 also result from the action of proteases and amylases secreted during the development of the

445 mycelium in the cultivation medium, which cleave the protein and starch macromolecules into
446 smaller molecules that are possibly responsible for the changes in WAI and WSI. A significant
447 decrease in WHC was observed only in the *A. fuscosuccinea* mycoprotein flour in BSG. The
448 BSG FAC increased significantly with the production of mycoproteins, with an emphasis on
449 the *P. albidus* mycoprotein, which presented the greatest increase in this property. In a sample
450 of *P. albidus* mycoprotein produced in GB, a behaviour contrary to that observed in the
451 mycoproteins produced in BSG was observed, with a significant increase in WSI and decrease
452 in FAC (Table 3).

453

454 **3.4 Phenolic content, *in vitro* antioxidant activity and bioactive compounds of**
455 **mycoprotein**

456 Samples of mycoprotein and control flours were analysed for phenolic content, antioxidant
457 activity in DPPH and ABTS assays, and bioactive compounds; the results are shown in Table
458 4.

459 The phenolic compounds determined in the control BSG flour were 2.51 ± 0.10 mg EAG/g, and
460 in the mycoprotein *A. fuscosuccinea* flour produced in BSG, there was a 51.4% increase in the
461 total phenolics (3.80 ± 0.05 mg EAG/g). On the other hand, in the production of *P. albidus* and
462 *A. blazei* mycoprotein in BSG, the total phenolic compounds decreased by 32.3 and 47.0%,
463 respectively.

464 The scavenging ability of the DPPH radical in the control BSG sample was $3.24 \mu\text{mol TEAC/g}$.
465 The production of *A. fuscosuccinea* and *A. blazei* mycoproteins in BSG resulted in DPPH
466 radical scavenging activities of 3.45 ± 0.02 and $3.30 \pm 0.04 \mu\text{mol TEAC/g}$, respectively.
467 However, the production of *P. albidus* mycoprotein in BSG resulted in lower DPPH activity, at
468 approximately 27% lower than in control (Table 4).

469 Results obtained in the scavenging analysis of the radical cation ABTS demonstrated the
470 contribution of the production of macrofungal mycoproteins by CES in BSG to the antioxidant
471 activity. The mycoprotein production of *A. fuscosuccinea* in BSG resulted in increased
472 antioxidant activity, from 5.37 ± 0.03 (control) to 5.64 ± 0.01 $\mu\text{mol TEAC/g}$. The lowest
473 scavenging ability of the ABTS cation radical was determined in the *P. albidus* and *A. blazei*
474 mycoprotein flours in BSG (3.34 ± 0.04 and 2.59 ± 0.10 $\mu\text{mol TEAC/g}$, respectively). *A.*
475 *fuscosuccinea* mycoprotein flour produced in BSG obtained the highest phenolic content and
476 antioxidant activity. This result refers, in part, to the formation of dark colouration compounds,
477 which was demonstrated by the decrease in the value of the chromatic parameter L (luminosity)
478 (Table 2). The products of the Maillard reaction may have a role in increasing the phenolic
479 content and antioxidant activity, as some intermediate melanoidins have the ability to scavenge
480 free radicals (Nitayapat et al., 2015a). Also, some species of the *Auricularia* genus have the
481 capacity to produce melanin, a pigment with antioxidant activity (Yang et al., 2018).
482 Regarding the profile of the antioxidant activity of GB, the production of *P. albidus*
483 mycoprotein in GB significantly decreased the total phenolics, as well as the antioxidant
484 activities of the scavenging capacity of radical DPPH and ABTS (Table 4). The degradation of
485 phenolic compounds may be a consequence of the activity of the phenoloxidase enzymes
486 produced during fungus growth on GB (Nayan et al., 2018b). From a nutritional point of view,
487 this result represents an improvement in the nutritional value of GB, as phenolic compounds,
488 mainly tannins, are considered antinutritional factors, especially in animal nutrition (Brozzoli
489 et al., 2010; Sánchez et al., 2002).
490 Concentration analyses of ergothioneine and lovastatin investigated the presence of these
491 bioactive compounds in the flour of colonised and control BSG and GB (Table 4). Among the
492 analysed samples, ergothioneine was only found in the *P. albidus* mycoprotein flour produced
493 in BSG. Ergothioneine is a secondary metabolite with antioxidant activity *in vitro*, which can

494 be produced by some edible macrofungi, such as the species of the genus *Pleurotus* (Dubost et
495 al., 2007; Gambato et al., 2018).

496 Lovastatin is important because it is a natural statin, which helps to reduce the levels of total
497 cholesterol and low density lipoprotein cholesterol (LDL), acting on the inhibition of the
498 limiting enzyme in the production of cholesterol (3-hidroxi-3-metilgluratil coenzyme A
499 redutase) (Sorrentino et al., 2010). This bioactive compound was found in all the analysed
500 samples, especially in the *A. fuscosuccinea* mycoprotein produced in BSG, in which the
501 lovastatin concentration was statistically higher ($p < 0.05$) than the BSG control flour, whereas
502 in the *P. albidus* and *A. blazei* mycoproteins, the concentration was significantly ($p < 0.05$)
503 lower. The production of *P. albidus* mycoproteins in GB resulted in a higher ($p < 0.05$)
504 concentration of lovastatin, compared to the GB control.

505 The extraction and identification of ergothioneine and lovastatin in the flours of macrofungi
506 mycoproteins produced in BSG and GB were first demonstrated, reinforcing the hypothesis that
507 the SSC of the mycelium of edible macrofungi can add value to agroindustrial wastes due to
508 the production of bioactive compounds.

509

510 **3.4 Enzymatic inhibition capacities of mycoproteins**

511 The inhibitory effects of extracts from the mycoprotein and control flours on the important
512 metabolic enzymes were investigated (Table 5). Extracts of mycoprotein flours produced in
513 BSG had inhibitory effects against the α -glycosidase enzyme, independent of the fungus.
514 However, *P. albidus* and *A. blazei* exhibited higher inhibitory activity than *A. fuscosuccinea*.
515 The inhibitory activity against α -glycosidase can be attributed to the phenolic compounds
516 contents of the extracts (Kaewnarin et al., 2016). However, in the present work, the extract of
517 *A. fuscosuccinea* mycoprotein flour produced in BSG, containing the highest amount of
518 phenolic content (Table 4), had the lowest α -glycosidase inhibitory capacity among the

519 colonised BSG flour extracts, perhaps due to the fact that the determined phenolic content are
520 compounds of another nature, as discussed above. The inhibitory activity against the α -amylase
521 enzyme was also investigated. Extracts from the flours of mycoproteins produced in BSG were
522 less able to inhibit α -amylase than the extract obtained from the respective control (Table 5).
523 Regarding the ability to inhibit lipase activity, the results showed that the development of
524 mycoprotein by SSC did not contribute to an increase in inhibitory activity in BSG flours, since
525 there was no significant difference ($p < 0.05$) between the control and the mycoprotein produced
526 in BSG. Control flours of BSG inhibited pancreatic lipase activity by approximately 46%.
527 Extracts from the colonised GB flours were less effective in *in vitro* enzymatic inhibition assays
528 than the GB control extract. This may be associated with a greater amount of phenolic
529 compounds present in uncolonised grape bagasse. This result may be positive, since it
530 represents the reduction of antinutritional factors, such as tannins.

531

532 Conclusion

533 Flours of the mycoproteins of *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* and *A. blazei* produced in BSG, and
534 *P. albidus* mycoprotein flour produced in GB, were obtained. Among the obtained products, in
535 *P. albidus* mycoprotein flours, greater increases in nutritional value were studied, whereas *A.*
536 *fuscosuccinea* mycoprotein flours had a greater influence on antioxidant activity. The use of
537 BSG and GB in the solid-state cultivation of mycelial biomass and the subsequent use of the
538 colonised material to obtain mycoprotein flour is a promising strategy for nutritional
539 enrichment and the production of bioactive compounds with the potential for functional foods.

540

541 Acknowledgments

542 The authors thank the University of Caxias do Sul (UCS), Federal Institute of Santa Catarina
 543 (IFSC) at the Campus São Miguel do Oeste and CAPES-Embrapa 15/2014 for technical and
 544 financial support.

545

546 References

- 547
- 548 Alvarenga, R. L. M., Naves, L. R. R., & Xavier-Santos, S. (2015). The Genus *Auricularia* Bull.
 549 ex Juss. (Basidiomycota) in Cerrado (Brazilian Savanna) areas of Goiás state and the
 550 Federal District , Brazil. *Mycosphere*, 6(5), 532–541.
 551 <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/5/3>
- 552 Anderson, R. A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-
 553 cooked small grain products. *Cereal Chemists*, 59(4), 265–269.
- 554 AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis*. (J. George W. Latimer, Ed.) (20th ed.). AOAC
 555 International.
- 556 Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Development of a Novel
 557 Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. *Food Analytical Methods*,
 558 7(1), 217–223. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9621-9>
- 559 Bonny, S. P. F., Gardner, G. E., Pethick, D. W., & Hocquette, J. F. (2015). What is artificial
 560 meat and what does it mean for the future of the meat industry? *Journal of Integrative
 561 Agriculture*, 14(2), 255–263. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60888-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60888-1)
- 562 Brozzoli, V., Bartocci, S., Terramoccia, S., Contò, G., Federici, F., D'Annibale, A., &
 563 Petruccioli, M. (2010). Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its
 564 evaluation as a possible animal feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4), 223–
 565 228. <https://doi.org/10.1016/j.enzmotec.2009.09.008>
- 566 Canedo, M. S., de Paula, F. G., da Silva, F. A., & Vendruscolo, F. (2016). Protein enrichment
 567 of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess
 568 and Biosystems Engineering*, 39(7), 1105–1113. [https://doi.org/10.1007/s00449-016-1587-8](https://doi.org/10.1007/s00449-016-

 569 1587-8)
- 570 Castro-Alves, V. C., Gomes, D., Menolli, N., Sforça, M. L., & Nascimento, J. R. O. do. (2017).
 571 Characterization and immunomodulatory effects of glucans from *Pleurotus albidus*, a
 572 promising species of mushroom for farming and biomass production. *International
 573 Journal of Biological Macromolecules*, 95, 215–223.
 574 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.059>
- 575 Cooray, S. T., & Chen, W. N. (2018). Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-
 576 state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42(October
 577 2017), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.027>
- 578 Corrêa, R. C. G., Barros, L., Fernandes, Â., Sokovic, M., Bracht, A., Peralta, R. M., & Ferreira,
 579 I. C. F. R. (2018). A natural food ingredient based on ergosterol: Optimization of the
 580 extraction from: *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in
 581 yogurts. *Food and Function*, 9(3), 1465–1474. <https://doi.org/10.1039/c7fo02007d>
- 582 de Camargo, A., Regitano-d'Arce, M. A. B., Telles Biasoto, C., & Shahidi, F. (2016). Enzyme-
 583 assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and
 584 inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*, 212, 395–402.
 585 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.047>
- 586 Doreau, M., & Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen:

- 587 a review. *Livestock Production Science*, 43(4), 97–110.
 588 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226\(95\)00041-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226(95)00041-I)
- 589 Dubost, N. J., Ou, B., & Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and
 590 ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food
 591 Chemistry*, 105(2), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.030>
- 592 FAO. (2017). *The State of Food and Agriculture. Leveraging Food Systems for Inclusive Rural
 593 Transformation*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-I7658e.pdf>
- 594 Gambato, G., Pavão, E. M., Chilanti, G., Fontana, R. C., Salvador, M., & Camassola, M. (2018).
 595 *Pleurotus albidus* modulates mitochondrial metabolism disrupted by hyperglycaemia in
 596 EA . hy926 endothelial cells. *BioMed Research International*, 2018, 1–10.
 597 <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/2859787>
- 598 Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M., & Pohleven, F. (2008). The use of spent
 599 brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New
 600 Biotechnology*, 25(2–3), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.08.003>
- 601 Handa, C. L., De Lima, F. S., Guelfi, M. F. G., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. (2016). Multi-
 602 response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant
 603 activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chemistry*, 197,
 604 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.124>
- 605 Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I.
 606 C. F. R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from
 607 *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional
 608 Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197, 1054–1063.
 609 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>
- 610 Jayasingheachchi, H., & Seneviratne, G. (2004). Can mushrooms fix atmospheric nitrogen ?
 611 *J. Biosci.*, 29(3), 293–296.
- 612 Kaewnarin, K., Suwannarach, N., Kumla, J., & Lumyong, S. (2016). Phenolic profile of various
 613 wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-
 614 tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. *Journal of Functional Foods*, 27,
 615 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.008>
- 616 Kang, M., Zhai, F. H., Li, X.-X., Cao, J.-L., & Han, J.-R. (2017). Total phenolic contents and
 617 antioxidant properties of buckwheat fermented by three strains of *Agaricus*. *Journal of
 618 Cereal Science*, 73, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.12.012>
- 619 Lechner, B. E., & Albertó, E. (2011). Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus*
 620 to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom
 621 production. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(4), 148–154.
 622 <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.12.001>
- 623 Lin, M., Humbert, E., & Sosulski, F. (1974). Certain Functional Properties of Sunflower meal
 624 Products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x>
- 625 Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an
 626 emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553–568.
 627 <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- 628 Menolli, N., Breternitz, B. S., & Capelari, M. (2014). The genus *Pleurotus* in Brazil: A
 629 molecular and taxonomic overview. *Mycoscience*, 55(5), 378–389.
 630 <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.12.001>
- 631 Moran, L. A., Horton, H. R., Scrimgeour, K. G., & Perry, M. D. (2013). *Bioquímica* (5th ed.).
 632 São Paulo: Pearson Education do Brasil.
- 633 Moreira, C., & Furlong, E. B. (2007). Caracterização de compostos nitrogenados presentes em
 634 farelos fermentados em estado sólido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 805–811.
 635 <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400021>

- 637 Muhlack, R. A., Potumarthi, R., & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste
 638 valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste
 639 Management*, 72, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>
- 640 Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation,
 641 characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14.
 642 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- 643 Nayan, N., Sonnenberg, A. S. M., Hendriks, W. H., & Cone, J. W. (2018a). Screening of white-
 644 rot fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. *Journal of Applied
 645 Microbiology*, 125(2), 468–479. <https://doi.org/10.1111/jam.13894>
- 646 Nayan, N., Sonnenberg, A. S. M., Hendriks, W. H., & Cone, J. W. (2018b). Variation in the
 647 solubilization of crude protein in wheat straw by different white-rot fungi. *Animal Feed
 648 Science and Technology*, 242(June), 135–143.
 649 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.06.009>
- 650 Nitayapat, N., Prakarnsombut, N., Lee, S. J., & Boonsupthip, W. (2015). Bioconversion of
 651 tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the
 652 final products. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 773–779.
 653 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.016>
- 654 Pardo, A., Perona, M. A., & Pardo, J. (2005). Use of grapevine stem in the elaboration of
 655 specific substrates for *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer cultivation. *ITEA
 656 Informacion Tecnica Economica Agraria*, 101(1), 59–69.
- 657 Pardo, A., Perona, M. A., & Pardo, J. (2007). Indoor composting of vine by-products to produce
 658 substrates for mushroom cultivation. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(3), 417–
 659 424. <https://doi.org/https://doi.org/10.5424/sjar/2007053-260>
- 660 Perera, P. K., & Li, Y. (2011). Mushrooms as a functional food mediator in preventing and
 661 ameliorating diabetes. *Functional Foods in Health and Disease*, 1(4), 161–171.
- 662 Petre, M., Pătrulescu, F., & Teodorescu, R. I. (2015). Controlled Cultivation of Mushrooms on
 663 Winery and Vineyard Wastes. In *Mushroom Biotechnology: Developments and
 664 Applications* (pp. 31–47). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802794-3.00003-5>
- 665 Petre, M., Teodorescu, A., & Ricu, G. (2005). The growing effect of vineyard and winery
 666 wastes on the production of mycelia and fruit bodies of edible and medicinal fungi.
 667 *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(3), 444–445.
 668 <https://doi.org/https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v7.i3.830>
- 669 Postemsky, P. D., Bidegain, M. A., González-Matute, R., Figlas, N. D., & Cubitto, M. A.
 670 (2017). Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal
 671 mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma
 672 lucidum*. *Bioresource Technology*, 231, 85–93.
 673 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- 674 Raghavendra, S. N., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Tharanathan, R. N. (2004).
 675 Dietary fiber from coconut residue: Effects of different treatments and particle size on the
 676 hydration properties. *European Food Research and Technology*, 218(6), 563–567.
 677 <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0889-2>
- 678 Rodrigues, C. E., Tonial, M., Schäfer, L., Pasquali, G., & Kist, T. B. L. (2018). Performance of
 679 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a derivatization reagent for the
 680 analysis of medium and long chain fatty acids using HPLC with LIF detection. *Journal of
 681 Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1100–
 682 1101(April), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.043>
- 683 Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-García, M., & Esqueda, M. (2002). Biodegradation of
 684 Viticulture Wastes by *Pleurotus*: A Source of Microbial and Human Food and Its Potential
 685 Use in Animal Feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2537–2542.
 686 <https://doi.org/10.1021/jf011308s>

- 687 Shen, P., Shiao, M.-S., Chung, H.-R., Lee, K.-R., Chao, Y.-S., & Hunt, V. M. (1996). Liquid
 688 chromatographic determination of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase
 689 inhibitors. *Journal of Chinese Chemical Society*, 43, 451–457.
- 690 Singleton, V. L., & Rossi Jr., J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with
 691 Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and*
 692 *Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>
- 693 Siri, N., Lacroix, M., Garrigues, J. C., Poinsot, V., & Couderc, F. (2006). HPLC-fluorescence
 694 detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines
 695 labelled with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde. *Electrophoresis*, 27(22), 4446–4455.
 696 <https://doi.org/10.1002/elps.200600165>
- 697 Sorrentino, F., Roy, I., & Keshavarz, T. (2010). Impact of linoleic acid supplementation on
 698 lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Applied Microbiology and*
 699 *Biotechnology*, 88(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2722-0>
- 700 Souilem, F., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Barreira, J. C. M., Barros, L., Skhiri, F., ... Ferreira,
 701 I. C. F. R. (2017). Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds:
 702 Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chemistry*, 230, 40–48.
 703 <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.026>
- 704 Stoffel, F., Santana, W. D. O., Fontana, R. C., Gregolon, J. G. N., Kist, T. B. L., De Siqueira,
 705 F. G., ... Camassola, M. (2019). Chemical features and bioactivity of grain flours
 706 colonized by macrofungi as a strategy for nutritional enrichment. *Food Chemistry*,
 707 297(June), 124988. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124988>
- 708 Wang, D., Sakoda, A., & Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of
 709 *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, 78(3), 293–
 710 300. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00002-5)
- 711 Wanzenböck, E., Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Zitz, U., Kracher, D., Schedle, K., & Kneifel, W.
 712 (2017). Wheat bran biodegradation by edible *Pleurotus* fungi – A sustainable perspective
 713 for food and feed. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 123–131.
 714 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.051>
- 715 Wilcox, M. D., Brownlee, I. A., Richardson, J. C., Dettmar, P. W., & Pearson, J. P. (2014). The
 716 modulation of pancreatic lipase activity by alginates. *Food Chemistry*, 146, 479–484.
 717 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.075>
- 718 Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2015). Effect of solid-
 719 state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 on physicochemical and functional
 720 properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour. *LWT - Food Science and Technology*,
 721 63(2), 1317–1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.046>
- 722 Yang, H., Zhou, H., Wu, Z., Yang, H., & Zhang, M. (2018). Production, physico-chemical
 723 characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of
 724 the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Bioscience*, 26(February), 49–56.
 725 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.008>
- 726 Zengin, G., Sarikurkcı, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014). A comprehensive
 727 study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to
 728 Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin
 729 diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244–251.
 730 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>
- 731 Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L. A., & Queiroz, M. I. (2010).
 732 Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica*
 733 Nägeli. *Bioresource Technology*, 101(18), 7107–7111.
 734 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>
- 735 Zhai, F.-H., Wang, Q., & Han, J.-R. (2015). Nutritional components and antioxidant properties
 736 of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. *Journal of*

- 737 *Cereal Science*, 65, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.010>
- 738 Zou, Y., & Ma, K. (2018). Screening of *Auricularia auricula* strains for strong production
739 ability of melanin pigments. *Food Science and Technology*, 38(1), 41–44.
740 <https://doi.org/10.1590/1678-457x.00117>
- 741

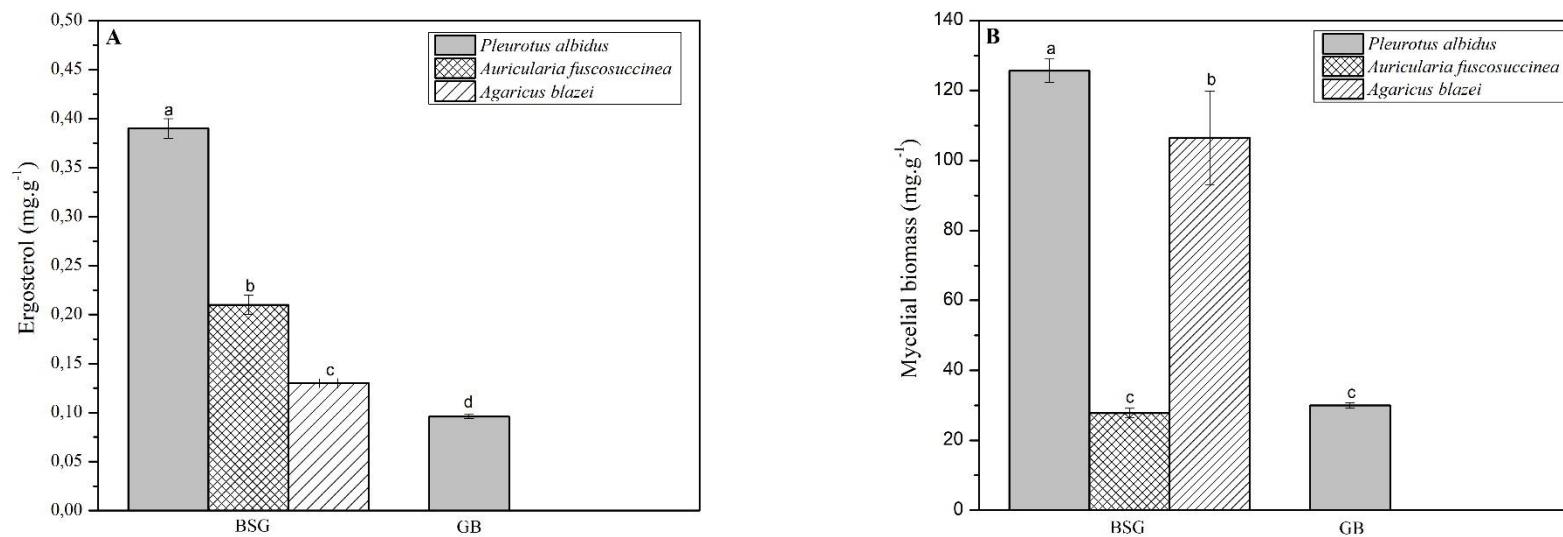


Figure 1. Ergosterol concentration (A) and mycelia biomass (B) in mycoprotein flours obtained from *P. albidus* (15 days), *A. fuscosuccinea* (21 days) and *A. blazei* (28 days) produced in brewer spent grain (BSG), and *P. albidus* (35 days) produced in grape bagasse (GB).

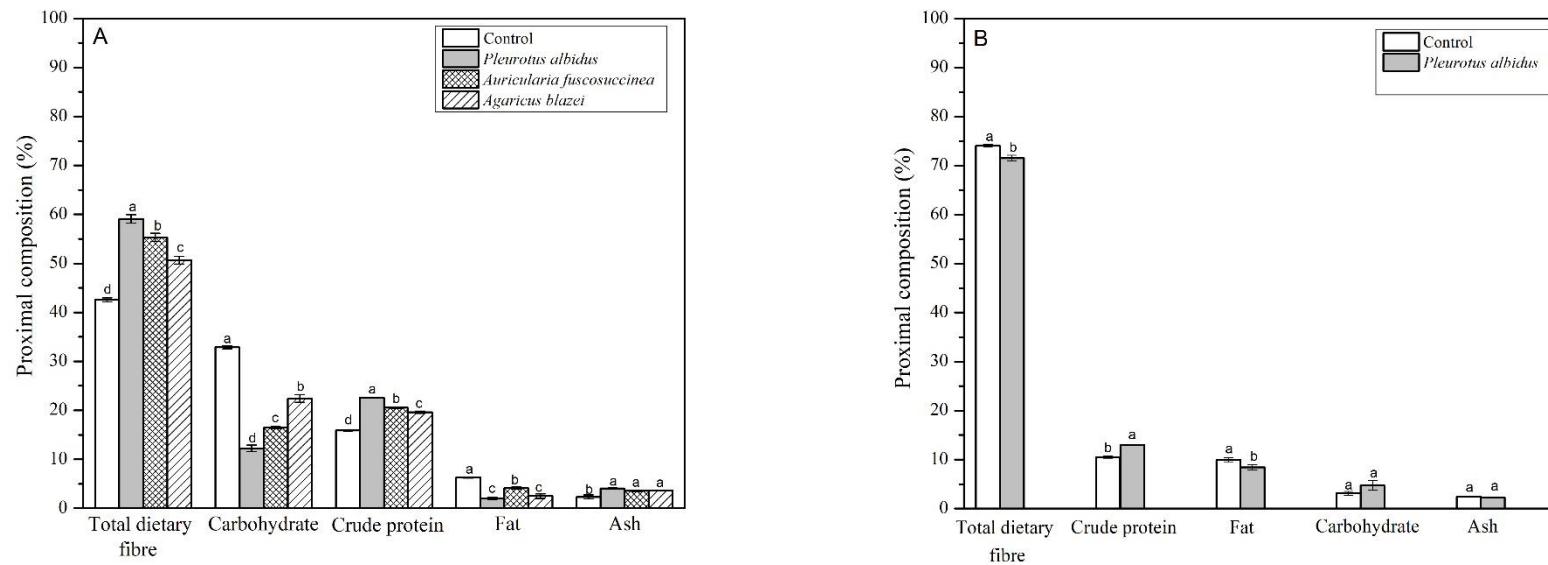


Figure 2. Proximal composition (%) ; total dietary fibre, carbohydrate, crude protein, fat and ash) of flours (control and mycoprotein) produced through the solid-state cultivation (SSC) of *Pleurotus albidus* (15 days), *Auricularia fuscosuccinea* (21 days) and *Agaricus blazei* (28 days) in brewer spent grain (BSG) (A) and of *Pleurotus albidus* (35 days) in grape bagasse (GB) (B).

Table 1. Amino acids profile of flours (control and mycoprotein) produced through the solid-state cultivation (SSC) of *Pleurotus albidus* (15 days), *Auricularia fuscosuccinea* (21 days) and *Agaricus blazei* (28 days) in brewer spent grain (BSG) and of *Pleurotus albidus* (35 days) in grape bagasse (GB).

Amino acid (mg/g of sample)	Control BSG	BSG + Mushroom mycelia			Control GB	GB + Mushroom mycelia <i>P. albidus</i>
		<i>P. albidus</i>	<i>A. fuscosuccinea</i>	<i>A. blazei</i>		
Essential amino acids	Histidine	2.64 ± 0.54 ^a	2.20 ± 0.05 ^{ab}	1.86 ± 0.04 ^b	1.98 ± 0.09 ^{ab}	0.61 ± 0.02 ^a
	Threonine	2.93 ± 0.31 ^b	3.86 ± 0.25 ^a	3.02 ± 0.00 ^b	3.62 ± 0.12 ^a	0.77 ± 0.02 ^a
	Tyrosine	0.57 ± 0.01 ^d	1.37 ± 0.02 ^b	0.80 ± 0.01 ^c	1.45 ± 0.05 ^a	0.19 ± 0.01 ^a
	Alanine	4.10 ± 0.35 ^b	5.25 ± 0.26 ^a	3.75 ± 0.05 ^b	5.21 ± 0.32 ^a	0.95 ± 0.00 ^a
	Methionine	n.d.	0.81 ± 0.04 ^a	n.d.	0.47 ± 0.01 ^b	n.d.
	Valine	4.66 ± 0.20 ^{ab}	5.27 ± 0.30 ^a	4.03 ± 0.09 ^b	4.68 ± 0.34 ^{ab}	1.07 ± 0.00 ^a
	Phenylalanine	4.02 ± 0.17 ^a	4.43 ± 0.16 ^a	3.39 ± 0.01 ^b	4.01 ± 0.28 ^a	0.79 ± 0.02 ^a
	Leucine +Isoleucine	9.21 ± 0.04 ^{bc}	10.70 ± 0.58 ^a	8.17 ± 0.23 ^c	9.51 ± 0.72 ^{ab}	2.23 ± 0.00 ^a
	Lysine	4.60 ± 1.60 ^c	10.51 ± 2.73 ^a	6.21 ± 0.46 ^{bc}	10.08 ± 0.51 ^{ab}	4.06 ± 0.20 ^a
	Essential sum	32.73	44.40	31.23	41.01	10.67
Non-essential	Arginine	4.81 ± 0.74 ^a	4.88 ± 0.30 ^a	3.39 ± 0.03 ^b	4.96 ± 0.50 ^a	1.16 ± 0.02 ^a
	Serine	3.34 ± 0.40 ^b	4.19 ± 0.21 ^a	2.95 ± 0.05 ^b	3.32 ± 0.18 ^b	0.79 ± 0.00 ^a
	Aspartic acid	6.39 ± 0.65 ^b	8.69 ± 0.55 ^a	6.11 ± 0.09 ^b	7.78 ± 0.50 ^a	1.68 ± 0.00 ^a
	Glutamic acid	14.73 ± 3.50 ^a	12.19 ± 0.87 ^{ab}	8.30 ± 0.52 ^b	11.12 ± 0.81 ^{ab}	2.80 ± 0.01 ^a
	Glycine	3.33 ± 0.46 ^b	4.19 ± 0.25 ^a	3.13 ± 0.10 ^b	3.94 ± 0.27 ^{ab}	1.19 ± 0.01 ^a
	Non essential sum	32.60	34.14	23.88	31.12	7.62
Total sum		65.33 ^c	78.54 ^a	55.11 ^d	72.13 ^b	18.29 ^a
						14.83 ^b

^{a,b,c} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same line, for the same raw material, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.
n.d.: not determined.

Table 2. Physical and physico-chemical characteristics of flours (control and mycoprotein) produced through the solid-state cultivation (SSC) of *Pleurotus albidus* (15 days), *Auricularia fuscosuccinea* (21 days) and *Agaricus blazei* (28 days) in brewer spent grain (BSG), and of *Pleurotus albidus* (35 days) in grape bagasse (GB).

	Sample	pH	A_w	Colour Parameter			
				L	a	b	TCD
BSG	Control*	5.71 ± 0.02 ^a	0.455 ± 0.003 ^d	55.42 ± 1.77 ^b	7.13 ± 0.58 ^{bc}	27.58 ± 3.05 ^{ab}	0
	<i>P. albidus</i>	5.61 ± 0.04 ^b	0.472 ± 0.002 ^c	64.41 ± 0.52 ^a	6.17 ± 0.43 ^c	23.59 ± 1.02 ^b	9.91 ± 0.90 ^a
	<i>A. fuscosuccinea</i>	4.63 ± 0.02 ^d	0.504 ± 0.003 ^b	49.65 ± 0.85 ^c	7.91 ± 0.39 ^b	23.86 ± 1.23 ^b	7.01 ± 0.47 ^b
	<i>A. blazei</i>	5.26 ± 0.01 ^c	0.512 ± 0.002 ^a	57.60 ± 0.56 ^b	9.17 ± 0.24 ^a	29.90 ± 0.44 ^a	3.84 ± 0.13 ^c
GB	Control*	3.60 ± 0.01 ^b	0.480 ± 0.002 ^a	21.66 ± 2.44 ^a	18.47 ± 2.12 ^a	24.89 ± 2.15 ^b	0
	<i>P. albidus</i>	4.11 ± 0.01 ^a	0.475 ± 0.001 ^a	24.05 ± 2.39 ^a	13.08 ± 1.72 ^b	34.74 ± 2.32 ^a	11.83 ± 1.65 ^a

Aw: Water activity; L: Lightness; a: green and red colour dimensions; b: blue and yellow colour dimensions; TCD: Total colour difference.

^{a,b,c,d} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same material, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

*Non-cultivated with macrofungi mycelia.

Table 3. Technological properties of the flours (control and mycoprotein) produced through the solid-state cultivation (SSC) of *Pleurotus albidus* (15 days), *Auricularia fuscosuccinea* (21 days) and *Agaricus blazei* (28 days) in brewer spent grain (BSG), and of *Pleurotus albidus* (35 days) in grape bagasse (GB).

	Sample	WAI (g/g)	WSI (%)	WHC (g/g)	FAC (%)
BSG	Control*	2.99 ± 0.04 ^c	20.63 ± 1.22 ^a	6.16 ± 0.43 ^a	76.84 ± 1.68 ^d
	<i>P. albidus</i>	3.81 ± 0.08 ^a	16.56 ± 0.60 ^{bc}	6.29 ± 0.50 ^a	153.51 ± 2.22 ^a
	<i>A. fuscosuccinea</i>	3.09 ± 0.02 ^c	16.45 ± 0.31 ^c	5.15 ± 0.18 ^b	99.93 ± 1.19 ^c
	<i>A. blazei</i>	3.60 ± 0.06 ^b	18.41 ± 0.36 ^b	6.20 ± 0.20 ^a	128.55 ± 5.23 ^b
GB	Control*	2.66 ± 0.06 ^a	4.63 ± 0.51 ^b	1.52 ± 0.18 ^a	93.80 ± 3.50 ^a
	<i>P. albidus</i>	2.67 ± 0.02 ^a	6.00 ± 0.07 ^a	1.41 ± 0.08 ^a	83.50 ± 1.26 ^b

WAI: Water absorption index; WSI: Water solubility index; WHC: Water holding capacity; FAC: Fat absorption capacity.

^{a,b,c} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same material, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

*Non-cultivated with macrofungi mycelia.

Table 4. Phenolic content, antioxidant activity and bioactive compounds of flours (control and mycoprotein) produced through the solid-state cultivation (SSC) of *Pleurotus albidus* (15 days), *Auricularia fuscosuccinea* (21 days) and *Agaricus blazei* (28 days) in brewer spent grain (BSG), and of *Pleurotus albidus* (35 days) in grape bagasse (GB).

Sample	Phenolic content (mg EAG/g)	DPPH	ABTS	Ergothioneine (µg/100 g)	Lovastatin (µg/100 g)
		(µmol TEAC/g)	(µmol TEAC/g)		
BSG	Control*	2.51 ± 0.10 ^b	3.24 ± 0.03 ^b	5.37 ± 0.03 ^b	n.d.
	<i>P. albidus</i>	1.70 ± 0.13 ^c	2.36 ± 0.12 ^c	3.34 ± 0.04 ^c	11.90 ± 0.01 ^a
	<i>A. fuscosuccinea</i>	3.80 ± 0.05 ^a	3.45 ± 0.02 ^a	5.64 ± 0.01 ^a	n.d.
	<i>A. blazei</i>	1.33 ± 0.03 ^d	3.30 ± 0.04 ^a	2.59 ± 0.10 ^d	n.d.
GB	Control*	5.16 ± 0.01 ^a	23.72 ± 0.06 ^a	82.61 ± 0.45 ^a	n.d.
	<i>P. albidus</i>	1.18 ± 0.03 ^b	11.46 ± 0.32 ^b	13.03 ± 0.38 ^b	n.d.

EAG: Equivalent acid gallic; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

^{a,b,c,d} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same material, indicate that there is no significant difference at 5 % (p < 0.05) in the parameter evaluated.

*Non-cultivated with macrofungi mycelia.

Table 5. Enzymatic inhibition capacity of flours (control and mycoprotein) produced through the solid-state cultivation (SSC) of *Pleurotus albidus* (15 days), *Auricularia fuscosuccinea* (21 days) and *Agaricus blazei* (28 days) in brewer spent grain (BSG), and of *Pleurotus albidus* (35 days) in grape bagasse (GB).

Sample		α -glucosidase inhibition (%)	α -amylase inhibition (%)	pancreatic lipase inhibition (%)
BSG	Control*	28.3 ± 1.0 ^c	24.4 ± 1.0 ^a	46.1 ± 7.0 ^a
	<i>P. albidus</i>	98.0 ± 2.0 ^a	16.0 ± 2.0 ^b	35.2 ± 7.0 ^a
	<i>A. fuscosuccinea</i>	55.6 ± 6.0 ^b	15.5 ± 1.0 ^{bc}	45.6 ± 6.0 ^a
	<i>A. blazei</i>	100.0 ± 0.0 ^a	12.3 ± 1.0 ^c	49.0 ± 2.0 ^a
GB	Control*	96.7 ± 1.0 ^a	24.5 ± 1.0 ^a	84.4 ± 1.0 ^a
	<i>P. albidus</i>	67.3 ± 2.0 ^b	2.2 ± 1.0 ^b	41.1 ± 0.5 ^b

^{a,b,c,d} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, for the same material, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

*Non-cultivated with macrofungi mycelia.

4.3 Capítulo 3

Physicochemical properties and biological activity of novel cookies produced with brewer spent grain flour colonized by *Pleurotus albidus* mycelia

Novel cookies with mycelia- brewer spent grain flour

Fernanda Stoffel^{ab,*}, Weslei de Oliveira Santana^a, Roselei Claudete Fontana^a, Marli

Camassola^a

^a Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Caxias do Sul, RS, CEP 95070-560, Brazil.

b Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Rua Vinte de Dois de abril, 2440, São Miguel do Oeste/SC, CEP 89900-000, Brazil.

*Corresponding author:

Postal address: Rua Vinte de Dois de abril, nº 2440, Bairro São Luiz, São Miguel do Oeste/SC, Brazil, CEP 89900-000

E-mail address: fernanda.stoffel@ifsc.edu.br

Phone/Fax: +55 49 36410400

ORCID:

Fernanda Stoffel [0000-0003-0939-0968](https://orcid.org/0000-0003-0939-0968)

Marli Camassola 0000-0001-7410-4337

1 Abstract

2 The objective of this study was to evaluate the use of a flour obtained from brewer spent grain
3 (BSG) cultivated in solid state by *P. albidus* mycelium in cookie formulation. The mycelia-
4 BSG flour was used in partial or total substitution of wheat flour. Physicochemical
5 characteristics, antioxidant activity and α -glycosidase inhibition of cookies were determined.
6 Total substitution of wheat flour for *P. albidus* mycelia-BSG flour in cookie mixture resulted
7 in higher contents of protein (11.60 g/100 g), total dietary fibre (32.35 g/100 g), phenolic
8 content (2.54 mg GAE¹/g), antioxidant activity (58.8% DPPH¹ inhibition and 39.4% ABTS¹
9 inhibition) and α -glycosidase inhibition (74.9%). In addition, the use of *P. albidus* mycelia BSG
10 flour increased the hardness (112.45 N) and altered the colour parameters of the cookies,
11 reducing the luminosity and the yellowish colour. However, the incorporation of *P. albidus*
12 mycelia BSG flour is a wheat flour alternative to aggregate nutritional value in foods and in the
13 development of functional foods.

14

15

16 **Keywords:** edible mushroom; solid-state cultivation; mycoprotein; functional food.

17

18

19

20

21

22

23

24

25 ¹ GAE: gallic acid equivalent; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-
26 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).

27

28

29 1. Introduction

30 Brewer spent grain (BSG) is the main co-product of the brewing industry, accounting for 85%
31 of the total waste generated (Mussatto et al., 2006). As for composition, it stands out for the
32 content of dietary fibre and protein. In addition, it contains several bioactive compounds, such
33 as polyphenols and flavonoids, which have antioxidant activity (Cooray and Chen, 2018).

34 Among the segments of the food and beverage industry, the brewing business has a strategic
35 economic position, driven by the exponential increase of craft beers on the world stage
36 (Albanese et al., 2018). Furthermore, due to the growth of the sector there has been an
37 increase in BSG generation, which is generally destined for ruminants and can cause
38 environmental problems when improperly discarded. In this sense, it is important to explore
39 other possibilities for its use, including in food production (Fărcaş et al., 2015). BSG has
40 already been incorporated in several bakery products, such as breads, cookies, cakes and
41 snacks, among others. However, there are some limitations to its use as a substitute for flours;
42 due to its colour, flavour and texture. So, incorporations are recommended in small amounts,
43 ranging from 5 to 10% (Mussatto et al., 2006).

44 BSG is a raw material for fungi cultivation (Cooray and Chen, 2018; Mussatto et al., 2006).
45 Edible macrofungi, also known as mushrooms, are appreciated not only for their texture and
46 taste, but also for their chemical composition (Perera and Li, 2011). The genus *Pleurotus*,
47 popularly known as the oyster mushroom, has several edible species that are among the most
48 commercially produced in the world. *Pleurotus albidus* grows in South and Central America
49 (Lechner and Albertó, 2011). It is one of the last species of the genus certainly known in
50 Brazil, on which studies are still fragmented and scarce (Menolli et al., 2014). Due to the fact
51 that it is a versatile species and is easy to grow in agro-industrial waste, *P. albidus* can

52 contribute to the reduction of the environmental impact through the bioconversion of waste
53 into products of interest to the food industry (Lavelli et al., 2018; Lechner and Albertó, 2011).
54 As demonstrated (Canedo et al., 2016), the solid state cultivation of BSG by fungi, and the
55 consequent protein enrichment by the incorporation of fungal biomass, is a strategy that adds
56 value to this brewer co-product. The product resulting from this process is characterized as a
57 "single cell protein" or "mycoprotein". It is a fungal biomass produced by the cultivation of
58 micro or macroscopic fungi, being constituted by its cell structures and the substrate used in
59 the fermentative process (Anupama and Ravindra, 2000).

60 The bioconversion of residues through solid state cultivation with mycelium of edible
61 macrofungi and the subsequent procurement of a functional food ingredient with the potential
62 to add value to several products was studied (Nitayapat et al., 2015b). The macrofungal
63 mycelium provides benefits for the human diet, since it contains chitin and glucans that are
64 considered dietary fibre, in addition to polyunsaturated fatty acids (mostly linoleic acid) and
65 essential amino acids (Stephan et al., 2018).

66 Cookies are a type of bakery product composed basically of wheat flour, sugar and fat
67 (Cauvain, 2015). The growing demand for healthy, high-quality food by the consumer is a
68 challenge for the bakery industry, which requires the development of products with improved
69 physical-chemical, sensory and nutritional properties (Xiao et al., 2016). Studies show that the
70 formulation of cookies has been enriched by the addition of various ingredients, such as
71 *Saccharomyces cerevisiae* yeast inactive cells (Öztürk et al., 2017), oyster mushroom
72 *Pleurotus sajor-caju* powder (Ng et al., 2017) or flours of underutilized legumes (Cheng and
73 Bhat, 2016).

74 However, to the best of our knowledge, the addition of BSG flour colonized by *P. albidus*
75 mycelium in food has not yet been explored. Within this context, the objective of this work
76 was to evaluate the use of *P. albidus* mycelia BSG flour on antioxidant activity and α -

77 glycosidase enzyme inhibition capacity of cookies. Additionally, the effects on protein and
78 dietary fibre content, coloration and texture of the elaborated cookies were also investigated.

79

80 2. Material and methods

81 2.1 Brewer spent grain (BSG)

82 The BSG derived from the production of an India Pale Ale (IPA) style of beer was provided
83 by the craft brewery Vitrola (Nova Petrópolis, RS, Brazil), with 75.0 ± 1.5 g/100 g of
84 moisture, collected immediately after brewing, packed in containers with a lid and kept under
85 refrigeration ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

86

87 2.2 Macrofungi mycelia

88 The wild strain *Pleurotus albidus* 88F.13 mycelium was used. This strain was collected in São
89 Francisco de Paula city (Rio Grande do Sul, Brazil) under special authorization (process
90 02001.007656 /2012-11), identified through molecular analysis, belongs to the collection of
91 the Laboratory of Enzymes and Biomasses, University of Caxias do Sul (UCS) (Caxias do
92 Sul, RS, Brazil) and is deposited in the mycological collection of the herbarium of UCS under
93 number MIUCS 1586. Maintenance of the mycelium and the inoculum was performed on
94 potato dextrose agar (PDA) medium (Merck, Germany) (Gambato et al., 2016).

95

96 2.3 Solid state culture of BSG with *P. albidus* mycelium

97 To prepare the culture medium, cylindrical flasks (65 mm of diameter and 180 mm of height)
98 containing 200 g of BSG (approximately 75g/100 g of moisture and 70 mm of height in
99 flasks) were autoclaved at 1 atm for 1 h. After cooling, the inoculation procedure was
100 performed with the contents of half of a Petri dish (200 mm of diameter) colonized with
101 mycelium. The flasks were covered with a layer of sterile gauze and cotton and incubated at

102 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 28 days. After cultivation, the total contents (BSG + mycelium) were collected,
103 dried in an oven at 60°C , until the moisture content was below 6 g/100 g, and ground to
104 obtain a myceliated BSG flour (10 mesh) that was kept in a dry and dark place, according to
105 methodology adapted from the literature (Zhai et al., 2015).

106

107 2.4 Cookies with myceliated BSG

108 Cookies were processed in a pilot-scale bakery (Instituto Federal de Santa Catarina, São
109 Miguel do Oeste, SC, Brazil), with ingredients purchased at the local market, according to the
110 following basic formulation (provided by a bakery company): flours (80 g); refined sugar (48
111 g); butter (48 g); chocolate drops (48 g); whole egg (20 g); brown sugar (4.8 g); whole milk
112 powder (4.8 g); vanilla sugar (2 g); ammonia salt (0.8 g) and sodium carbonate (0.6 g). Flours
113 were added according to the proposed mix flours (Table 1). The ingredients of each run were
114 weighed and mixed until a homogeneous mass was obtained. The masses were modelled in a
115 cylindrical format (approximately 40 mm in diameter and 10 mm in thickness) and baked in
116 an oven (Wictory WC-03, Tedesco, Brazil) at 180°C for 10 min. After cooling, cookies were
117 packed.

118

119 2.5 Proximate analysis

120 Samples of BSG flour cultivated by *P. albidus* mycelium and the cookies were characterized
121 by analysis of proximal composition according to AOAC (2016). Moisture, ash, fat, crude
122 protein (CP) and total dietary fibre (TDF) assays were performed (method number 935.29,
123 923.03, 920.85, 920.87 and 991.43, respectively). Carbohydrates were determined by
124 difference, as follows (Equation 1):

125 Carbohydrate (g/100 g) = $100 - (\text{moisture} + \text{ash} + \text{fat} + \text{crude protein} + \text{total dietary fibre})$ (1)

126

127 2.6 Cookies analysis

128 2.6.1 Determination of instrumental colour

129 The colour evaluation on the surface of the cookies was carried out in digital colorimeter with
130 a diffused sphere d/0° (Delta Vista, Delta Color, Brazil) equipped with a three-parameter
131 system of readings, CIE (L*, a*, b*) (Öztürk et al., 2017).

132

133 2.6.2 Water activity (Aw)

134 The water activity was determined at 25° C in LabMaster-AW equipment (Novasina, Suiça).

135

136 2.6.3 Texture analysis

137 The cookies (24 hours after baking) were evaluated for hardness in a TAXT Plus texture
138 analyser (Stable Micro Systems, UK) equipped with Exponent Software version 6.1.11.0, and
139 the maximum force (N) was recorded to cut the cookie, under the following test conditions:
140 probe blade set with knife, load cell of 5 N, pre-test of 1.5 mm.s⁻¹, test of 1.0 mm.s⁻¹, post-test
141 velocity of 5.0 mm.s⁻¹ and an initial knife distance of 20 mm.

142

143 2.7 Antioxidant activity and α-glycosidase enzyme inhibition of cookies

144 2.7.1 Cookie extract

145 For the evaluation of phenolic content, antioxidant activity (DPPH and ABTS assays) and α-
146 glycosidase inhibition were obtained the ethanolic extracts of cookies, based on method
147 previously described (Handa et al., 2016), where approximately 0.6 g of each sample was
148 extracted with 6 mL of ethanol:water (80:20) solution. Vigorous shaken by vortexing (Vortex
149 Mixer, 2500 rpm, Brazil) was performed for 10 s, every 15 min for 1 h at 25°C. Afterwards,
150 the mixtures were placed in an ultrasonic bath (Cristofoli, 42 Hz, Brazil) for 5 min at 25°C,

151 centrifuged at 1800 g and 25°C for 20 min (Centribio, 80-2B-15, Brazil), filtered (Whatmann
152 n1° filter paper).

153

154 2.7.2 Phenolic content (PC)

155 The Folin-Ciocalteu colorimetric method was used to measure the PC of extracts (Singleton
156 and Rossi Jr., 1965). The TPC was expressed in mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram
157 of sample, using a gallic acid calibration curve (Vetec 4444; range of 0,004 – 0,04 mg/mL).

158

159 2.7.3 DPPH· radical scavenging activity

160 The DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was performed using an adapted
161 methodology (Yamaguchi et al., 1998). The results were expressed as % inhibition of the
162 DPPH radical, as follow (equation 2):

$$163 \% \text{ DPPH inhibition} = (\text{Abs standard} - \text{Abs sample}) / (\text{Abs standard}) \times 100 \quad (2)$$

164 Where: Abs standard is the absorbance of standard assay at 517 nm; Abs sample is the
165 absorbance of sample at 517 nm.

166

167 2.7.4 ABTS radical cation

168 An adaptation of an ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) assay
169 method was carried out (Re et al., 1999). The results were expressed as % inhibition of the
170 ABTS^{·+} radical, as follows (equation 3):

$$171 \% \text{ ABTS inhibition} = (\text{Abs standard} - \text{Abs sample}) / (\text{Abs standard}) \times 100 \quad (3)$$

172 Where: Abs standard is the absorbance of the standard assay at 734 nm and Abs sample is the
173 absorbance of the sample at 734 nm.

174

175 2.7.5 Inhibition of % α-glycosidase activity *in vitro*

176 The α -glycosidase enzyme inhibition capacity was performed with the cookie extracts. To
177 evaluate the ability of enzymatic inhibition against α -glycosidase, p-nitrophenyl β -D-
178 glucopyranoside was used as a substrate (de Camargo et al., 2016). To calculate the percent
179 inhibition of α -glycosidase activity, the Equation 4 was used:

180 % α -glycosidase inhibition = (Abs standard – Abs sample)/(Abs standard) x 100 (4)

181 Where: Abs control is the absorbance of the enzyme control assay at 400 nm and Abs sample
182 is the absorbance of the sample assay at 400 nm.

183

184 2.8 Statistical analysis

185 The expression of the results was performed as the average of the results of the experiments,
186 which were carried out in triplicate. For analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p \leq$
187 0.05), Origin software version 8.1 (OriginLab®) were used.

188

189 3. Results and discussion

190 3.1 BSG flour cultivated by *P. albidus* mycelium

191 In this study, the flour obtained from the BSG cultivated in solid state by *P. albidus* mycelium
192 was referred to as mycelia BSG flour. The proximal composition of mycelia BSG flour, on a
193 dry basis, was analysed. The nutritional components present in greater quantity were total
194 dietary fibre (59.07 ± 0.87 g/100 g) and crude protein (22.61 ± 0.02 g/100 g). In less quantity,
195 carbohydrates (12.23 ± 0.66 g/100 g), ash (4.05 ± 0.11 g/100 g) and fat (2.04 ± 0.22 g/100 g)
196 were also found. Fungal mycelial growth in BSG promoted an increase in total dietary fibre,
197 protein content and ash. On the other hand, carbohydrates and lipids decreased, evidencing
198 that the bioprocess increased the nutritional value of the BSG, which characterizes it as a
199 mycoprotein and presenting the potential to enrich the food formulation.

200

201 3.2 Nutritional components of cookies

202 Cookies were obtained with mixtures of wheat flour and mycelia BSG flour, in different
203 proportions. Proximal composition of the cookies was evaluated (Table 1). Cookies obtained
204 with higher proportions of mycelia BSG flour in the flour mixtures presented higher contents
205 of crude protein (11.60 g/100 g), total dietary fibre (32.35 g/100 g) and ash (1.90 g/100 g),
206 and the lower carbohydrate content (27.88 g/100 g). When comparing the amount of protein
207 in cookies with a ratio of 1:0 and 0:1 (wheat flour:mycelia BSG flour), an increase of
208 approximately 67% is observed, which is due to the high protein content of *P. albidus*
209 mycelium grown on BSG (mycoprotein). Another study reported that bread produced with an
210 additional 50 g/kg of chickpea flour with *Cordyceps militaris* mycelia had 10.3% more
211 protein than bread with wheat flour (Xiao et al., 2016). Regarding the dietary fibre content,
212 the development of mycoprotein through solid state cultivation increased the original value of
213 the BSG fibres. Thus, BSG, already recognized by its quantity of fibres (Mussatto et al.,
214 2006), became even more interesting in this regard after cultivation with *P. albidus* mycelium.
215 It was observed that the cookies with the highest proportion of mycelia BSG flour had 4.3
216 times more fibre than the cookies that only contained wheat flour.

217 Among the constituents of the dietary fibre of *Pleurotus* spp., β-glucans are the major
218 components. The health effects of *Pleurotus* spp. are mainly due to its fibre fraction, which is
219 comprised of glucans, chitin, mannoproteins, galactomannans, cellulose and polyglucuronic
220 acids (Lavelli et al., 2018).

221

222 3.3 Colour and water activity

223 The colour of the cookies was evaluated through three colour parameters: luminosity (L*),
224 green-red colour intensity (a*) and blue-yellow colour intensity (b*). The use of mycelia BSG
225 flour in the mixture to obtain the cookies resulted in significative differences ($p < 0.05$) in the
226 color parameters L* and b*. The 1:0 combination (wheat flour:mycelia BSG flour) resulted in

227 cookies with the highest values of L* and b* at 52.55 and 35.16, respectively. That is, cookies
228 produced with only wheat flour were whiter and more yellow than those with flour blends
229 (Table 2).

230 The luminosity (L*) of cookies was directly related to the amount of protein in the
231 ingredients. Since the addition of mycelia BSG flour increased the protein content of the
232 cookies, this may have contributed to the browning of the cookies due to the Maillard reaction
233 (Chauhan et al., 2015), which occurs in the presence of reducing sugars and amino acids,
234 forming compounds that contribute to the flavour (Cauvain, 2015). The results for luminosity
235 of the present study agree with Xiao et al. (2016), which demonstrate that the incorporation of
236 fermented chickpea flour by *C. militaris* also resulted in a decrease in the value of L* in
237 baking product.

238 Water activity (Aw) values ranged from 0.424 to 0.500. Generally, cookies with mycelia BSG
239 flour presented lower Aw (Table 2).

240

241 3.4 Texture analysis

242 The instrumental texture of the cookies formulated with mixtures of wheat flour and mycelia
243 BSG flour showed values of hardness ranging from 32.31 to 112.45 N (Table 2).

244 The use of BSG in food formulation has some limitations. Due to changes in hardness, colour
245 and flavour of the final product, some authors recommend that a maximum of 10% wheat
246 flour be substituted with BSG flour (Mussatto et al., 2006; Steiner et al., 2015). However, it is
247 revealing to consider that in the present research, the BSG used was cultivated with mycelium
248 from *P. albidus*, producing modifications in its structure due to the action of enzymes
249 excreted during growth, resulting in the degradation of the lignocellulosic content
250 (Wanzenböck et al., 2017) responsible for undesired texture in bakery products (Mussatto et
251 al., 2006); thus, the substitution of wheat flour at levels higher than those recommended in the

252 literature was considered. As reported by Xiao et al. (2016), breads with added chickpea flour
253 cultivated with fungal mycelium are softer (2.893 ± 0.190 N) than breads with wheat flour
254 (4.377 ± 0.091 N).

255 Although the cookies with mycelia BSG flour had less appreciated texture characteristics than
256 the wheat flour cookies due to its greater hardness, the incorporation of mycelia BSG in foods
257 promotes several nutritional benefits, such as protein enrichment and an increase of dietary
258 fibre; thus, being a potential ingredient for functional foods.

259

260 3.5 Phenolic content (PC) and antioxidant activity

261 In this study, the ethanolic extracts obtained from cookies were evaluated for PC and
262 antioxidant activity *in vitro* through the DPPH and ABTS assays (Table 3). Higher values
263 were obtained in the cookies with the largest amount of mycelia BSG flour, 2.54 ± 0.14 (mg
264 GAE/g), 58.8 ± 1.0 % DPPH radical inhibition and 39.4 ± 2.0 % ABTS radical inhibition.

265 Substances capable of retarding, preventing or eliminating oxidative cellular damage caused
266 by reactive species are known as antioxidants, which can be divided into two large groups of
267 molecules, enzymatic and non-enzymatic, and include phenolic compounds and low-
268 molecular weight. Molecules found in plants and fungi are part of the group of antioxidant
269 molecules (Gambato et al., 2016; Gutteridge and Halliwell, 2010). Considering the results of
270 the PC, DPPH and ABTS responses (Table 3), it appears that there is a relationship between
271 phenolic content and the respective antioxidant activity of cookies. Therefore, it can be
272 inferred that part of the observed antioxidant activity can be attributed to phenolic
273 compounds. On the other hand, Chauhan, Saxena, & Singh (2015) suggested that the increase
274 in antioxidant activity of cookies with the incorporation of germinated amaranth flour was
275 attributed to the dark pigments with reported antioxidant activity, which was formed by the
276 Maillard reaction during roasting.

277

278 3.6 Inhibition of α -glycosidase activity *in vitro*

279 Experimental data of α -glycosidase enzyme inhibition *in vitro* assay of cookies shows that the
280 use of BSG flour cultivated with *P. albidus* mycelia to formulate cookies had a strong positive
281 effect on α -glycosidase inhibition capacity, being able to inhibit up to 74.9 % of the α -
282 glycosidase enzyme activity (Table 3). On the other hand, meaning that the presence of white
283 flour in the mixture, however small, resulted in cookies with low or any amount of α -
284 glycosidase inhibition capacity. The α -glycosidase inhibitory effect exhibited by cookies with
285 higher proportions of mycelia BSG flour may be related to the total dietary fibres and
286 phenolic content of the cookies. However, it has been reported that other components of
287 barley, such as proteins, may potentially contribute to the inhibition of the activity of
288 digestive enzymes (Ramakrishna et al., 2017). The reported α -glycosidase inhibition capacity
289 of cookies may be the most relevant data in the present study.

290 In another recent study, the incorporation of *P. sajor-caju* mushroom powder into biscuits
291 reduced its glycaemic index due to the presence of dietary fibres that decreased the
292 digestibility of the starch present in the food (Ng et al., 2017). Dietary fibres, especially
293 glucans, which are a soluble dietary fibre, are known to reduce the postprandial glycaemic
294 response (Steiner et al., 2015). New ingredients, such as mycelia BSG flour, added to foods
295 may influence the activity of enzymes involved in the onset of various diseases, such as
296 diabetes mellitus (Jakubczyk, 2018).

297

298 4. Conclusions

299 This study demonstrated that the use of *P. albidus* mycelia BSG flour enhanced the nutritional
300 value of the cookies, which presented more protein and dietary fibre than the cookies that
301 contained only wheat flour. Regarding the colour and texture characteristics, larger

302 proportions of mycelia BSG flour in the mixtures made the cookies darker and harder than
303 those with only wheat flour. Furthermore, there was evidence of an increase in the phenolic
304 content and the antioxidant activity of the cookies with mycelia BSG flour. As for α -
305 glycosidase enzyme inhibition activity *in vitro*, cookies with total substitution of wheat flour
306 for mycelia BSG flour showed inhibitory effects against the glycosidase enzyme. Despite the
307 undesirable effects on the colour and texture of the cookies, the incorporation of mycelia BSG
308 flour is advantageous in the sense that it increases the nutritional value and antioxidant
309 activity of the products developed, making it a promising ingredient in the development of
310 foods with functional and nutraceutical properties.

311

312 Compliance with Ethical Standards

313 The authors declare that they have no conflict of interest.

314

315 Acknowledgements

316 The authors thank the University of Caxias do Sul (UCS), Federal Institute of Santa Catarina
317 (IFSC) - Campus São Miguel do Oeste and CAPES-Embrapa 15/2014 for technical and
318 financial support.

319

320 References

- 321 Akata, I., Zengin, G., Picot, C.M.N., Mahomoodally, M.F., 2019. Enzyme inhibitory and
322 antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. South
323 African J. Bot. 120, 95–99. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2018.01.008>
- 324 Albanese, L., Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Pagliaro, M., 2018. Innovative beer-brewing of
325 typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. J. Clean. Prod. 171, 297–
326 311. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.027>

- 327 Alvarenga, R.L.M., Naves, L.R.R., Xavier-Santos, S., 2015. The Genus Auricularia Bull. ex
328 Juss. (Basidiomycota) in Cerrado (Brazilian Savanna) areas of Goiás state and the Federal
329 District , Brazil. Mycrosphere 6, 532–541. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/5/3>
- 330 Anderson, R.A., 1982. Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-
331 cooked small grain products. Cereal Chem. 59, 265–269.
- 332 Anupama, Ravindra, P., 2000. Value-added food: Single cell protein. Biotechnol. Adv. 18, 459–
333 479. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8)
- 334 AOAC, 2016. Official Methods of Analysis, 20th ed. AOAC International.
- 335 Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Development of a Novel
336 Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. Food Anal. Methods 7, 217–
337 223. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9621-9>
- 338 Bisaria, R., Madan, M., Vasudevan, P., 1997. Utilisation of agro-residues as animal feed
339 through bioconversion. Bioresour. Technol. 59, 5–8. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00140-X](https://doi.org/10.1016/S0960-
340 8524(96)00140-X)
- 341 Bonny, S.P.F., Gardner, G.E., Pethick, D.W., Hocquette, J.F., 2015. What is artificial meat and
342 what does it mean for the future of the meat industry? J. Integr. Agric. 14, 255–263.
343 [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60888-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60888-1)
- 344 Brozzoli, V., Bartocci, S., Terramoccia, S., Contò, G., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli,
345 M., 2010. Stoned olive pomace fermentation with Pleurotus species and its evaluation as
346 a possible animal feed. Enzyme Microb. Technol. 46, 223–228.
347 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.008>
- 348 Cai, S., Wang, O., Wang, M., He, J., Wang, Y., Zhang, D., Zhou, F., Ji, B., 2012. In vitro
349 inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of
350 fermented oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids. J. Agric.
351 Food Chem. 60. <https://doi.org/10.1021/jf3009958>

- 352 Camargo, L.R., Silva, L.M., Komeroski, M.R., Kist, T.B.L., Rodrigues, C.E., Rios, A. de O.,
353 Silva, M.M., Doneda, D., Schmidt, H. de O., Oliveira, V.R., 2018. Effect of whey protein
354 addition on the nutritional, technological and sensory quality of banana cake. *Int. J. Food*
355 *Sci. Technol.* 53, 2617–2623. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13857>
- 356 Canedo, M.S., de Paula, F.G., da Silva, F.A., Vendruscolo, F., 2016. Protein enrichment of
357 brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess*
358 *Biosyst. Eng.* 39, 1105–1113. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1587-8>
- 359 Cantele, C., Fontana, R.C., Mezzomo, A.G., da Rosa, L.O., Poleto, L., Camassola, M., Dillon,
360 A.J.P., 2017. Production, characterization and dye decolorization ability of a high level
361 laccase from *Marasmiellus palmivorus*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 12, 15–22.
362 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.012>
- 363 Castro-Alves, V.C., Gomes, D., Menolli, N., Sforça, M.L., Nascimento, J.R.O. do, 2017.
364 Characterization and immunomodulatory effects of glucans from *Pleurotus albidus*, a
365 promising species of mushroom for farming and biomass production. *Int. J. Biol.*
366 *Macromol.* 95, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.059>
- 367 Cauvain, S.P., 2015. Cookies, Biscuits and Crackers: Formulation, Processing and
368 Characteristics, 2nd ed, *Encyclopedia of Food Grains*: Second Edition. Elsevier Ltd.
369 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00119-4>
- 370 Chauhan, A., Saxena, D.C., Singh, S., 2015. Total dietary fibre and antioxidant activity of
371 gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus spp.*) flour.
372 *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 939–945. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.115>
- 373 Cheng, Y.F., Bhat, R., 2016. Functional, physicochemical and sensory properties of novel
374 cookies produced by utilizing underutilized jering (*Pithecellobium jiringa* Jack.) legume
375 flour. *Food Biosci.* 14, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.03.002>
- 376 Cooray, S.T., Chen, W.N., 2018. Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state

- 377 fermentation to enhance nutritional value. *J. Funct. Foods* 42, 85–94.
378 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.027>
- 379 Corrêa, R.C.G., Barros, L., Fernandes, Â., Sokovic, M., Bracht, A., Peralta, R.M., Ferreira,
380 I.C.F.R., 2018. A natural food ingredient based on ergosterol: Optimization of the
381 extraction from: *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in
382 yogurts. *Food Funct.* 9, 1465–1474. <https://doi.org/10.1039/c7fo02007d>
- 383 Dalla-Santa, H.S., Rubel, R., Vítola, F.M.D., Rodrigues-Leon, J.A., Dalla-Santa, O.R., Brand,
384 D., Alvaréz, D.C., Macedo, R.E.F., Carvalho, J.C., Soccol, C.R., 2012. Growth parameters
385 of *Agaricus brasiliensis* mycelium on wheat grains in solid-state fermentation.
386 *Biotechnology* 11, 144–153.
- 387 de Camargo, A., Regitano-d'Arce, M.A.B., Telles Biasoto, C., Shahidi, F., 2016. Enzyme-
388 assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and
389 inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chem.* 212, 395–402.
390 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.047>
- 391 Dias, E.S., 2010. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. *Ciência*
392 e Agrotecnologia. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000400001>
- 393 Đorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I., 2010. Effect of
394 fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.*
395 119, 957–963. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.049>
- 396 Doreau, M., Ferlay, A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a
397 review. *Livest. Prod. Sci.* 43, 97–110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226\(95\)00041-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226(95)00041-I)
- 399 Dubost, N.J., Beelman, R.B., Peterson, D., Royse, D.J., 2006. Identification and quantification
400 of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy.
401 *Int. J. Med. Mushrooms* 8, 215–222. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v8.i3.30>

- 402 Dubost, N.J., Ou, B., Beelman, R.B., 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in
403 cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.* 105, 727–
404 735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.030>
- 405 Dwivedi, M., Vasantha, K.Y., Sreerama, Y.N., Haware, D.J., Singh, R.P., Sattur, A.P., 2015.
406 Nilamadana, new fungal fermented cereal based food. *J. Funct. Foods* 15, 217–224.
407 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.023>
- 408 FAO, 2017. The State of Food and Agriculture. Leveraging Food Systems for Inclusive Rural
409 Transformation.
- 410 Fărcaş, A.C., Socaci, S.A., Dulf, F. V., Tofană, M., Mudura, E., Diaconeasa, Z., 2015. Volatile
411 profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-
412 product with potential use in the development of new functional foods. *J. Cereal Sci.* 64,
413 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.003>
- 414 Gambato, G., Pavão, E.M., Chilanti, G., Fontana, R.C., Salvador, M., Camassola, M., 2018.
415 Pleurotus albidus modulates mitochondrial metabolism disrupted by hyperglycaemia in
416 EA . hy926 endothelial cells. *Biomed Res. Int.* 2018, 1–10.
417 <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/2859787>
- 418 Gambato, G., Todescato, K., Pavão, E.M., Scortegagna, A., Fontana, R.C., Salvador, M.,
419 Camassola, M., 2016. Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state
420 cultivated macrofungi Pleurotus albidus and Pycnoporus sanguineus. *Bioresour. Technol.*
421 207, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.121>
- 422 Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M., Pohleven, F., 2008. The use of spent brewery
423 grains for Pleurotus ostreatus cultivation and enzyme production. *N. Biotechnol.* 25, 157–
424 161. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.08.003>
- 425 Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths.
426 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>

- 427 Handa, C.L., De Lima, F.S., Guelfi, M.F.G., Georgetti, S.R., Ida, E.I., 2016. Multi-response
428 optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from
429 fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chem.* 197, 175–184.
430 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.124>
- 431 Heleno, S.A., Diz, P., Prieto, M.A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R.,
432 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus*
433 *bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet
434 extraction. *Food Chem.* 197, 1054–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>
- 435 Jakubczyk, A., 2018. Effect of addition of fermented bean seed flour on the content of bioactive
436 components and nutraceutical potential of wheat wafers. *LWT - Food Sci. Technol.* 98,
437 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.052>
- 438 Jayasingheachchi, H., Seneviratne, G., 2004. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen ? *J.*
439 *Biosci.* 29, 293–296.
- 440 Kaewnarin, K., Suwannarach, N., Kumla, J., Lumyong, S., 2016. Phenolic profile of various
441 wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-
442 tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. *J. Funct. Foods* 27, 352–364.
443 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.008>
- 444 Kang, M., Zhai, F.H., Li, X.-X., Cao, J.-L., Han, J.-R., 2017. Total phenolic contents and
445 antioxidant properties of buckwheat fermented by three strains of *Agaricus*. *J. Cereal Sci.*
446 73, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.12.012>
- 447 Kim, J., Lim, J., Bae, I.Y., Park, H.G., Gyu Lee, H., Lee, S., 2010. Particle size effect of lentinus
448 edodes mushroom (chamsong-i) powder on the physicochemical, rheological, and oil-
449 resisting properties of frying batters. *J. Texture Stud.* 41, 381–395.
450 <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2010.00231.x>
- 451 Kurt, A., Gençelep, H., 2018. Enrichment of meat emulsion with mushroom (*Agaricus*

- 452 bisporus) powder : Impact on rheological and structural characteristics. *J. Food Eng.* 237,
453 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.028>
- 454 Lavelli, V., Proserpio, C., Gallotti, F., Laureati, M., Pagliarini, E., 2018. Circular reuse of bio-
455 resources: The role of: *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. *Food Funct.*
456 9, 1353–1372. <https://doi.org/10.1039/c7fo01747b>
- 457 Lechner, B.E., Albertó, E., 2011. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to
458 improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production.
459 *Rev. Iberoam. Micol.* 28, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.12.001>
- 460 Li, S., Chen, Y., Li, K., Lei, Z., Zhang, Z., 2016. Characterization of physicochemical properties
461 of fermented soybean curd residue by *Morchella esculenta*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*
462 109, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.01.020>
- 463 Liang, C.H., Syu, J.L., Lee, Y.L., Mau, J.L., 2009. Antioxidant properties of solid-state
464 fermented adlay and rice by *Phellinus linteus*. *Food Chem.* 116, 841–845.
465 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.024>
- 466 Lin, M., Humbert, E., Sosulski, F., 1974. Certain Functional Properties of Sunflower meal
467 Products. *J. Food Sci.* 39, 368–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x>
- 468 Lynch, K.M., Steffen, E.J., Arendt, E.K., 2016. Brewers' spent grain: a review with an emphasis
469 on food and health. *J. Inst. Brew.* 122, 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- 470 Menolli, N., Breternitz, B.S., Capelari, M., 2014. The genus *Pleurotus* in Brazil: A molecular
471 and taxonomic overview. *Mycoscience* 55, 378–389.
472 <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.12.001>
- 473 Mole, S., Rogler, J.C., Butler, L.G., 1993. Growth reduction by dietary tannins: Different
474 effects due to different tannins. *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 667–677.
475 [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90071-X)
- 476 Moran, L.A., Horton, H.R., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D., 2013. *Bioquímica*, 5th ed. Pearson

- 477 Education do Brasil, São Paulo.
- 478 Moreira, C., Furlong, E.B., 2007. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em
479 farelos fermentados em estado sólido. Ciênc. e Tecnol. Aliment. 27, 805–811.
480 <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400021>
- 481 Muhlack, R.A., Potumarthi, R., Jeffery, D.W., 2018. Sustainable wineries through waste
482 valorisation : A review of grape marc utilisation for value-added products. Waste Manag.
483 72, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>
- 484 Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., 2006. Brewers' spent grain: Generation,
485 characteristics and potential applications. J. Cereal Sci. 43, 1–14.
486 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- 487 Nayan, N., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H., Cone, J.W., 2018a. Screening of white-rot
488 fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. J. Appl. Microbiol. 125, 468–
489 479. <https://doi.org/10.1111/jam.13894>
- 490 Nayan, N., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H., Cone, J.W., 2018b. Variation in the
491 solubilization of crude protein in wheat straw by different white-rot fungi. Anim. Feed Sci.
492 Technol. 242, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.06.009>
- 493 Neifar, M., Jaouani, A., Ayari, A., Abid, O., Ben, H., Boudabous, A., Najar, T., Ellouze, R.,
494 2013. Improving the nutritive value of Olive Cake by solid state cultivation of the
495 medicinal mushroom *Fomes fomentarius*. Chemosphere.
496 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.015>
- 497 Ng, S.H., Robert, S.D., Wan Ahmad, W.A.N., Wan Ishak, W.R., 2017. Incorporation of dietary
498 fibre-rich oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) powder improves postprandial
499 glycaemic response by interfering with starch granule structure and starch digestibility of
500 biscuit. Food Chem. 227, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.108>
- 501 Nitayapat, N., Prakarnsombut, N., Lee, S.J., Boonsupthip, W., 2015a. Bioconversion of

- 502 tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the
503 final products. LWT - Food Sci. Technol. 63, 773–779.
504 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.016>
- 505 Nitayapat, N., Prakarnsombut, N., Lee, S.J., Boonsupthip, W., 2015b. Bioconversion of
506 tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the
507 final products. LWT - Food Sci. Technol. 63, 773–779.
508 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.016>
- 509 Öztürk, S., Cerit, İ., Mutlu, S., Demirkol, O., 2017. Enrichment of cookies with glutathione by
510 inactive yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*): Physicochemical and functional
511 properties. J. Cereal Sci. 78, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.019>
- 512 Pardo, A., Perona, M.A., Pardo, J., 2007. Indoor composting of vine by-products to produce
513 substrates for mushroom cultivation. Spanish J. Agric. Res. 5, 417–424.
514 <https://doi.org/https://doi.org/10.5424/sjar/2007053-260>
- 515 Pardo, A., Perona, M.A., Pardo, J., 2005. Use of grapevine stem in the elaboration of specific
516 substrates for *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer cultivation. ITEA Inf. Tec. Econ.
517 Agrar. 101, 59–69.
- 518 Perera, P.K., Li, Y., 2011. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and
519 ameliorating diabetes. Funct. Foods Heal. Dis. 1, 161–171.
- 520 Petre, M., Pătrulescu, F., Teodorescu, R.I., 2015. Controlled Cultivation of Mushrooms on
521 Winery and Vineyard Wastes, in: Mushroom Biotechnology: Developments and
522 Applications. pp. 31–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802794-3.00003-5>
- 523 Petre, M., Teodorescu, A., Ricu, G., 2005. The growing effect of vineyard and winery wastes
524 on the production of mycelia and fruit bodies of edible and medicinal fungi. Int. J. Med.
525 Mushrooms 7, 444–445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v7.i3.830>
- 526 Postemsky, P.D., Bidegain, M.A., González-Matute, R., Figlas, N.D., Cubitto, M.A., 2017.

- 527 Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms
528 and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*.
529 *Bioresour. Technol.* 231, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- 530 Raghavendra, S.N., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Tharanathan, R.N., 2004. Dietary
531 fiber from coconut residue: Effects of different treatments and particle size on the
532 hydration properties. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 563–567.
533 <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0889-2>
- 534 Ramakrishna, R., Sarkar, D., Schwarz, P., Shetty, K., 2017. Phenolic linked anti-hyperglycemic
535 bioactives of barley (*Hordeum vulgare L.*) cultivars as nutraceuticals targeting type 2
536 diabetes. *Ind. Crops Prod.* 107, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.033>
- 537 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Min Yang, A., Catherine, R.-E., 1999.
538 Antioxidant Activity Applying an improved ABTS radical. *Free Radic. Biol. Med.* 26,
539 1231–1237.
- 540 Rodrigues, C.E., Tonial, M., Schäfer, L., Pasquali, G., Kist, T.B.L., 2018. Performance of
541 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a derivatization reagent for the
542 analysis of medium and long chain fatty acids using HPLC with LIF detection. *J.*
543 *Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1100–1101, 50–57.
544 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.043>
- 545 Rosa, L.O., Wasum, R.A., Dillon, A.J.P., 2016. Macrofungos (Filo basidiomycota) do Sul do
546 Brasil: levantamento e verificação da capacidade de secreção de enzimas ligninolíticas.,
547 1st ed. Novas Edições Acadêmicas, Saarbrücken.
- 548 Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-García, M., Esqueda, M., 2002. Biodegradation of Viticulture
549 Wastes by Pleurotus : A Source of Microbial and Human Food and Its Potential Use in
550 Animal Feeding. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2537–2542. <https://doi.org/10.1021/jf011308s>
- 551 Shen, P., Shiao, M.-S., Chung, H.-R., Lee, K.-R., Chao, Y.-S., Hunt, V.M., 1996. Liquid

- 552 chromatographic determination of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase
553 inhibitors. *J. Chinese Chem. Soc.* 43, 451–457.
- 554 Silva, D.D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., Hyde, K.D., 2013.
555 Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and
556 chemistry. *Fungal Divers.* 62, 1–40. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0265-2>
- 557 Singleton, V.L., Rossi Jr., J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-
558 Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
559 <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>
- 560 Siri, N., Lacroix, M., Garrigues, J.C., Poinsot, V., Couderc, F., 2006. HPLC-fluorescence
561 detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines
562 labelled with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde. *Electrophoresis* 27, 4446–4455.
563 <https://doi.org/10.1002/elps.200600165>
- 564 Sorrentino, F., Roy, I., Keshavarz, T., 2010. Impact of linoleic acid supplementation on
565 lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 65–
566 73. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2722-0>
- 567 Souilem, F., Fernandes, Â., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A.,
568 Ferreira, I.C.F.R., 2017. Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive
569 compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chem.* 230,
570 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.026>
- 571 Steiner, J., Procopio, S., Becker, T., 2015. Brewer's spent grain: source of value-added
572 polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res.
573 Technol.* 241, 303–315. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>
- 574 Stephan, A., Ahlborn, J., Zajul, M., Zorn, H., 2018. Edible mushroom mycelia of *Pleurotus*
575 *sapidus* as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality
576 and sensory tests in comparison to commercial proteins and meat sausages. *Eur. Food Res.*

- 577 Technol. 244, 913–924. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3012-1>
- 578 Ulzijargal, E., Yang, J.-H., Lin, L.-Y., Chen, C.-P., Mau, J.-L., 2013. Quality of bread
579 supplemented with mushroom mycelia. Food Chem. 138, 70–76.
580 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.051>
- 581 Vendruscolo, F., Ribeiro, C.S., Espósito, E., Ninow, J.L., 2009. Tratamento biológico do
582 bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient. 13,
583 487–493. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662009000400018>
- 584 Wang, C.-Y., Wu, S.-J., Shyu, Y.-T., 2014. Antioxidant properties of certain cereals as affected
585 by food-grade bacteria fermentation. J. Biosci. Bioeng. 117, 449–456.
586 <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2013.10.002>
- 587 Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M., 2001. Biological efficiency and nutritional value of
588 Pleurotus ostreatus cultivated on spent beer grain. Bioresour. Technol. 78, 293–300.
589 [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00002-5)
- 590 Wanzenböck, E., Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Zitz, U., Kracher, D., Schedle, K., Kneifel, W.,
591 2017. Wheat bran biodegradation by edible Pleurotus fungi – A sustainable perspective
592 for food and feed. LWT - Food Sci. Technol. 86, 123–131.
593 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.051>
- 594 Wilcox, M.D., Brownlee, I.A., Richardson, J.C., Dettmar, P.W., Pearson, J.P., 2014. The
595 modulation of pancreatic lipase activity by alginates. Food Chem. 146, 479–484.
596 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.075>
- 597 Xiao, Y., Huang, L., Chen, Y., Zhang, S., Rui, X., Dong, M., 2016. Estudio comparativo de los
598 efectos de la adición de harina de garbanzo fermentado y no fermentado en la calidad y las
599 propiedades antioxidantes del pan de trigo. CYTA - J. Food 14, 621–631.
600 <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1188157>
- 601 Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2015. Effect of solid-state

- 602 fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 on physicochemical and functional
603 properties of chickpea (*Cicer arietinum L.*) flour. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 1317–
604 1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.046>
- 605 Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J., 1998. HPLC Method for Evaluation of
606 the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.
607 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1201–1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>
- 608 Yang, H., Zhou, H., Wu, Z., Yang, H., Zhang, M., 2018. Production, physico-chemical
609 characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of
610 the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Biosci.* 26, 49–56.
611 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.008>
- 612 Yang, X.W., Huang, M.Z., Jin, Y.S., Sun, L.N., Song, Y., Chen, H.S., 2012. Phenolics from
613 *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia* 83, 1169–1175.
614 <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.07.005>
- 615 Zengin, G., Karanfil, A., Uren, M.C., Kocak, M.S., Sarikurkcu, C., Gungor, H., Nancy Picot,
616 C.M., Mahomoodally, M.F., 2016. Phenolic content, antioxidant and enzyme inhibitory
617 capacity of two: *Trametes* species. *RSC Adv.* 6, 73351–73357.
618 <https://doi.org/10.1039/c6ra09991b>
- 619 Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., Ceylan, O., 2014. A comprehensive
620 study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to
621 Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin
622 diseases and type II diabetes. *Ind. Crops Prod.* 53, 244–251.
623 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>
- 624 Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L.A., Queiroz, M.I., 2010.
625 Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica*
626 Nägeli. *Bioresour. Technol.* 101, 7107–7111.

- 627 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.001>
- 628 Zhai, F.-H., Han, J.-R., 2016. Mycelial biomass and intracellular polysaccharides yield of edible
629 mushroom *Agaricus blazei* produced in wheat extract medium. LWT - Food Sci. Technol.
630 66, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.010>
- 631 Zhai, F.-H., Wang, Q., Han, J.-R., 2015. Nutritional components and antioxidant properties of
632 seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. J. Cereal Sci. 65,
633 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.010>
- 634 Zhao, H.M., Guo, X.N., Zhu, K.X., 2017. Impact of solid state fermentation on nutritional,
635 physical and flavor properties of wheat bran. Food Chem. 217, 28–36.
636 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.062>
- 637 Zhu, Z.Y., Guo, M.Z., Liu, F., Luo, Y., Chen, L., Meng, M., Wang, X.T., Zhang, Y.M., 2016.
638 Preparation and inhibition on α -D-glucosidase of low molecular weight polysaccharide
639 from *Cordyceps militaris*. Int. J. Biol. Macromol. 93, 27–33.
640 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.058>
- 641 Zou, Y., Ma, K., 2018. Screening of *Auricularia auricula* strains for strong production ability
642 of melanin pigments. Food Sci. Technol. 38, 41–44. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.00117>
- 644
- 645

Table 1

Proposed flour mixtures and nutritional components of cookies (on dry basis).

Run	Flour mixture*		CP (g/100 g)	TDF (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Carbohydrate** (g/100 g)
	x_1	x_2					
1	1	0	6.93 ± 0.02 ^e	7.41 ± 1.12 ^c	25.08 ± 1.56 ^a	0.26 ± 0.01 ^e	57.50 ± 2.60 ^c
2	0	1	11.60 ± 0.35 ^a	32.35 ± 0.93 ^a	24.04 ± 0.98 ^a	1.90 ± 0.16 ^a	27.88 ± 2.40 ^a
3	0.5	0.5	10.75 ± 0.26 ^b	21.05 ± 0.40 ^b	23.98 ± 1.07 ^a	0.64 ± 0.23 ^d	40.68 ± 1.05 ^b
4	0.75	0.25	8.68 ± 0.14 ^d	9.77 ± 0.10 ^c	25.07 ± 0.51 ^a	1.13 ± 0.15 ^c	54.18 ± 1.43 ^c
5	0.25	0.75	9.59 ± 0.23 ^c	22.93 ± 1.36 ^b	25.36 ± 2.59 ^a	1.63 ± 0.08 ^b	36.50 ± 4.46 ^b

* Proportion of wheat flour: *P. albidus* mycelia brew spent grain (BSG) flour (x_1 : x_2), respectively.

** Carbohydrate were determined by difference.

CP = Crude protein, TDF = Total dietary fibre.

a,b,c,d,e Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.**Table 2**

Physic-chemical and physical characteristics of cookies

Run	Flour mixture*		Aw	<i>L</i>	a	b	Hardness (N)
	x_1	x_2					
1	1	0	0.500 ± 0.010 ^a	52.55 ± 5.12 ^a	12.73 ± 1.18 ^a	35.16 ± 1.40 ^a	32.31 ± 1.71 ^d
2	0	1	0.450 ± 0.003 ^b	25.45 ± 2.26 ^d	11.28 ± 0.30 ^a	19.75 ± 1.34 ^c	112.45 ± 5.43 ^a
3	0.5	0.5	0.441 ± 0.002 ^b	34.95 ± 2.57 ^b	11.11 ± 0.78 ^a	23.48 ± 0.81 ^b	95.54 ± 3.52 ^b
4	0.75	0.25	0.424 ± 0.004 ^c	34.20 ± 2.84 ^{bc}	12.40 ± 0.58 ^a	23.74 ± 1.47 ^b	75.38 ± 2.84 ^c
5	0.25	0.75	0.425 ± 0.002 ^c	28.65 ± 1.85 ^{cd}	10.98 ± 1.02 ^a	20.41 ± 0.76 ^c	71.27 ± 0.81 ^c

* Proportion of wheat flour: *P. albidus* mycelia brew spent grain (BSG) flour (x_1 : x_2), respectively.

Aw: water activity.

a,b,c,d Values determined in triplicate. Equal letters in the same column, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

Table 3Antioxidant activity and α -glycosidase inhibition capacity of cookies extract.

Run	Flour mixture*		PC (mg GAE/g)	DPPH (%)	ABTS (%)	α -glycosidase inhibition (%)
	x_1	x_2				
1	1	0	1.37 ± 0.06 ^b	22.7 ± 0.9 ^e	5.3 ± 1.0 ^c	0.00
2	0	1	2.54 ± 0.14 ^a	58.8 ± 1.0 ^a	39.4 ± 2.0 ^a	74.9 ± 5.0 ^a
3	0.5	0.5	2.51 ± 0.04 ^a	45.7 ± 1.3 ^d	29.4 ± 1.0 ^b	0.00
4	0.75	0.25	1.43 ± 0.02 ^b	50.4 ± 0.9 ^c	33.3 ± 2.0 ^b	0.00
5	0.25	0.75	2.27 ± 0.33 ^a	54.6 ± 1.5 ^b	40.3 ± 2.3 ^a	2.5 ± 2.0 ^b

* Proportion of wheat flour: *P. albidus* mycelia brew spent grain (BSG) flour (x_1 : x_2), respectively.

PC = Phenolic content, GAE = gallic acid equivalent.

^{a,b,c,d,e} Values were determined in triplicate. Equal letters in the same column, indicate that there is no significant difference at 5 % ($p < 0.05$) in the parameter evaluated.

5 DISCUSSÃO GERAL

Macrofungos comestíveis e/ou com propriedades medicinais são utilizados há tempos por alguns povos, principalmente de países asiáticos (Sokovic *et al.*, 2018). Assim como o processo de CES é utilizado há séculos para a produção de alimentos (Pandey, 2003; Soccol *et al.*, 2017). No entanto, o cultivo de macrofungos em matérias-primas vegetais por meio do CES como uma estratégia para agregar valor mediante o crescimento da biomassa micelial e pela produção de seus metabólitos, capazes de alterar a composição original dos meios de cultivo, é uma temática de estudos recente (Divate *et al.*, 2017; Wanzenböck *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2015; Zhai *et al.*, 2018).

No presente trabalho, foi desenvolvido o estudo com intuito de analisar as propriedades nutricionais de matérias-primas vegetais (grãos e bagaços) utilizadas no cultivo em estado sólido de micélios de macrofungos nativos do Brasil. Para tanto, foram obtidas farinhas a partir dos grãos e dos bagaços colonizados com os micélios que pudessem ser utilizadas na alimentação humana ou na nutrição animal, dentro do conceito de micoproteínas ou proteínas fúngicas.

Considerando esses aspectos, na primeira etapa do trabalho, os fungos *A. blazei*, *A. fuscouscinea* e *P. albidus* foram estudados com o objetivo de obter farinhas de grãos (arroz integral, milho canjica e trigo) colonizados pela técnica de CES. Na segunda etapa, a fim de explorar novas possibilidades para o aproveitamento de resíduos agroindustriais abundantes na região da Serra Gaúcha, estudou-se a biotransformação de bagaços de malte de cevada e de uva mediante o CES dos fungos *A. blazei*, *A. fuscouscinea* e *P. albidus*, dos quais também foram obtidas farinhas a partir da moagem dos bagaços colonizados.

Em ambas etapas do desenvolvimento experimental foram investigados aspectos como do enriquecimento nutricional decorrente do crescimento micelial dos fungos nas matérias-

primas, sobretudo em relação ao teor proteico, o qual poderia mostrar incremento devido ao crescimento da biomassa fúngica (micoproteína). Foram determinados os conteúdos de macronutrientes, perfil de aminoácidos, compostos bioativos, atividades antioxidantes, antiobesidade e antidiabética das farinhas obtidas a partir das matérias-primas colonizadas e comparadas às respectivas farinhas controle. Adicionalmente, foram analisadas as propriedades físicas e físico-químicas das farinhas.

Dentre os fungos utilizados, observou-se a colonização de *P. albidus* em menor período do que *A. fuscosuccinea* e *A. blazei*. Nas condições testadas, a completa colonização dos grãos e do bagaço de malte pelo micélio de *P. albidus* ocorreu em 15 dias da inoculação, enquanto *A. fuscosuccinea* e *A. blazei* ocorreu em 21 e 28 dias, respectivamente. Ao utilizar o bagaço de uva, *P. albidus* foi o único fungo que cresceu, sendo necessários 35 dias para a completa colonização. Considerando o período de cultivo, o fungo *P. albidus* seria o mais promissor dentre os testados neste trabalho. Segundo Lechner & Albertó (2011), espécies do gênero *Pleurotus* são versáteis, fáceis de produzir e capazes de crescer em diferentes ambientes e substratos. Em seu estudo, cinco espécies deste gênero foram produzidas. Os autores sugerem que *P. albidus*, devido aos altos rendimentos e à qualidade dos cogumelos (basidiomas) obtidos, é uma nova espécie com potencial para produção em escala comercial.

No entanto, o presente trabalho não foi realizado com o intuito de induzir a formação dos basidiomas, diferente de outros estudos realizados que propunham a produção de cogumelos e, após a colheita dos corpos de frutificação, o aproveitamento do meio de cultivo residual (Sanchès *et al.*, 2002; Postemsky *et al.*, 2007). A estratégia estudada nesta tese, que consistiu no aproveitamento integral dos meios de cultivo colonizados pelos micélios na forma de farinhas, apresenta como vantagem o menor tempo para obtenção do produto, visto que um dos fatores que onera a produção de cogumelos e, consequentemente, dificulta a popularização

do seu consumo, é o longo período para a sua obtenção (Carvajal *et al.*, 2012; Rathore *et al.*, 2019; Souilem *et al.*, 2017).

Adicionalmente, as farinhas contendo os micélios fragmentados representam uma fonte de macronutrientes e de compostos bioativos (Souilem *et al.*, 2017). Na presente pesquisa, foram observados desempenhos diferentes dos fungos com relação ao enriquecimento nutricional e à bioatividade das farinhas produzidas. Dentre microrganismos utilizados, foram observadas maiores concentrações de proteínas em farinhas colonizadas com micélio de *P. albidus*, em relação às respectivas farinhas controles. Conforme demonstrado, farinhas de trigo e de bagaço de malte colonizadas com *P. albidus* apresentaram aumentos de 46% e 42%, respectivamente, no conteúdo proteico.

A respeito da avaliação dos compostos fenólicos das farinhas e das atividades antioxidantes, a colonização apresentou os resultados mais relevantes pelo fungo *A. fuscosuccinea*. Merecem destaque as farinhas de grãos de milho, em que o conteúdo de compostos fenólicos aumentou de 0,08 (controle) para 2,38 mg GAE/g (farinha colonizada), e as bagaço de malte que aumentou de 2,51 (controle) para 3,80 mg GAE/g (farinha colonizada). Estas mesmas, acusaram as maiores atividades antioxidantes nos ensaios de DPPH (8,90 e 3,45 µmol TEAC/g para farinhas de milho e de bagaço de malte, respectivamente) e de ABTS (16,52 e 5,64 µmol TEAC/g para farinhas de milho e de bagaço de malte, respectivamente).

Por outro lado, em farinhas de bagaço de uva com *P. albidus* houve diminuição no conteúdo de compostos fenólicos (de 5,16 para 1,18 GAE/g) e nas atividades antioxidantes avaliadas pelos ensaios de varreduras dos radicais DPPH (de 23,72 para 11,42 µmol TEAC/g) e ABTS (de 82,61 para 13,03 µmol TEAC/g). Sob o ponto de vista da nutrição animal, este resultado representa uma melhoria, pois significa que houve redução de fatores antinutricionais, como os taninos naturalmente presentes na uva e em seus derivados, que limitam o seu uso na alimentação animal (Sanchès *et al.*, 2002; Rotava *et al.*, 2009).

Os micélios, assim como os corpos de frutificação dos macrofungos, são considerados fontes de proteínas, contendo os aminoácidos essenciais, entre eles a metionina (Rathore *et al.*, 2019; Ulzijargal & Mau, 2011), um aminoácido primordial na síntese de proteínas (Moran *et al.*, 2013). Na análise de aminoácidos das farinhas de grãos e de bagaços colonizados e os seus respectivos controles foram investigados todos os aminoácidos essenciais, exceto o triptofano. Os resultados demonstraram que o CES das matérias-primas vegetais pelos macrofungos alterou o perfil de aminoácidos das amostras. Porém, em alguns casos não foram identificados todos os aminoácidos essenciais ou ainda, houve diminuição nos seus conteúdos. Por outro lado, importantes observações foram possíveis, com destaque para a síntese dos aminoácidos essenciais metionina, lisina e treonina.

A síntese de metionina foi observada em farinhas de arroz colonizadas pelos 3 fungos, nas farinhas de milho colonizados por *A. fuscouscinea* e por *P. albidus*, e nas farinhas de bagaço de malte colonizadas por *P. albidus* e *A. blazei*. Tanto no milho como no bagaço de malte, a metionina não havia sido identificada na farinha controle. Lisina foi sintetizada em farinha de trigo com *P. albidus* e em farinhas de bagaço de malte com os 3 fungos. O aumento no teor de treonina foi observado em bagaço de malte com *P. albidus* e com *A. blazei*; em farinha de arroz com *A. fuscouscinea* e com *P. albidus*; em farinha de milho com *A. fuscouscinea* e com *P. albidus* e em farinha de trigo com *P. albidus*. Segundo Moran *et al.* (2013), os fungos produzem as enzimas (aspartato quinase e aspartato semialdeído desidrogenase) que catalisam o processo de síntese dos aminoácidos lisina, metionina e treonina, a partir de seu precursor, o aspartato. Na primeira etapa, ocorre a fosforilação do aspartato e então, na segunda etapa, o aspartilfosfato é convertido a aspartato- β -semialdeído.

Os macrofungos são considerados fontes de moléculas bioativas e apresentam potencial para alimentos funcionais (Reis *et al.*, 2017). Neste trabalho, três moléculas com atividade biológica foram investigadas: ergosterol, ergotioneína e lovastatina. A respeito do ergosterol,

sua quantificação foi realizada, num primeiro momento, como medida indireta do crescimento micelial. Além disso, é um metabólito de interesse devido a sua atividade antioxidante e antimicrobiana (Correa *et al.*, 2019) e que foi identificado em maior quantidade nas farinhas colonizadas por *P. albidus*. Talvez tal fato esteja relacionado com a característica de versatilidade do fungo, capaz de crescer em diversos tipos de substratos e diferentes condições (Lechner & Albertó, 2011), sobressaindo-se aos demais nas condições utilizadas na presente pesquisa.

Os cogumelos, em especial as espécies do gênero *Pleurotus*, foram reportados como fontes de ergotioneína, um metabólito secundário com atividade antioxidante (Chen *et al.*, 2012). A molécula foi identificada nas farinhas obtidas de matérias-primas vegetais, tanto os grãos como o bagaço de malte, colonizados com micélio de *P. albidus*. No entanto, a concentração de ergotioneína determinada nas farinhas é menor do que os valores relatados na literatura, que se referem às concentrações obtidas em corpos de frutificação ou em micélios puros, e no caso da presente pesquisa foram analisados os conteúdos integrais do meio de cultivo contendo o micélio, o que pode ter contribuído para diminuir a concentração do metabólito. Ressalta-se que não há dados na literatura para concentração ergotioneína em farinhas de matérias-primas vegetais colonizados por micélios de macrofungos.

A lovastatina é um metabólito secundário produzido por macrofungos (Chen *et al.*, 2012), para o qual não há dados na literatura sobre concentrações determinadas em farinhas obtidas de matérias-primas vegetais colonizados por micélios de macrofungos. No presente trabalho, lovastatina foi encontrada em farinhas obtidas de trigo com *A. blazei* e com *A. fuscouscinea*, em bagaço de malte com *A. fuscouscinea* e em bagaço de uva com *P. albidus*.

No presente trabalho, os extratos das farinhas colonizadas pelos macrofungos foram analisados quanto a capacidade de inibir certas enzimas do metabolismo, determinando-se desta forma as suas atividades antibesidade (ao inibir lipase pancreática) e antidiabética (ao inibir

α - glicosidase e/ou α - amilase) *in vitro*. Dentre as farinhas produzidas, a maior atividade antiobesidade foi observada na farinha obtida de trigo colonizado por *P. albidus*, sendo capaz de inibir 75,4 % da atividade da enzima lipase pancreática. Quanto à atividade antidiabética, a farinha obtida de trigo colonizado por *P. albidus* inibiu 98,2% da atividade da enzima α -glicosidase. Farinhas oriundas de bagaço de malte com *P. albidus* e com *A. blazei* também inibiram α -glicosidase em 98,2% e 100%, respectivamente.

Diante do desafio de desenvolver alternativas que possam auxiliar no suprimento da demanda por alimentos, principalmente fontes de proteínas, consequente do aumento da população mundial (FAO, 2017), a farinha obtida de bagaço de malte colonizado com *P. albidus* foi considerada a mais promissora, representando uma fonte alternativa de proteína mediante a incorporação da biomassa microbiana durante o CES. Por isso, esta foi selecionada para ser incorporada em um produto alimentício, na terceira etapa do trabalho. Esta farinha poderia ser aplicada em diversos alimentos, no entanto a escolha pelo biscoito tipo cookie se deu pela versatilidade da sua formulação, composto basicamente por farinha de trigo, açúcar e gordura (Cauvain, 2015) e por estudos demonstrando a possibilidade de enriquecê-la por meio da adição de vários ingredientes como, por exemplo, biomassa de cianobactéria *Arthrosphaera platensis* (Bolanho *et al.*, 2014), células inativas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Öztürk *et al.*, 2017) e cogumelo ostra *Pleurotus sajor-caju* em pó (Ng *et al.*, 2017).

Biscoitos tipo cookie foram produzidos a partir da substituição parcial ou total da farinha de trigo pela farinha de bagaço de malte colonizada por *P. albidus*, com objetivo de obter um alimento com maior teor proteico e com propriedades bioativas. De fato, o uso da farinha de bagaço de malte com *P. albidus* resultou em biscoitos com aumento no teor proteico, de fibra alimentar total, de cinzas e diminuição no conteúdo de carboidratos. Por outro lado, quanto maior proporção de farinha obtida de bagaço de malte utilizada na formulação, biscoitos mais escuros e com maior dureza foram produzidos.

A incorporação de farinha obtida de bagaço de malte com *P. albidus* na formulação de biscoitos, contribuiu para o aumento dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e capacidade de inibição da enzima α -glicosidase, conferindo uma potencial atividade biológica ao produto. No entanto, para aperfeiçoamento da formulação, testes de análise sensorial são necessários para avaliar a aceitação do consumidor e então definir a melhor proporção para o uso desta farinha na produção de biscoitos.

De modo geral, as farinhas obtidas de matérias-primas vegetais tratados por cultivo estado solido com macrofungos comestíveis apresentam potencial desenvolvimentos de alimentos com agregado valor nutricional e bioativo. Todavia, mais estudos são necessários com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos nos processos de biotransformação, os quais resultaram no aumento do teor proteico.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que:

- As farinhas de micoproteínas de *A. blazei*, *A. fuscosuccinea* ou *P. albidus* obtidas a partir de grãos (arroz integral, milho canjica ou trigo) por meio de CES possuem valores nutricionais e de compostos bioativos superiores às farinhas controles;
- dentre os macrofungos utilizados para a produção de micoproteínas em grãos, com a espécie *P. albidus* foram obtidas farinhas com maior concentração de proteínas, de aminoácidos totais e de ergosterol; e com a espécie *A. fuscosuccinea* foram obtidos maiores valores de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes;
- as micoproteínas produzidas em grãos foram efetivas na inibição de enzimas do metabolismo, sendo realçada a inibição da enzima lipase pancreática *in vitro* da micoproteína de *P. albidus* e de *A. fuscosuccinea* em grãos de trigo e a inibição da enzima α -glicosidase *in vitro* das micoproteínas de *P. albidus* e *A. blazei* produzidas em grãos de arroz, de milho e de trigo, sendo evidenciada maior inibição da enzima α -glicosidase do que da α -amilase;
- as farinhas de micoproteínas de *P. albidus*, *A. fuscosuccinea* ou *A. blazei* foram produzidas em bagaços de malte de cevada por meio de CES; e em bagaço de uva foi produzida a micoproteína de *P. albidus*, constituindo uma estratégia para agregar valor a estes resíduos agroindustriais, mediante enriquecimento nutricional e produção de compostos bioativos;
- na produção de micoproteínas em resíduos agroindustriais, em farinhas de micoproteínas de *P. albidus* foram identificados maiores incrementos no valor nutricional, enquanto *A. fuscosuccinea* teve maior influência nos conteúdos de compostos fenólicos e na atividade antioxidante; micoproteínas produzidas em bagaço de malte foram mais efetivas na inibição da enzima α -glicosidase do que da α -amilase,

- a utilização de farinha de micoproteína de *P. albidus* produzida em bagaço de malte de cevada, em substituição parcial ou total da farinha de trigo refinada, na produção de biscoitos demonstrou-se um ingrediente potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais pois biscoitos produzidos a partir de misturas com maiores proporções de farinha micoproteína mostraram aumento no conteúdo proteico e de fibras alimentares totais, maior concentração de conteúdos de fenólicos, maior atividade antioxidante e efeitos inibitórios frente à enzima α -glicosidase;
- as farinhas de micoproteínas de *P. albidus* produzida em grãos de trigo e em bagaço de malte de cevada foram consideradas as mais promissoras dentre as obtidas neste trabalho, constituindo potenciais ingredientes para formulação de alimentos funcionais, devido ao seu valor nutricional e ao conteúdo de compostos bioativos.

7 PERSPECTIVAS

As seguintes perspectivas podem ser consideradas como sugestão para futuras pesquisas relacionadas à temática do presente trabalho:

- suplementação de nutrientes (enxofre) nos meios de cultivo compostos pelas matérias-primas vegetais visando aumentar bioconversão de macronutrientes e aminoácidos;
- realização de estudos para elucidar o enriquecimento proteico de biomassa vegetais por meio de CES com macrofungos;
- identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos das farinhas obtidas a partir dos matérias-primas colonizadas;
- realização testes de análise sensorial dos cookies para avaliação a aceitação pelo consumidor e definição da formulação mais adequada;
- desenvolvimento de outros produtos alimentícios, tais como produtos análogos à produtos cárneos, empregando as farinhas obtidas a partir dos matérias-primas colonizadas;
- teste dos possíveis efeitos imunológicos das farinhas de bagaços colonizados como aditivos na nutrição animal;
- pesquisa de alergênicos nas farinhas de micoproteínas obtidas a partir dos matérias-primas colonizadas.

8 REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- Associação Brasileira de Cerveja Artesanal. **Número de cervejarias artesanais no Brasil cresce 37,7% em 2017.** Disponível em <<https://abracerva.com.br/2018/02/16/numero-de-cervejarias-artesanais-no-brasil-cresce-377-em-2017/>>. Acesso em out. 2018.
- Adetunji, C.O.; Adejumo, I.O. (2017). Nutritional assessment of mycomeat produced from different agricultural substrates using wild and mutant strains from *Pleurotus sajor-caju* during solid state fermentation. **Anim Feed Sci and Technol.** 224: 14 – 19.
- Albanese, L.; Ciriminna, R.; Meneguzzo, F.; Pagliaro, M. (2018). Innovative beer-brewing of typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. **J Clean Prod.** 171: 297 – 311.
- Anderson, R.A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. **Cereal Chem.** 59, 265–269.
- Akata, I.; Zengin, G.; Picot, C.M.N.; Mahomoodally, M.F. (2019). Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. **S Afr J Bot.** 120: 95 – 99.
- Aktar, Y.; Iasman, M.B. (2018). **Insects as an alternative protein source.** In: Yada, R.Y. (ed.) **Proteins in Food Processing.** 2 Ed. Woodhead Publishing.
- Alvarenga, R.L.M.; Naves, L.R.R.; Xavier-Santos, S. (2015). The Genus *Auricularia* Bull. ex Juss. (Basidiomycota) in Cerrado (Brazilian Savanna) areas of Goiás state and the Federal District, Brazil. **Mycosphere.** 6(5): 532 – 541.
- Amaral, A.C.C.; Pires, C.L.S.; Keiber, M.; Batista, M.G.; Dalla Santa, H.S.; Novello, D. (2014). Características físico-químicas e sensoriais de iogurte adicionado de micélio de cogumelo *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo submerso em bagaço de uva. **Revista de Universidade Vale do Rio Verde.** 12: 1050 – 1062.
- Anderson, R. A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. **Cereal Chemistry.** 59: 265 – 269.
- Anupama; Ravindra, P. Value-added food: single cell protein. (2000). **Biotechnol Adv.** 18: 459 – 479.
- AOAC. (2016). **Oficial methods of analysis.** 20 ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Araújo, K.B.; Santos, R.C.A.; Souza, F.M.; Aquino, L.C.L. (2011). Enriquecimento proteico da farinha de sementes de mangaba com *Rhizopus oryzae*: otimização utilizando a através de superfície de resposta. **Tecnol Ciênc Agrop.** 5: 45 – 50
- Aruna, T.E.; Aworh, O.C.; Rahi, A.O.; Olagunju, A.I. (2017). Protein enrichment of yam peels by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743). **Ann Agric Sci.** 62: 33 – 37.

Azevedo, R.S.; Ávila, C.L.S.; Souza Dias, E. ; Bertechini, A.G.; Schwan, R.F. (2009) Utilização do composto exaurido de *Pleurotus sajor-caju* em rações de frangos de corte e seus efeitos no desempenho dessas aves. **Acta Sci Anim Sci.** 31, 139-144.

Barreira, J.C.M.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, I.C.F.R. (2014). Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. **Food Anal. Methods.** 7: 217 – 223.

Bisaria, R.; Madan, M.; Vasudevan, P. (1997). Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresour Technol.** 59: 5 – 8.

Bhat, R.; Rai, R.V.; Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comp. Rev. Food Sci. Saf.** 9: 57 – 81.

Blandino, A.; Al-Aseeri, M.E.; Pandiella, S.S.; Cantero, D.; Webb, C. (2003). Cereal based fermented foods and beverages. **Food Res Int** 36: 527–543.

Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. (2001). **Química do processamento de alimentos.** 3 ed. São Paulo: Varela.

Bolanho, B.C.; Egea, M.B.; Jácome, A.L.M.; Campos, I.; de Carvalho; J.C.M.; Danesi; E.D.G. (2014). Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. **J Food Nutrit Res**, 53(2), 171–179.

Branà, M.T.; Cimmarusti, M.T.; Haidukowski, M.; Logrieco, A.F.; Altomare, C. (2017). Bioremediation of aflatoxin B1-contaminated maize by king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Plos One.** 12 (8): 1 – 14.

Brasil (1999). Ministério da Saúde - Agência Nacinal de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alagadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 82, seção 1, Brasília, DF, 03 mai. 1999. p 11. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_18_1999_COMP.pdf/dd30fd35-e7ea-4f8d-be72-ae2e439191b0. Acesso em nov. 2018.

Brasil (2005). Ministério da Saúde - Agência Nacinal de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 184, seção 1, Brasília, DF, 23 set. 2005. p 384. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_272_2005_.pdf/40ddbf30-4939-403e-a9d1-fbab47ffc5bb. Acesso em nov. 2018.

Brasil (2010). Presidência da República. Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010. Intitui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, seção 1, Brasília, DF, 30 ago. 2010.

Brozzoli, V.; Bartocci, S.; Terramoccia, S.; Contò, G.; Federici, F; D'Annibale A.; Petruccioli, M. (2010). Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. **Enzyme Microb Technol.** 46: 223 – 228.

Cai, S.; Wang, O.; Wang, M.; He, J.; Wang, Y.; Zhang, D.; Zhou, F.; Ji, B. (2012). In Vitro Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase Activity of Subfractions from Ethanol Extracts of Fermented Oats (*Avena sativa* L.) and Synergistic Effect of Three Phenolic Acids. **J Agric Food Chem.** 60: 7245 – 7251.

Camargo, L.R., Silva, L.M., Komeroski, M.R., Kist, T.B.L., Rodrigues, C.E., Rios, A.O., Silva, M.M., Doneda, D., Schmidt, H.O., Oliveira, V.R. (2018). Effect of whey protein addition on the nutritional, technological and sensory quality of banana cake. **Int J Food Sci Technol.** 53: 2617 – 2623.

Camelini, C.M.; Gomes, A.; Cardozo, F.T.G.S.; Simões, C.M.O.; Rossi, M.J.; Giachini, A.J.; Petrus, J.C.C.; Mendonça, M.M. (2013). Production of polysaccharide from *Agaricus subrufescens* Peck on solid-state fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol.** 97: 123 – 133.

Canedo, M.S., Paula, F.G., Silva, F.A., Vendruscolo, F. (2016). Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Bioprocess Biosyst Eng.** 39:1105–1113.

Cantele, C., Fontana, R.C., Mezzomo, A.G., Rosa, L.O., Poleto, L., Camassola, M., Dillon, A.J.P. (2017). Production, characterization and dye decolorization ability of a high levellaccase from *Marasmiellus palmivorus*. **Biocatal Agric Biotechnol.** 12: 15 – 22.

Carrasco-González, J.A.; Serna-Saldívar, S.; Gutiérrez-Uribe, J.A. (2017). Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. **J Food Compos Anal.** 58: 69 – 81.

Carvajal, A.E.S.S.; Koehlein, E.A.; Soares, A.A.; Eler, G.J.; Nakashima, A.T.A; Bracht, A.; Peralta, R.M. (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. **LWT – Food Sci Technol.** 46: 493 – 499.

Castro-Alvez, V.C., Gomes, D., Menolli Jr., N., Sforça, M.L., Nascimento, J.R.O. (2017). Characterization and immunomodulatory effects of glucans from *Pleurotus albidus*, a promising species of mushroom for farming and biomass production. **Int J Biol Macromol.** 95:215-223.

Catteral, P.; Cauvain, S. P. (2009). Moagem da Farinha. In: Cauvain, S.P.; Young, L.S. **Tecnologia da Panificação.** 2 Ed. Barueri: Manole. p. 349 – 388.

Cauvain, S. P. (2015). **Cookies, Biscuits and Crackers: Formulation, Processing and Characteristics.** Encyclopedia of Food Grains: Second Edition (2nd ed., Vol. 3–4). Elsevier Ltd.

- Chang, S. (2008). **Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods.** In: Cheung, P.C.K. (Ed.) **Mushrooms as Functional Foods.** New York: John Wiley & Sons, pp 1–33.
- Chang, S.T.; Miles, P.G. (1992). Mushroom biology – a new discipline. **Mycologist.** 6: 64-65.
- Chang, A.K.T.; Frias Jr.; R.R.; Alvarez, L.V.; Bigol, U.G.; Guzman, J.P.M.D. (2019). Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp. **Biocatal Agric Biotechnol.** 17: 189 – 195.
- Cheah, I.; Halliwell, B. (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. **Biochim Biophys Acta.** 1822: 784 – 793.
- Chen, S.; Ho, K.; Hsieh, Y.; Wang, L.; Mau, J. (2012). Contents of lovastatin, g-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. **LWT – Food Sci Technol.** 47: 274 – 278.
- Cheung, P.C.K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. **Nutrition Bulletin.** 35: 292 – 299.
- Chiang, S.; Ulzijargal, E.; Chien, R.; Mau, J. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of Solid-State Fermented products from a medicinal mushroom, *Taiwanofungus salmoneus* (Higher Basidiomycetes) from Taiwan. **Int J Med Mushroom.** 17: 21 – 32.
- Chien, R.; Ulzijargal, E.; Mau, J. (2016). Quality of bread suplemented with *Antrodia salmonea*-fermented grains. **Food Technol. Biotechnol.** 54: 180-188.
- Choudhury, M.P.; Sarma, T.C. (2014). Studies on ear fungus-*Auricularia* from the woodland of Nameri National Park, Sonitpur District, Assam. **Int J Interdiscip Multidiscip Stud.** 1: 262 – 265.
- Christ-Ribeiro, A.; Graça, C.S.; Kupski, L.; Badiale-Furlong, E.; Souza-Soares, L.A. (2019). Cytotoxicity, antifungal and anti mycotoxins effects of phenolic compounds from fermented rice bran and *Spirulina* sp. **Proces Biochem.** 80: 190-196.
- Cooray, S.T.; Chen, W.N. (2018). Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. **J Funct Foods.** 42: 85 – 94.
- Córdova, K.R.V., Dalla Santa, H.S., Dalla Santa, O.R., Perez, E., Waszczynskyj, N. (2012). Antioxidantes e beta-glucanas em barras de cereais com *Agaricus brasiliensis*. **BCEPPA.** 30: 209 – 220.
- Corrêa, R.C.G.; Brugnari, T.; Bracht, A.; Peralta, E.M.; Ferreira, I.C.F.R. (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade finding. **Trends Food Sci Technol.** 50: 103 – 117.
- Corrêa, R.C.G.; Barros, L.; Fernandes, A.; Sokovic, M.; Bracht, A.; Peralta, E.M.; Ferreira, I.C.F.R. (2018). A natural food ingredient based on ergosterol: optimization of the extraction

from *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. **Food Funct.** 9: 1465 – 1474.

Costa, M.G.; Souza, E.L.; Stamford, T.L.M (2008). Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Cienc Tecnol Aliment.** 28: 220 – 225.

Couto, S.R., Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **J Food Eng.** 76: 291 – 302.

Dalla-Santa, H.S. (2006). Efeitos no metabolismo e ação imunomodeladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Dalla-Santa, H.S.; Rubel, R.; Vítola, F.M.D.; Rodriguez-Leon, J.A.; Dalla-Santa, O.R.; Brand, D.; Alvarez, D.C.; Macedo, R.E.F.; Carvalho, J.C.; Soccol, C.R. (2012). Growth parameters of *Agaricus brasiliensis* mycelium on wheat grains in solid-state fermentation. **Biotechnol.** 11(3): 144-153.

Damodaran, S.; Fennema, O.R.; Parkin, K.L. (2010). **Química de Alimentos de Fennema.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 900 p.

De Camargo, A.C.; Regitano-d'Arce, M.A.B.; Biasoto, A.C.T.; Shahidi, F. (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. **Food Chem.** 212: 395 – 402.

Dias, E.S.; Abe, C.; SchwKejan, R.F. (2004). Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Sci Agricol.** 61: 545 – 549.

Dias, E.S. (2010). Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciênc Agrotec.** 34: 795 – 803.

Divate, R.D.; Wang, C.; Chou, S.; Chang, C.; Wang, P.; Chung, Y. (2017). Production of *Xylaria nigripes*-fermented grains by solid-state fermentation and an assessment of their resulting bioactivity. **LWT – Food Sci Technol.** 81: 18 – 25.

Dorđević, T.M.; Šiler-Marinković, S.S.; Dimitrijević-Branković, S.I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. **Food Chem.** 119(3): 957–963.

Dossey, A.T.; Rojas, M.G.; Morales-Ramos, J.A. (2016). **Insects as sustainable Food Ingredientes: Production, processing and Food Application.** 1 Ed. Academic Press. 402p.

Dubost, N.J.; Beelman, R.B.; Peterson, D.; Royse, D.J. (2006). Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. **Int. J. Med. Mushrooms.** 8(3): 215–222.

Dubost, N. J.; Ou, B.; Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. **Food Chem.** 105: 727 – 735.

Dwivedi, M.; Vasantha, K.Y.; Sreerama, Y.N.; Haware, D.J.; Singh, R.P.; Sattur, A.P. (2015). Nilamadana, new fungal fermented cereal based food. **J Funct Foods.** 15: 217 – 224.

Ergönül, P.G., Akata, I., Kalyoncu, F., Ergönül, B. (2013). Fatty Acid Compositions of Six Wild Edible Mushroom Species. **The Scientific World Journal.** <http://dx.doi.org/10.1155/2013/163964>.

Food and Agriculture Organization of United States (FAO). (2017) **The state of food and agriculture** – Leveraging food systems for inclusive rural transformation. Rome: Fao. 160 p.

Ferraz, A.L. (2010). **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Ed). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul:Educs. pp. 215 – 244.

Finnigan, T.; Needham, L.; Abbott, C. (2016). **Mycoprotein: A healthy new protein with a low environmental impact**. In: Nadathur, S.R.; Wanashundara, J.P.D.; Scanlin, L. (Ed). **Sustainable Protein Sources**. Academic Press: Elservier Inc. pp 305 – 325.

Firenzouli, F.; Gori, L.; Lombardo, G. (2008). The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evid based Complement Alternat Med.** 5: 3 – 15.

Gambato, G.; Todescato, K.; Pavão, E.M.; Scortegagna, A.; Fontana, R.C.; Salvador, M.; Camassola, M. (2016). Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresour Technol.** 207: 46 – 51.

Gambato, G.; Pavão, E.M.; Chilanti, G.; Fontana, R.C.; Salvador, M.; Camassola, M. (2018). *Pleurotus albidus* modulates mitochondrial metabolism disrupted by hyperglycaemia in EA.hy926 endothelial cells. **BioMed Res Int.** 2018: 1 – 10.

Gao, H.; Gu, W. (2007). Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. **Biochem Eng J.** 33: 202 – 210.

Garcia, J.C.; Mattoso, M.J.; Duarte, J.O.; Cruz, J.C. (2006). Aspectos Econômicos da Produção e Utilização do Milho. **Circular Técnica:** 74: 1 – 12.

Ghorai, S.; Banik, S.P.; Verma, D.; Chowdhury, S.; Mukherjee, S.; Khowala S. (2009). Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Res Int.** 42: 577 – 587.

Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Curr Opin Biotech.** 26: 162 – 173.

Gregori, A.; Svagelj, M.; Pahor, B.; Berovic, M.; Pohleven, F. (2008). The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. **N Biotechnol.** 25: 157 – 161.

Guizani, N.; Mothershow, A. (2005). **Fermentation**. In: Hui, Y.H.; Sherkat, F. (Ed). **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. 4 ed. New York: CRC Press. pp 63,2-63,28.

- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochem Biophys Res Commun.** 393, 561–4.
- Han, J. (2003). Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **Int J Food Microbiol.** 80: 61 – 66.
- Handa, C.L.; Lima, F.S.; Guelfi, M.F.G.; Georgett, S.R.; Ida, E.I. (2016). Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chem.** 197: 175 – 184.
- Heleno, S.A.; Diz, P.; Prieto, M.A.; Barros, L.; Rodrigues, A.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chem.** 197: 1054 – 1063.
- Hines, V.; Willis, V.W.L.; Isikhuemhen, O.S.; Ibrahim S.L.; Anike, F.; Jackson, J.; Hurley, S.L.; Ohiman, E.I. (2013). Effect of incubation time and level of fungus myceliated grain supplemented diet on the growth and health of broiler chickens. **Int J Poult Sci.** 12: 206 – 211.
- Hibbett, D.S.; Binder, M.; Bischoff, J.F.; Blackwell, M.; Cannon, P.F.; Eriksson, O.E.; Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol. Res.** 111(5), 509– 547.
- Kalaras, M.D.; Richie, J.P.; Calcagnotto, A.; Bellman, R.B. (2017). Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. **Food Chem.** 233: 429 – 433.
- Kang, M., Zhai, F., Li, X., Cao, J., Han, J. (2017). Total phenolic contents and antioxidant properties of buckwheat fermented by three strains of *Agaricus*. **J Cereal Sci** 73: 138 – 142.
- Kim, K.; Choi, B.; Lee, I.; Lee, H.; Kwon, S.; Oh, K.; Kim, A.Y. (2011). Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. **J Sci Food Agric.** 91: 1561-1568.
- Kirsch, L.S. (2013). Produção de biomassa de *Pleurotus albidus* por fermentação submerso para elaboração de barras de cereais. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil.
- Kirsch, L.S., Macedo, A.J.P., Teixeira, M.F.S. (2016) Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Braz J Microbiol.** 47: 658 – 664.
- Koyande, A.K.; Chew, K.W.; Rambabu, K.; Tao, Y.; Chu, D-T.; Show, P.L. (2019) Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness.** 8: 16-21.
- Kumar, P.; Mehta, N.; Malav, O. P.; Verma, A. K.; Umraw, P.; Kanth, M. K. (2019). **The structure of meat analogs.** In: Melton, L.; Shahidi, F.; Varelis, P. (Ed.) **Encyclopedia of Food Chemistry.** Elsevier. pp 105 – 109.

- Kurt, A.; Gençcelep, H. (2018) Enrichment of meat emulsion with mushroom (*Agaricus bisporus*) powder: Impact on rheological and structural characteristics. **J Food Eng.** 237: 128 – 136.
- Kuskoski, E.M, Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Manicni-Filho, J., Fett, R. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc Tecnolog Aliment.** 25: 726-732.
- Koutrotsios, G.; Mountzouris, K.C.; Chatzipavlidis, I.; Zervakis, G.I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi – Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. **Food Chem.** 161: 127 – 135.
- Lavelli, V.; Proserpio, C.; Galloti, F.; Laureati, M.; Paliarini, E. (2018). Circular reuse of bio-resources: the role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. **Food Funct.** 9: 1353- 1372.
- Lechner, B.E., Albertó, E. (2011). Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields: *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. **Rev Iberoam Micol.** 28: 148–54.
- Lee, J.H.; Hwang, C.E.; Son, K.S.; Cho, K.M. (2019). Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. **Food Chem.** 272: 362 – 371.
- Li, S.; Chen, Y.; Li, K.; Lei, Z.; Zhang, Z. (2016). Characterization of physicochemical properties of fermented soybean curd residue by *Morchella esculenta*. **Inter Biodeterior Biodegradation.** 109: 113 – 118.
- Liang, C.H.; Syu, J.L.; Lee, Y.L.; Mau, J.L. (2009). Antioxidant properties of solid-state fermented adlay and rice by *Phellinus linteus*. **Food Chem.** 116: 841–845.
- Liang, C.H.; Wub, C.; Lu, P.; Kuo, Y.; Liang, Z. (2019). Biological efficiency and nutritional value of the culinary-medicinal mushroom *Auricularia* cultivated on a sawdust basal substrate supplement with different proportions of grass plants. **Saudi J Biol Sci.** 26: 263 – 269.
- Lin, M.J.Y., Humbert, E.S. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. **J Food Sci.** 39: 368 – 370.
- Litchfield, J.H. (1983). Single-cell proteins. **Science.** 219: 740 -746.
- Liu, S.; Dong, Y.; Yongxia Li.; B, Li.; Liu, H.; Li, H. (2013). Chemical constituents from the rice fermented with the edible mushroom *Pleurotus eryngii* and their quinone oxidoreductase 1 inducing effect. **Fitoterapia.** 91: 9 – 14.
- Loffredo, E., Traversa, A., Senesi, N. (2012). Biodecontamination of water from bisphenol A using ligninolytic fungi and the modulation role of humic acids. **Ecotoxicology Environmental Safety.** 79, 288–93.

- Lowy, B. (1951). A morphological basis for classifying the species of *Auricularia*. **Mycologia**. 43: 351 – 358.
- Luo, Y.; Chen, G.; Li, B.; Ji, B.; Guo, Y.; Tian, F. (2009). Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. **Innov Food Sci Emerg Technol**. 10: 215–221.
- Lynch, K.M.; Steffen, E.J.; Arendt, E. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. **J Inst Brew**. 122: 553–568
- Machado, A.M.B.; Dias, E.S.; Santos, E.C.; Freitas, R.T.F. (2007). Composto exaurido do cogumelo *Agaricus blazei* na dieta de frangos de corte. **Braz J Anim Sci**. 36:1113-1118.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Stahl, D.A. (2016). **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed. 1032 p.
- Magalhães, C.M.B.; Souza-Neto, M.S.; Astolfi-Filho, S.; Matos, I.T.S.R. (2018). Candida tropicalis able to produce yeast single cell protein using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as carbon source. **Biotech Reser Innov**. 2: 19-21.
- Mau, J-L.; Wu, K-T.; Wu, Y-H.; Lin, Y-P. (1998). Nonvolatile Taste Components of Ear Mushrooms. **J Agric Food Chem**. 46: 4583 -4586.
- Menolli Jr, N.; Breternitz, B.S.; Capelari, M. (2014). The genus *Pleurotus* in Brazil: a molecular and taxonomic overview. **Mycoscience**. 55: 378-389.
- Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. (2006). **Solid-state fermentation bioreactors. Fundamentals of design and operation**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Mole, S.; Rodger, J.; Butler, L. (1993). Growth reduction by dietary tannins: Different effects due to different tannins. **Biochem Syst Ecol**. 21 (6-7): 667 – 677.
- Mokochinski, J.B.; López, B.G.C.; Sovrani, V.; Dalla Santa, H.S.; González-Borrero, P.P.; Sawaya, A.C.H.F.; Schmidt, E.M.; Eberlin M.N.; Torres, Y.R. (2015). Production of *Agaricus brasiliensis* mycelium from food industry residues as a source of antioxidants and essential fatty acids. **Int J Food Sci Technol**. 50: 2052–2058
- Moo-Young, M.; Chisti, Y.; Vlach, D. (1993). Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods. **Biotech Adv**. 11: 469 – 479.
- Moran, L.A.; Horton, H.R.; Scrimgeour, K.G.; Perry, M.D. (2013). **Bioquímica**. 5 Ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil. 836 p.
- Moreno-Fuentes, A.; Bautista-Nava, E. (2006). El “hongo blanco patón”, *Pleurotus albidus*, en Hidalgo. Su primer registro en Mexico. **Rev Mex Mic**. 22:41-47.
- Muhlack, R.A.; Potumarthi R.; Jeffery, D.W. (2018). Sustainable wineries through waste valorization: A review of grape marc utilization for value-added products. **Waste Manage**. 72: 99-118.

- Mussatto, S.I.; Dragone, G.; Roberto, I.C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **J Cereal Sci.** 43: 1 – 14.
- Nasseri, A.T.; Rasoul-amini, S.; Moromvat, M.H; Ghasemi, Y. (2011) Single cell protein: Production and process. **American J Food Technol.** 6: 103-116.
- Nigam, P.S.; Singh, A. (2014). **Single Cell Protein.** In: Batt, C.A.; Tortorello, M.L. (Ed.) **Encyclopedia of Food Microbiology.** 2 Ed. Academic Press. pp 415 – 424.
- Nitayapat, N.; Prakarnsombut, N.; Lee, S.J.; Boonsupthip, W. (2015). Bioconversion of tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the final products. **LWT – Food Sci Technol.** 63: 773 – 779.
- Neifar, M.; Jaouani, A.; Ayari, A.; Abid, O.; Salem, H. B.; Boudabous, A.; Najar, T.; Ghorbel, R.E. (2013). Improving the nutritive value of Olive Cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomes fomentarius*. **Chemosphere.** 91: 110 – 114.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2019). **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 7 ed. Porto Alegre: Artmed. 1226 p.
- Ng, S.H., Robert, S.D., Wan Ahmad, W.A.N., Wan Ishak, W.R. (2017). Incorporation of dietary fibre-rich oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) powder improves postprandial glycaemic response by interfering with starch granule structure and starch digestibility of biscuit. **Food Chem.** 227, 358–368.
- Nguyen, T.L.; Chen, J.; Hu, Y.; Wang, D.; Fan, Y.; Wang, J. (2012). In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. **Carbohydr Polym.** 90: 1254–1258
- Oh, Y-S.; Hwang, J-H.; Lim, S-B. (2012). Physiological activity of tofu fermented with mushroom mycelia. **Food Chem.** 133: 728 – 734.
- Oliveira, K.C.B., Lima, E.L., Issakowicz, J.C., Pita, F.D., Vieira, M.B, Carrasco, A.O.T., Tranquilim, M.V. (2009). Aceitabilidade e Efeito de Grãos Cultivados com Cogumelo *Agaricus brasiliensis* por Aves Silvestres com Coccídeos. **Rev. Ciênc Exat Nat.** 11(2): 291 – 304.
- Öztürk, S., Cerit, İ., Muthlu, S.; Demirkol, O. (2017). Enrichment of cookies with glutathione by inactive yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*): Physicochemical and functional properties. **J Cereal Sci.** 78, 19–24.
- Pandey, A. (2003). Solid state fermentation. **Biochem Eng J.** 13: 81- 84.
- Pascual, M.M.; Hualde, J.P.; Bianchi, V.A.; Moreno, P. ; Castro, J.M.; Luquet, C.M. (2018). Wheat grains fermented by fungal mycelia (*Pleurotus ostreatus* or *Lentinus edodes*) as alternative feed ingredients for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquac Int.** 26(6): 1338 – 1352.
- Patias, L.D.; Maroneze, M.M.; Siqueira, S.F.; Menezes, C.R.; Zepka, L.Q.; Jacob-Lopes. E. (2018). **Single-cell protein as a source of biologically active ingredients for the formulation of antiobesity foods.** In: Hoban, A.M.; Grumezescu, A.M (Ed.). **Alternative and replecement foods.** 1 Ed. Academic Press. pp 317 – 353.

Paz, M.F.; Breyer, C.; Longui, R.F.; Oviedo, M.S.V.P. (2012). Determining the basic composition and total phenolic compounds of *Pleurotus sajor-caju* cultivated in three different substrates by solid state bioprocess. **J Biotec Biodiver.** 3(2): 11 – 14.

Perera, P.K., Li, Y. (2011). Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. **Funct Foods Health Disease.** 4: 161–171.

Pereira, D.T.V.; Tarone, A.G.; Cazarin, C.B.B.; Barbero, G.F.; Martínez, J. (2018). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. **J Food Eng.** 240 : 105 – 113.

Pereira Filho, I.A.; Cruz, J.C. (2009). Milhos Especiais: alternativas para agragar valor. **DBO Agrotecnologia**, set/out: 20 – 22.

Postemsky, P.; Curvetto, N. (2014). Enhancement of wheat grain antioxidant activity by solid state fermentation with *Grifola* spp. **J Med Food.** 17.

Postesmsky, P.D.; Bidegain, M.A.; Gonçalvez-Matute, R.; Figlas, N.D.; Cubitto, M.A. (2017). Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. **Bioresour Technol.** 231: 85 – 93.

Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (2004). **Os Reinos dos Fungos.** 2 ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc. 605 p.

Raghavendra, S.N., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Tharanathan, R.N. (2004). Dietary fiber from coconut residue: Effects of different treatments and particle size on the hydration properties. **Eur Food Res Technol.** 218: 563–567.

Rathore, H.; Prasad, S.; Kapri, M.; Tiwari, A.; Sharma, S. (2019). Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. **J Funct Food.** 56: 182 – 193.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Min Yang, A., Catherine, R.-E. (1999). Antioxidant Activity Applying an improved ABTS radical. **Free Radic. Biol. Med.** 26, 1231–1237.

Reis, F.S., Martins, A., Vasconcelos, M.H., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends Food Sci Technol.** 66: 48 – 62.

Rettore, V.; Giovanni, R.N.; Paz, M.F. (2011). Influência da luz na produção do cogumelo hiboukitake em bagaço de uva. **Evidência.** 11(2): 29 - 36.

Rodger, G. (2001). Mycoprotein: A meat alternative new to U.S. **Food Technol.** 55: 36 – 41.

Rodrigues, C.E.; Tonial, M.; Schäfer, L.; Pasquali, G.; Kist, T.B.L. (2018). Performance of 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a derivatization reagent for the analysis of medium and long chain fatty acids using HPLC with LIF detection. **J Chromatogr B.** 1100 – 1101: 50 – 57.

- Rogero, M.M.; De Castro, I.A.; Tirapegui, J. (2013). **Proteínas.** In: Cozzolino, S.M.F.; Cominetti, C. (Ed) **Bases Bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença.** Barueri: Monole. pp 03 – 43.
- Rosa, L.O.; Wasum, R.A.; Dillon, A.J.P (2016). **Macrofungos (Filo Basidiomycota) do Sul do Brasil:** Levantamento e Verificação da Capacidade de Secreção de Enzimas Ligninolíticas. Saarbrucken: Novas Edições Acadêmicas. 272 p.
- Rotava, R.; Zanella, I.; Campos, E.G.; Pain, A.; Manfron, M.P.; Alves, S.H. (2009). Subprodutos da uva como promotores de crescimento em dietas de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. **Acta Sci Anim Sci.** 31(2): 145-150.
- Sadh, P.K.; Duhan, S.; Duhan, J.S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresour Bioprocess.** 5(1): 1-15.
- Sánchez, A.; Ysunza, F.; Beltrán-García, M.; Esqueda, M. (2002). Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. **J Agric Food Chem.** 50: 2537 – 2542.
- Sartori, S.B.; Ferreira, L.F.R.; Messias, T.G.; Souza, G.; Pompeu, G.B.; Monteiro, R.T.R. (2015). *Pleurotus* biomass production on vinasse and its potential use for aquaculture feed. **Mycology.** 6:1, 28-34.
- Seitz, L.M.; Mohr, H.E.; Burroughs, R.; Sauer, D.B. (1977). Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chem.** 54(6): 1207 – 1217.
- Shen, P.; Shiao, M-S.; Chung, H-R.; Lee, K-R.; Chao, Y-S.; Hunt, V. M. (1996). Liquid chromatographic determination of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **J Chin Chem Soc.** 43: 451 – 457.
- Shibata, C.K.R.; Demiate, I.M. (2003). Cultivo e análise da composição química do cogumelo do Sol (*Agaricus blazei murril*). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde.** 9: 21 – 32.
- Silva, D.D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., Hyde, K.D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. **Fungal Divers.** 62: 1–40.
- Silvera, C. M.; Furlong, E. B. (2007). Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciênc Tecnol Aliment.** 27(4): 805 – 811.
- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccoll, C.R.; Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. **Biochem Eng J.** 44: 13 – 18.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am J Enol Viticul.** 16: 144 – 158.
- Siri, N., Lacroix, M., Garrigues, J. C., Poinsot, V., Couderc, F. (2006). HPLC-fluorescence detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines labelled with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde. **Electrophoresis.** 27: 4446 – 4455.

Slivinski, J.; Santos, M.F.C.; Ferreira, A.G.; Berlinck, R.G.S. (2019). Brotasic acid methyl ester from the fruiting bodies of the mushroom *Auricularia* sp. **Phytochem Lett.** 29: 91-93.

Soccol, C.R.; Costa, E.S.F.C.; Letti, L.A.J.; Karp, S.G.; Woiciechowski, A.L.; Vandenbergh, L.P.S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnol Res Innov.** 1:52-71.

Sokovic, M.; Glamoclija, J.; C'iric, A.; Petrovic, J.; Stojkovic, D. (2018). **Mushrooms as sources of therapeutic foods.** In: Holban, A.M.; Grumezescu, A.M. (Ed.) **Therapeutic Foods.** Academic Press. p 141 – 178.

Sorrentino, F.; Roy, I.; Keshavarz, T. (2010). Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. **Appl Microbiol Biotechnol.** 88: 65 – 73.

Souilem, F., Fernandes, A., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. **Food Chem.** 230: 40–48.

Souza, T.D.; Leal, C.A.; Massarolo, K.C.; Badiale-Furlong, E. (2019). Profile of Phenolic Compounds Released from Rice Bran by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Their Relation with Hydrolases Activity. **J Food Sci.** 84 (6): 1382 – 1389.

Steiner, J.; Procopio, S.; Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. **Eur Food Res Technol.** 241:303–315.

Stephan, A.; Ahlborn, J.; Zajul, M.; Zorn, H. (2018). Edible mushroom mycelia of *Pleurotus sapidus* as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory tests in comparison to commercial proteins and meat sausages. **Eur Food Res Technol.** 244: 913 – 924.

Subramaniam, S.; Sabaratnam, V.; Kuppusamy, U.R.; Tan, Y.S. (2014). Solid-substrate fermentation of wheat grains by mycelia of indigenous species of the genus *Ganoderma* (Higher Basidiomycetes) to enhance the antioxidant activities. **Int J Med Mushroom.** 16: 259 – 267.

Suhet, M.S.; Fioreze, R. (2011). Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido. **Rev. Bras Tecnol Agroind.** 5: 584 – 592.

Sun, S.; Zhang, X.; Sun, S.; Zhang, L.; Shan, S.; Zhu, H. (2016). Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. **Food Chem.** 190: 801 – 807.

Ulzijargal, E., Yang, J., Lin, L., Chen, C., Mau, J. (2013). Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. **Food Chem.** 138: 70 – 76.

Villas Bôas, S.G.; Esposito, E. (2000). Bioconversão do bagaço de maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de uma alimentos alternativo de alto valor agregado. **Biotecnolog Ciênc Desenvolv.** 14:309-312.

- Vendruscolo, F.; Koch, F.; Pitol, L.O.; Ninow, J.L. (2007). Produção de proteína unicelular a partir de bagaço de maça utilizando fermentação em estado sólido. **Rev. Bras Tecnol Agroind.** 1: 53 – 57.
- Vendruscolo, F.; Ribeiro, C.S.; Espósito, E.; Ninow, J.L. (2009). Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Rev Bras Eng Agr Amb.** 13: 487 – 493.
- Walter, M.; Marchezan, E.; Avila, L.A. (2010). Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural.** 38: 1184 – 1192.
- Wang, D.; Sakoda, A.; Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresour Technol.** 78: 293 – 300.
- Wang, C., Wu, S.; Shyu, Y. (2014). Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. **J Biosci Bioeng.** 117(4): 449–456.
- Wang, C. C.; Lin, L. J.; Chao, Y. P.; Chiang, C. J.; Lee, M. T.; Chang, S. C.; Yu, B.; Lee, T. T. (2017). Antioxidant molecular targets of wheat bran fermented by white rot fungi and its potential modulation of antioxidative status in broiler chickens. **British Poultry Science.** 58 (3): 262 – 271.
- Wang, H.; Yang, L.; Yu, H.; Chen, M.; Wang, H.; Lu, T. (2018). Characteristics of fucose-containing polysaccharides from submerged fermentation of *Agaricus blazei* Murrill. **J Food Drug Anal.** 26: 678 – 687.
- Wanzenböck, E.; Apprich, S.; Tirpanalan, Ö.; Zitz, U.; Kracher, D.; Schedle, K.; Kneifel, W. (2017). Wheat bran biodegradation by edible *Pleurotus* fungi - A sustainable perspective for food and feed. **LWT – Food Sci Technol.** 86: 123 – 131.
- Wilcox, M.D.; Brownlee, I.A.; Richardson, J.C.; Dettmar, P.W.; Pearson, J.P. (2014). The modulation of pancreatic lipase activity by alginates. **Food Chem.** 146: 479 – 484.
- Williamson, D.A.; Gieselmann, P.J.; Lovejoy, J.; Greenway, F.; Volaufova, J.; Martin, C.K.; Arnett, C.; Ortego, L. (2006). Effects of consuming mycoprotein, tofu or chicken upon subsequent eating behaviour, hunger and safety. **Appetite.** 46: 41 – 48.
- Wong, G.J. (1993). Mating and fruiting studies of *Auricularia delicata* and *A. fuscosuccinea*. **Mycologia.** 85: 187 – 194.
- Xiao, Y.; Xing, G.; Rui, X.; Li, W.; Chen, X.; Jiang, M.; Dong, M. (2015). Effect of solid-state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 on physicochemical and functional properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour. **LWT – Food Sci Technol.** 63: 1317 – 1324.
- Xiao, Y.; Huang, L.; Chen, Y.; Zhang, S.; Rui, X., Dong, M (2016). Comparative study of the effects of fermented and non-fermented chickpea flour addition on quality and antioxidant properties of wheat bread. **CyTA – Journal of Food.** 14: 621 – 631.
- Yahaya, N.F.M.; Rahman, M.A.; Abdullah, N. (2014). Therapeutic potential of mushrooms in preventing and ameliorating hypertension. **Trend Food Sci Technol.** 39: 104 – 115.

- Yamaguchi, T.H.; Takamura, T.; Matoba; J. Terao (1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci Biotechnol Biochem.** 62: 1201-1204.
- Yang, X-W.; Huang, M-Z.; Jin, S-H.; Sun, L-N.; Song, Y.; Chen, H-S. (2012). Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. **Fitoterapia.** 83: 1169 – 1175.
- Zangalli, M.R.; Giovanni, R.N. (2013). Capacidade antioxidante de extratos de bagaço de uva miceliado pelo fungo *Pleurotus sajor-caju*. **Evidência.** 13: 57 – 64.
- Zeng, W.; Zhang Z.; Gao H.; Jia L.; Chen, W. (2012). Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. **Carbohydr Polym.** 89: 694 – 700.
- Zengin, G.; Sarikurkcu, C.; Aktumsek, A.; Ceylan, R.; Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. **Ind Crop Prod.** 53: 244 – 251.
- Zepka, L.Q.; Jacob-Lopes, E.; Goldbeck, R.; Souza-Soares, L.A.; Queiroz, M.I. (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothecace microscopica Nägeli*. **Bioresour Technol.** 101: 7107 – 7111.
- Zhai, F-H.; Wang, Q.; Han, J-R. (2015) Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. **J Cereal Sci.** 65: 202 – 208.
- Zhai, F-H.; Han, J-R. (2016). Mycelial biomass and intracellular polysaccharides yield of edible mushroom *Agaricus blazei* produced in wheat extract medium. **LWT – Food Sci Technol.** 66: 15 – 19.
- Zhai, F-H.; Liu, H-Y.; Han, J-R. (2018) Protein nutritional value, polyphenols and antioxidant properties of corn fermented with *Agaricus brasiliensis* and *Agaricus bisporus*. **World J Microbiol Biotechnol.** 34 – 36: 1 – 8.
- Zhang, Z.; Lv, G.; Pan, H.; Fan, L.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2012). Production of powerful antioxidant supplements via solid-State fermentation of wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. **Food Technol Biotechnol.** 50: 32-39.
- Zhao, S.; Rong, C.; Liu, Y.; Xu, F.; Wang, S.; Duan, C.; Chen, J.; Wu, X. (2015). Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti hypercholesterolemic effect in rats. **Carbohydr Polym.** 122: 39 – 45.
- Zheng, Z.; Shetty, K. (1998). Solid-state production of beneficial fungi on Apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. **J Agric Food Chem.** 46: 783-787.
- Zou, Y.; Ma, K. (2018). Screening of *Auricularia auricula* strains for strong production ability of melanin pigments. **Food Sci Technol.** 38: 41-44.