

# DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $\beta$ -GLUCANO EM COGUMELO *Agaricus blazei* Murill POR MÉTODO ENZIMÁTICO<sup>1</sup>

Yong K. PARK<sup>2,\*</sup>, Masaharu IKEGAKI<sup>2</sup>, Severino M. ALENCAR<sup>2</sup>, Claudio L. AGUIAR<sup>2</sup>

## RESUMO

Cogumelos comestíveis contêm importantes propriedades funcionais. Em particular,  $\beta$ -glucanos, homo- e hetero-glucanos com ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow3)$ ,  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$ , supostamente responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde humana, como atividade imunomodulatória, antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena. Neste trabalho, a quantidade de  $\beta$ -glucano presente em cogumelo *Agaricus blazei* Murill, coletados de três diferentes locais, foi analisada utilizando-se método enzimático. As amostras (em base seca) foram tratadas com  $\alpha$ -amilase, protease bacteriana e com glicoamilase fúngica.  $\beta$ -glucano foi quantificado após hidrólise ácida e determinação da glicose liberada. Foi verificado que amostras de *A. blazei* Murill cultivadas em estufas apresentaram menor concentração de  $\beta$ -glucano ( $8,4\pm 0,9$  e  $7,6\pm 2,8$ g/100g) quando comparado com amostras cultivadas em campo aberto ( $10,1\pm 2,1$ g/100g). Observou-se ainda que, mesmo sendo cultivado em condições semelhantes, porém em locais diferentes, as amostras apresentaram diferenças significativas ( $7,6\pm 2,8$  e  $8,4\pm 0,9$ g/100g).

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glucano; determinação enzimática; *Agaricus blazei* Murill.

## SUMMARY

DETERMINATION OF  $\beta$ -GLUCAN CONCENTRATION IN *Agaricus blazei* Murill MUSHROOM BY ENZYMIC METHOD. Edible mushrooms contains a very interesting functional properties. Among them, the  $\beta$ -glucans, polysaccharides with  $\beta-1,3$ ;  $\beta-1,4$  and  $\beta-1,6$ glucosidic linkages, they are responsible to a series of properties to human health, such as immunomodulatory, antioxidant, antiinflammatory and, antitumoral activities. In the present work, the *Agaricus blazei* Murill  $\beta$ -glucan concentrations from three locations, were determined through the enzymatic method. Samples were treated with  $\alpha$ -amylase, bacterial protease and fungal glucoamylase.  $\beta$ -glucans were quantified after acid hydrolysis and, the glucose determined for spectrophotometric method. It was verified that samples cultivated inside stoves presented smaller  $\beta$ -glucan concentration ( $8.4\pm 0.9$  and  $7.6\pm 2.8$ g/100g), when compared with samples cultivated in open field ( $10.1\pm 2.1$ g/100g). It was also observed that the samples cultivated in similar conditions, even so in different place, presented significant differences ( $7.6\pm 2.8$  and  $8.4\pm 0.9$ g/100g).

**Keywords:**  $\beta$ -glucan; enzymatic determination; *Agaricus blazei* Murill.

## 1 - INTRODUÇÃO

A maioria dos cereais contêm quantidades variáveis de  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucanos. Esses polissacarídeos são comuns entre os cereais e ocorrem em grande quantidade no endosperma e na parede celular de cevada, trigo e aveia [2, 11]. A importância metabólica do  $\beta$ -glucano na saúde e na nutrição humana foi recentemente revisada por KLOPFENSTEIN [15]. Alimentos à base de aveia, ricos em fibras solúveis em água têm sido descritos como produtos hipocolesterolêmicos em humanos e, tem despertado interesse crescente junto à comunidade médica [1, 27]. O  $\beta$ -glucano (*Figura 1*) é encontrado em todos cereais, mas as concentrações são maiores em aveia e cevada, com valores na faixa de 2 a 6% [10]. Os cogumelos comestíveis também apresentam compostos que têm propriedades funcionais, em particular os homo e hetero-glucanos com ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$  [16]. No entanto, além das propriedades farmacológicas encontradas nos polissacarídeos de origem vegetal, os polissacarídeos de origem fúngica apresentam várias outras propriedades tais como atividades antitumoral, imunomodulatória, antiviral, antimicrobiana e antiparasitária [3, 9, 34]. Entre

as atividades farmacológicas relacionadas a diversas espécies de cogumelos que contêm  $(1\rightarrow3)$  e  $(1\rightarrow6)$ - $\beta$ -D-glucano, está a atividade antitumoral [3, 9, 14, 16, 19, 20, 21]. De acordo com KAWAGISHI *et al.* [13, 14] a fração de polissacarídeo extraído de *Agaricus blazei*, que apresenta atividade antitumoral é composta de um complexo de  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucano e proteínas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelos *Agaricus blazei* Murill cultivados no Brasil e no Japão em duas condições distintas (estufa e campo) através de método descrito por PROSKY *et al.* [29] e modificado pela "Foundation of Japanese Food Analysis Center" [8], pela quantificação de glicose liberada após sucessivas hidrólises enzimática e química.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

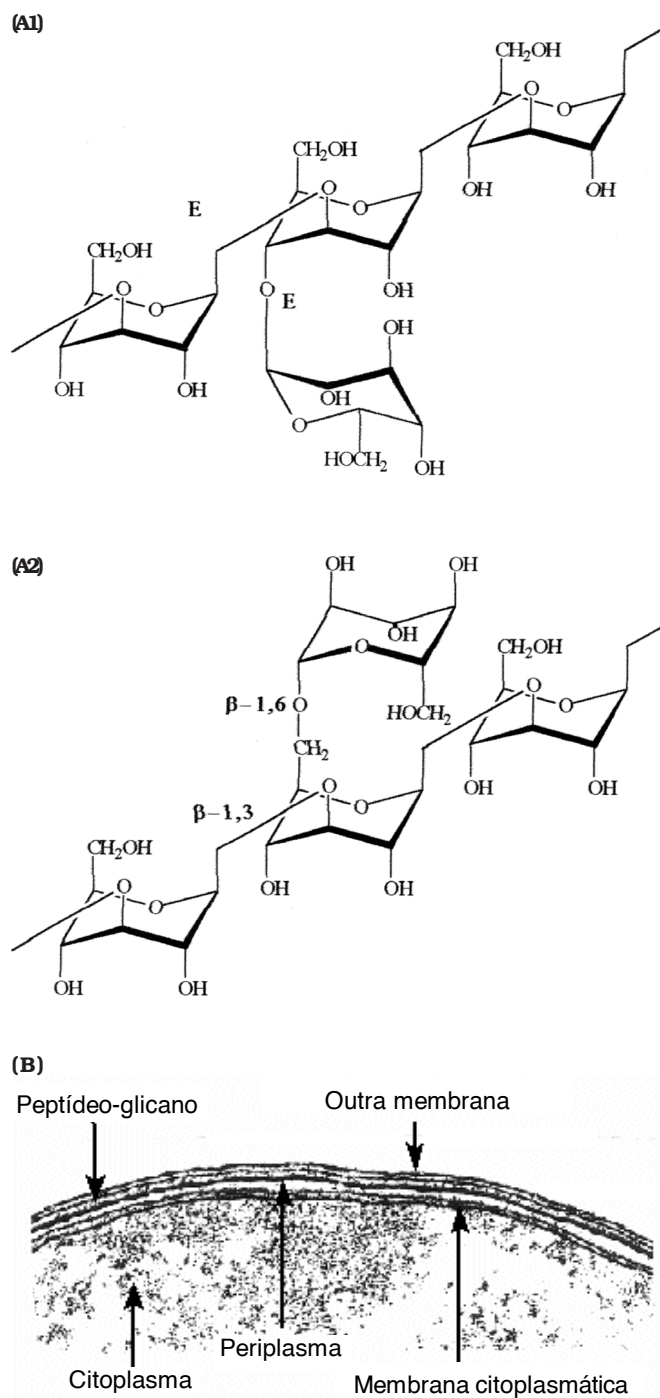
### 2.1 - Amostras

As amostras de cogumelos foram cultivadas no Brasil e no Japão, e em duas condições distintas de acordo com a *Tabela 1*. O cogumelo foi cultivado em estufa a  $25\pm 0,2^\circ\text{C}$  e umidade relativa (U.R.) superior a 90%, por 6 dias, sobre composto orgânico produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz, esterco de gado e galinha, contidos em sacos plásticos de 60 quilos. Para a amostra cultivada no campo, a incubação foi feita em composto orgânico coberto com terra estéril, em valas, a temperatura ambiente, a temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e U.R. aproximada de 60%.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 21/12/2000. Aceito para publicação em 23/04/2003 (000557).

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Bioquímica, Caixa Postal, 6177, CEP. 13083-970, Campinas/SP, Brasil. E-mail: ykpark@fea.unicamp.br

\* A quem a correspondência deve ser enviada.



**FIGURA 1.** (A1 e A2) Unidades estruturais de  $\beta$ -glucanos encontrados em cereais e microrganismos e (B) estrutura da parede celular de leveduras.

**TABELA 1.** Locais e condições de cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murill

Amostras	Local	Condição	Umidade relativa (%)	Temperatura (°C)
J	Japão	Estufa	> 90	25±0,2
C	São Paulo	Estufa	> 90	25±0,2
R	São Paulo	Campo	50 - 60	25±2,0

## 2.2 - Preparo do cogumelo

As amostras foram coletadas, lavadas e imediatamente colocadas em estufa com circulação forçada a 60°C por 24h, para a secagem do cogumelo. Terminado o processo de desidratação, as amostras foram acondicionadas em dessecador e armazenadas em freezer (-10°C) até o momento de sua análise. As amostras foram pulverizadas utilizando um triturador LI-5 (capacidade de 5L e motor de 3/4 Hp, Reimse Co.), peneiradas (0,3mm) e imediatamente analisadas.

## 2.3 - Determinação do $\beta$ -glucano

A determinação de  $\beta$ -glucano foi realizada em triplicata, conforme a metodologia descrita por PROSKY *et al*. [29] e modificada pela "Foundation of Japanese Food Analysis Center" [8]. Esse método consiste em hidrólises enzimáticas e químicas, e constitui o método analítico oficial japonês para determinação de  $\beta$ -glucano. Aliquotas de 1g das amostras desidratadas e trituradas, foram acondicionadas em frascos de Erlenmeyer (500mL) com 50mL de tampão fosfato 80mM e pH 6,0. Em seguida, foram tratadas com: (a)  $\alpha$ -amilase termostável Termamyl 120L (Novo Nordisk; 0,1mL de enzima, incubada por 30min em banho-maria em ebulição), (b) protease neutra bacteriana (Novo Nordisk; 0,1mL de enzima, pH 7,5; ajustado com NaOH 25mM, incubado por 30 min a 60°C) e (c) amiloglicosidase AMG 200L (Novo Nordisk; 0,3mL de enzima, pH 4,0-4,5, ajustado com HCl 75mM, incubado por 30 min a 60°C). Após os tratamentos enzimáticos, foram adicionados 200mL de solução 95% de álcool etílico, e os frascos foram mantidos a 60°C por 60 minutos. Em seguida, as fibras solúveis precipitadas com etanol e fibras insolúveis foram separadas por centrifugação a 20000g por 10 minutos. Os precipitados lavados com solução 80% de álcool etílico e acetona, continham sais insolúveis, proteínas não-digeridas e fibras insolúveis, como descrito por MANZI & PIZZOFERRATO [16]. O procedimento de lavagem dos precipitados foi repetido por 3 vezes. Após evaporação do etanol e da acetona excedentes foram adicionados 10mL de solução 72% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e os frascos foram incubados a 20°C por 4h, para hidrólise das fibras, compostas basicamente de  $\beta$ -glucanos. Em seguida, foram adicionados 140mL de água destilada, sendo os frascos incubados em banho-maria em ebulição por 2h. Após este período, o pH das misturas foi ajustado até a neutralidade utilizando NaOH 5M, e o volume final completado para 300mL. Em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº5B Advantec e a quantidade de glicose foi determinada pelo método enzimático utilizando-se 4-aminofenazona (0,025 mol/L) e fenol (0,055 mol/L) na presença de glicose oxidase (1 U/mL) e peroxidase (0,15 U/mL) (LaborLab Ltda., Guarulhos/SP). A concentração de  $\beta$ -glucano (g/100g), presente nos cogumelos em base seca, foi calculada através da equação:

$$\beta\text{-glucano (g/100g)} = \text{Glicose (g/100g)} \times 0,9 \quad (1)$$

## 2.4 - Análise estatística

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, sendo que a análise estatística dos resultados obtidos de 3 repetições. Os dados obtidos da concentração de  $\beta$ -glucano foram analisados pelo programa MSTAT-C [22] para a determinação da análise da variância e comparação de médias através do teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se a metodologia da determinação de  $\beta$ -Glucano proposta por PROSKY *et al.* [29] e modificada pela "Foundation of Japanese Food Analysis Center" [8], as amostras de cogumelos foram submetidas a tratamento com  $\alpha$ -amilase bacteriana Termamyl, para a hidrólise do amido seguidas com protease e com amiloglicosidase para hidrólise de oligossacarídeos residuais para remoção de proteínas digeríveis. O resíduo obtido foi lavado para a remoção de sais insolúveis, proteínas não digeridas e fibras insolúveis. As amostras de  $\beta$ -glucano foram hidrolisadas com ácido e a quantidade de glicose formada foi determinada pelo método enzimático com glicose oxidase e peroxidase. O uso de enzimas altamente purificadas é requerido na análise de  $\beta$ -glucano em alimentos, pois a contaminação das preparações enzimáticas com enzimas que hidrolisam o amido, pode resultar na produção de açúcares livres, como glicose de outra fonte que não seja do  $\beta$ -glucano, e isto poderia superestimar o conteúdo de  $\beta$ -glucano. A glicose oxidase e peroxidase usadas na determinação da glicose devem ser essencialmente livres de catalase e  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicosidase [18]. Por este motivo, as preparações enzimáticas utilizadas neste trabalho foram obtidas de fornecedores que garantissem a pureza requerida. Além disto, a metodologia utilizada foi inicialmente elaborada para determinação do conteúdo de  $\beta$ -glucano em cereais, onde o teor das fontes potenciais de glicose, como amido ou celulose/hemicelulose, são consideravelmente inúmeras. O cogumelo *Agaricus blazei*, possui teor reduzido, senão inexistente destes polissacarídeos; e neste trabalho foram utilizadas enzimas puras no tratamento enzimático das amostras trituradas de *A. blazei*. Como sugerido por McCLEARY [17] o método proposto por McCLEARY para análise de  $\beta$ -glucanos, tem sido aplicado pelo Sub-Comitê do "Cereal Chemistry Division of the Royal Australian Chemical Institute", e atualmente é recomendado como método australiano [33]. DALIES *et al.* [6] afirmam que a parede celular de fungos e leveduras, são compostas principalmente, de  $\beta$ -glucanos, que hidrolisados levariam à formação de glicose, e de *mananas* e *quitina* (Figura 2), que hidrolisados levariam a formação de outras hexoses, como manose, e N-acetilglicosamina. A composição da parede celular de *Fusarium oxysporum* foi analisada por SCHOFFELMEER *et al.* [32], sendo encontrados principalmente, quitina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanos, e a análise de açúcares destes polissacarídeos mostrou não somente a presença de glicose e N-acetilglicosamina, mas também de manose, galactose e ácido urônico. Algumas

algas e oomicetos possuem ainda celulose em suas paredes celulares, que poderiam, após tratamento enzimático, formar um excedente de glicose que acarretaria em valores superestimados de  $\beta$ -glucanos.

Em geral, os métodos descritos na literatura para determinação de  $\beta$ -glucanos, foram desenvolvidos para análise de  $\beta$ -glucanos de cereais com ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$  [18]. De fato, cereais contêm essencialmente  $\beta$ -glucanos com ligações mistas de  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ , enquanto cogumelos apresentam maiores quantidades de  $\beta(1\rightarrow4)(1\rightarrow6)$  que  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$  e diferentes ligações simples como  $\beta(1\rightarrow3)$ ,  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$  [23]. Na Tabela 2, são apresentados os teores de  $\beta$ -glucano presentes nas amostras de cogumelo *A. blazei* em duas condições de cultivo. Os teores de  $\beta$ -glucano representam os valores médios de três avaliações e a comparação entre as médias foi feita considerando-se 5% de significância.

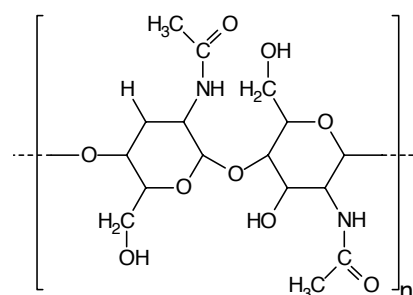


FIGURA 2. Estrutura química de quitina encontrados em microorganismos.

TABELA 2. Concentração de  $\beta$ -glucano das amostras de cogumelo *Agaricus blazei* Murill cultivadas no Brasil e no Japão em diferentes condições\*

Amostra	Local/Condição	$\beta$ -glucano** (g/100 g cogumelo seco)
J	Japão (estufa)	7,6 $\pm$ 2,8 <sup>C</sup>
C	São Paulo (estufa)	8,4 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>
R	São Paulo (campo)	10,1 $\pm$ 2,1 <sup>A</sup>

\*Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey;  $p < 0,05$ )

\*\* concentrações foram expressas em porcentagem (p/p), considerando um grama de  $\beta$ -glucano por 100g de cogumelo, em base seca.

As amostras cultivadas em estufa, tanto no Brasil como no Japão, apresentaram menor concentração de  $\beta$ -glucano quando comparadas com a amostra cultivada em campo e, observou-se ainda que, houve diferença significativa no teor de  $\beta$ -glucano entre as duas amostras cultivadas em estufa.

Esta diferença pode ter sido causada devido à variação na qualidade do composto utilizado para o cultivo do cogumelo bem como alterações nas condições ambientais dentro das estufas. Verificou-se ainda que comparando as amostras C e R, cultivadas em estufa e no campo, respectivamente, houve diferença significativa no teor de  $\beta$ -glucano entre as duas formas de cultivo, levando a concluir que a melhor concentração deste polissacarídeo

pode ser obtida se o cogumelo for cultivado no campo. Nesse caso existem alguns fatores como chuva, variação brusca de temperatura, pragas, etc, que podem afetar de forma negativa o cultivo dos cogumelos. Estes fatores agrícolas, têm afetado o teor de  $\beta$ -glucano, quando se trata de cultivo de cereais, porém o efeito destes fatores agrícolas não foram analisados para o cultivo de cogumelos em campo. Algum estudo neste sentido poderia ser feito, para que se possa elaborar um protocolo de produção destes cogumelos com um teor de  $\beta$ -glucano que seja maior e invariável.

MANZI & PIZZOFERRATO [16] utilizaram método analítico similar ao empregado neste trabalho e encontraram teores de  $\beta$ -glucano em cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii* e *Lentinula edodes* na faixa de 0,21 e 0,53g/100g de cogumelo seco. Outros autores, como DALLIES *et al.* [6] por sua vez, avaliaram teores de  $\beta$ -glucanos em *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto SANDULA *et al.* [31] avaliaram a presença de  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucano nas paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Aspergillus niger*. NGUYEN *et al.* [24] afirmaram que a parede celular de leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Kloeckera apiculata*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Saccharomyces cerevisiae*, representa de 26-32% da massa seca do organismo, e que as manoproteínas representam 25-34% da parede celular, os glucanos insolúveis em álcali, de 15-48%, e por último, os glucanos solúveis em álcali, de 10-48%. CHEUNG & LEE [4] analisaram *Pleurotus tuber* e encontraram concentrações de fibras totais solúveis em álcali de 126 e 293g/kg de cogumelo, sendo que destas fibras foram encontrados principalmente  $\beta$ -glucano (ligações do tipo  $\beta-1,3$ ,  $\beta-1,4$  e  $\beta-1,6$ ) e quitina. No método proposto por OHNO *et al.* [25] para extração de  $\beta-(1\rightarrow3)$ -glucano solúvel de *Candida* spp. pela oxidação com hipoclorito de sódio e subsequente extração com dimetilsulfóxido, foi obtido 9,6% de  $\beta$ -glucano, que continha principalmente ligações do tipo  $\beta-1,3$  e  $\beta-1,6$ .

Em termos comparativos, em grãos, diferentes trabalhos apresentam teores variáveis para o teor de  $\beta$ -glucano em grãos de cereais, como aveia e cevada. SAASTAMOINEN *et al.* [30] encontraram teores médios de  $\beta$ -glucano em aveia variando de 1,9 a 5,1% (p/v). CHO & WHITE [5] relataram que o conteúdo de  $\beta$ -glucano em grãos de 243 amostras de aveia, mostraram uma distribuição normal com a maioria das amostras em torno de 4,5-5,5% de  $\beta$ -glucano por 100g de aveia seca. Os autores verificaram que a variabilidade genética dos cultivares afetou o conteúdo de  $\beta$ -glucano. O mesmo foi observado por PETERSON *et al.* [28] e OUARNIER *et al.* [26], que também verificaram que o conteúdo de  $\beta$ -glucano em aveia (*Avena sativa*) variou com a época de colheita entre outros fatores agrícolas. Um conteúdo maior foi encontrado por WELCH *et al.* [35], quando analisaram *Avena atlantica*, a qual apresentou teores de 2,2 a 11,3g de  $\beta$ -glucano por 100g do grão. Em grãos de cevada, estes valores podem chegar a 3,5-4,8% [7]. Estas variações segundo HUBIK & TICHY [12], estão associadas ao genótipo e local em que o cereal foi cultivado. Fatores como a fertilização do solo não mostraram ter efeito significativo no aumento de  $\beta$ -glucano em cereais.

## 4 - CONCLUSÕES

A concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* variou significativamente conforme a forma de cultivo, sendo que os cogumelos cultivados em São Paulo, em estufa apresentavam menor concentração de  $\beta$ -glucano (8,4 $\pm$ 0,9g/100g de cogumelo em base seca), quando comparado com amostras cultivadas no campo (10,1 $\pm$ 21g/100g de cogumelo em base seca).

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSON, J. W.; STORY, L.; SIELING, B.; CHEN, W. J.L.; PETRO, M. S.; STORY, J. Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 40, n. 6, p. 1146-1155, 1984.
- [2] CARR, J. M.; GLATTER, S.; JERACI, J. L.; LEWIS, B. A. Enzymatic determination of  $\beta$ -glucan in cereal-based food-products. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 226-229, 1990.
- [3] CHEUNG, P. C.K. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 9, p. 1512-1516, 1998.
- [4] CHEUNG, P. C.K.; LEE, M.Y. Fractionation and characterization of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) as potential nutraceuticals from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3148-3151, 2000.
- [5] CHO, K.C.; WHITE, P. J. Enzymatic analysis of beta-glucan content in different oat genotypes. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 539-542, 1993.
- [6] DALLIES, N. ; FRANCOIS, J.; PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall: Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 14, p. 1297-1306, 1998.
- [7] ENGSTROM, D.F.; MATHISON, G.W.; GOONEWARDENE, L.A. Effect of beta-glucan, starch, and fiber content on steam vs dry rolling of barley-grain on its degradability and utilization by steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 37, n. 1-2, p. 33-46, 1992.
- [8] FOUNDATION OF JAPANESE FOOD ANALYSIS CENTER, No 398040072-001 52-1, Yoyogi-Machi, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan. 1980.
- [9] FUJIMIYA, Y.; KOBORI, H.; OSHIMAN, K.; SODA, R.; EBINA, T. Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. **Journal of Japan Society of Food Science**, v. 45, n. 4, p. 246-252, 1998.
- [10] GENÇ, H.; OZDEMIR, M.; DEMIRBAS, A. Analysis of mixed-linked (1-3), (1-4)-B-D-glucans in cereals grains from Turkey. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 221-224, 2001.
- [11] HENRY, R. J. Pentosan and (1-3),(1-4)-beta-glucan concentrations in endosperm and whole grain of wheat, barley, oats and rye. **Journal of Cereal Science**, v. 6, n. 3, p. 253-258, 1987.
- [12] HUBIK, K.; TICHY, F. Effects of ecological and cropping factors on beta-glucan content in oats. **Rostlinna Vyroba**, v. 42, n. 1, p. 29-33, 1996.

- [13] KAWAGISHI, H.; KATSUMI, R.; SAZAWA, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Cyto-toxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2777-2779, 1988.
- [14] KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; YUMEN, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research**, v. 186, n. 2, p. 267-273, 1989.
- [15] KLOPFENSTEIN, C. F. The role of cereal  $\beta$ -glucans in nutrition and health. **Cereal Foods World**, v. 33, n. 10, p. 865, 1988.
- [16] MANZI, P. ; PIZZOFERRATO, L.  $\beta$ -glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.
- [17] McCLEARY, B. V. Importance of enzyme purity and activity in the measurement of total dietary fiber and dietary fiber components. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 83, n. 4, p. 997-1005, 2000.
- [18] McCLEARY, B. V.; HOLMES, M. G. Enzymic quantification of (1-3),(1,4)  $\beta$ -glucan in barley and malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, n. 5, p. 285-295, 1985.
- [19] MIZUNO, T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. **Food and Food Ingredient Japanese Journal**, v. 167, p. 69-85, 1996.
- [20] MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. 13. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.
- [21] MIZUNO, T.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 434-437, 1998.
- [22] MSTAT-C. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Norway: MSTAT Distribution, n. p. , 1998.
- [23] MULLINS, J. T. Regulatory mechanism of  $\beta$ -glucan synthetases in bacteria, fungi and plants. **Physiological Plantarum**, v. 78, n. 2, p. 309-314, 1990.
- [24] NGUYEN, T. H.; FLETE, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 206-212, 1998.
- [25] OHNO, N. ; UCHIYAMA, M.; TSUZUKI, A.; TOKUNAKA, K.; MIURA, N. N. ; ADACHI, Y.; AIZAWA, M. W.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; YADOMAE, T. Solubilization of yeast cell-wall  $\beta$ - $(1,3)$ -D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. **Carbohydrate Research**, v. 316, n. 1-4, p. 161-172, 1999.
- [26] OUARNIER, N. A.; QUEMENER, B.; BERTRAND, D.; BOIVIN, P. Application of high performance anion exchange chromatography to the study of carbohydrate changes in barley during malting. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 1, p. 45-52, 2000.
- [27] OZDEMIR, M.; GENÇ, H.  $\beta$ -glucan contents of cereal grains grown in Turkey. **Energy Education Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 10-17, 2001.
- [28] PETERSON, D. M.; WESENBERG, D. M.; BURRUP, D. E.  $\beta$ -Glucan content and its relationship to agronomic characteristics in elite oat germplasm. **Crop Science**, v. 35, n. 4, p. 965-970, 1995.
- [29] PROSKY, L.; ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food-products - Interlaboratory study. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 1017-1023, 1988.
- [30] SAASTAMOINEN, M.; PLAAMI, S.; KUMPULAINEN, J.  $\beta$ -glucan and phytic acid content of oats cultivated in Finland. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 42, n. 1, p. 6-11, 1992.
- [31] SANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURAKOVA, M.; MACHOVA, E. Microbial (1-3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 1999.
- [32] SCHOFFELMEER, E. A. M.; KLIS, F. M.; SIETSMA, J. H.; CORNELISSEN, B. J. C. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2/3, p. 275-282, 1999.
- [33] VIS, R. B.; LORENZ, K.  $\beta$ -glucans: importance in brewing and methods of analysis. **Lebensmittel-Wissen und-Technologie**, v. 30, n. 4, p. 331-336, 1997.
- [34] WASSER, S. P. ; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. **Critical Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.
- [35] WELCH, R. W.; BROWN, J. C. W.; LEGGETT, J. M. Interspecific and intraspecific variation in grain and great characteristics of wild oat (*Avena*) species: very high great (1,3),(1,4)- $\beta$ -glucan in an *Avena atlantica* genotype. **Journal of Cereal Science**, v. 31, n. 3, p. 273-279, 2000.