

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Adilson Feldhaus Junior

**Avaliação do bagaço de malte como substrato para cultivo de
Pleurotus spp. (Basidiomycota: PLEUROTACEAE)**

Florianópolis

2020

Adilson Feldhaus Junior

**Avaliação do bagaço de malte como substrato para cultivo de
Pleurotus spp. (Basidiomycota: PLEUROTACEAE)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Neves

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Feldhaus Junior, Adilson

Avaliação do bagaço de malte como substrato para cultivo
de *Pleurotus* spp. (Basidiomycota: PLEUROTACEAE) / Adilson
Feldhaus Junior ; orientadora, Maria Alice Neves, 2020.
42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Cogumelos comestíveis. 3.
Bagaço de malte. I. Neves, Maria Alice. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

Adilson Feldhaus Junior

**Avaliação do bagaço de malte como substrato para cultivo de
Pleurotus spp. (Basidiomycota: PLEUROTACEAE)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado à disciplina BIO7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II, julgado adequado para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas da UFSC.

Florianópolis, 24 de novembro de 2020.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Orientadora:

Profa. Maria Alice Neves, Dra.
Orientadora
BOT/UFSC

Banca Examinadora:

MSc. Mariana de Paula Drewinski
Instituto de Botânica - SP

MSc. Angelo Piaia

Prof. Nelson Menolli Jr, Dr.
DCM/IFSP

Dedico esse trabalho aos entusiastas da micologia que, assim como eu, acreditam que os fungos podem salvar o mundo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora, Maria Alice, quem me apresentou o incrível mundo dos fungos e despertou uma paixão que certamente carregarei por toda vida. Seu entusiasmo e dedicação são inspiradores.

Aos meus pais, Iana e Adilson, por investirem seu tempo e esforços para me proporcionar uma educação de qualidade. Sou muito grato por todas as oportunidades, pelo suporte e especialmente por sempre acreditarem em mim. Esse momento só é possível graças a vocês.

À Angela, minha companheira de vida. Obrigado por estar sempre ao meu lado, me auxiliando, acalmando e tornando os dias mais leves.

À banca, Angelo, Mariana e Nelson, por prontamente aceitarem o convite e pela disposição em contribuir com esse trabalho. Tenho profunda admiração pelo trabalho de vocês, muito obrigado por fazerem parte desse momento.

Aos meus colegas do Micolab e do departamento de botânica, por todo auxílio, aprendizado, pelas saídas de campo e eventos micológicos. Especialmente à Emanuela Weidlich pelo auxílio com as análises estatísticas.

Agradeço à Lia e ao Rafael da Cervejaria Refúgio, por terem gentilmente doado o bagaço de malte.

E a todos amigos que fiz durante a vida, estejam próximos ou distantes. Agradeço especialmente ao Fernando Silveira, Gabriel Vitor e João 'Percy' Kraisch, pelas risadas, conversas e parceria.

A reação mais comum da mente humana a uma conquista não é satisfação, e sim o anseio por mais.

(Harari, Y. N. – Homo Deus, p. 30)

RESUMO

O bagaço de malte, principal resíduo sólido da produção de cervejas, foi utilizado com sucesso para o cultivo micelial de três espécies do gênero *Pleurotus* e para produção de basidiomas de *P. djamor*. O Brasil é o terceiro maior produtor de cervejas do mundo e gerou cerca de 2,5 milhões de toneladas de bagaço de malte anualmente entre 2006 e 2016. Também chamado de SBG (*Spent Beer Grains*), esse material lignocelulósico é abundante e subutilizado, disponível a um baixo custo e rico em proteínas e fibras. O presente estudo teve como objetivo avaliar o bagaço de malte como matéria-prima para o cultivo de micélio e basidiomas de *Pleurotus* spp., um gênero de importância comercial. Foram descritas e analisadas as características físicas do crescimento micelial de *Pleurotus djamor*, *P. eryngii* e *P. ostreatus* em meios de cultura à base de batatas e à base de SBG. Para as três espécies avaliadas, o meio de cultura SBG-Ágar foi colonizado tão ou mais eficientemente que os meios de cultura à base de batatas. As características nutricionais do bagaço e a densidade micelial atingida sustentam a possibilidade de se utilizar o resíduo em projetos de micorremediação, produção de biomateriais e como alimento. Em sequência, foi avaliado o cultivo de *Pleurotus djamor* em seis diferentes substratos formados por 20% farelo de trigo, 2% CaCO₃ e proporções variáveis de SBG e serragem de *Eucalyptus* sp. A maior eficiência biológica (55,0%) foi atingida no substrato contendo 45% SBG, enquanto a corrida micelial mais rápida ocorreu nos tratamentos com 15 e 30% SBG. De forma geral, as características físicas do resíduo são consideradas ideais para o cultivo de fungos, porém o alto teor de nutrientes e umidade facilita o aparecimento de contaminações, exigindo a utilização rápida após a produção e um processo de desinfecção eficiente. O cultivo de fungos em bagaço de malte pode ser uma eficiente estratégia para aproveitar o potencial energético desse resíduo agroindustrial e futuros estudos devem avaliar também outras espécies e formulações de substrato.

Palavras-chave: SBG. Cevada. Cogumelos.

ABSTRACT

Malt bagasse, the major solid residue from the brewing process, was successfully used for the mycelial cultivation of three species of the genus *Pleurotus* and basidiome production of *P. djamor*. Brazil is the third largest beer producer worldwide, and from 2006 to 2016 has generated 2.5 million tons of the residue, annually. Also known as SBG (Spent Beer Grains), this lignocellulosic material is abundant and underused, available at low costs and rich in proteins and fibers. The aim of this study was to evaluate malt bagasse as a raw material for *Pleurotus* spp. mycelium and basidiome cultivation. Physical characteristics of the mycelial expansion of *Pleurotus djamor*, *P. eryngii* and *P. ostreatus* were described and evaluated for potato- and SBG-based growth media. For all the three species analysed, SBG-based growth media was colonized as or more efficiently than potato-based growth media. Both the nutritional characteristics of the bagasse and the great mycelial density achieved sustain the possibility of employing the residue as food and in mycoremediation and biomaterials projects. Subsequently, the cultivation of *Pleurotus djamor* on six different substrates made of 20% wheat bran, 2% CaCO₃ and variable proportions of SBG and *Eucalyptus* sp. sawdust was evaluated. The treatment with 45% SBG achieved the highest biological efficiency (55,0%), whilst the fastest mycelial running was obtained on substrates composed of 15 and 30% SBG. In general, SBG's physical characteristics are considered ideal for fungal cultivation, although the high nutrient and water content favour contaminants, therefore requiring an efficient disinfection process and a quick use after production. Mycelium and mushroom cultivation on malt bagasse might be an efficient strategy to harness the energetic potential of this agroindustrial residue and future studies should evaluate its use in different substrate formulations and for other species cultivation.

Key-words: SBG. Barley. Mushrooms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corrida micelial de *Pleurotus djamor* em substratos com diferentes proporções de bagaço de malte. a) Substratos posicionados em tubos de borossilicato com tampões de algodão em ambas as extremidades; b) Substratos inoculados, ao terceiro dia de colonização; c) Substratos ao oitavo dia de colonização; d) Substratos ao décimo-quarto dia de colonização....25

Figura 2. Preparo de substrato e colheita. a) Inóculo (*spawn*) colonizado com micélio de *Pleurotus djamor*; b) Inóculo e recipientes de cultivo em câmara de fluxo laminar; c) Sulco central nos recipientes de cultivo para inoculação; d) Basidiomas recém-colhidos, antes da inversão das bordas do píleo; e) Recipientes de cultivo colonizados com micélio de *P. djamor*.....26

Figura 3. Tempo para colonização total dos meios de cultura por *Pleurotus djamor*, *P. ostreatus* e *P. eryngii*. Símbolos representam o tratamento: Círculo - Batata-Açúcar-Ágar (BAA); Quadrado - Batata-Dextrose-Ágar (BDA); Losango - Bagaço de Malte-Ágar (SBG).....28

Figura 4. Crescimento micelial em placas de Petri. a) Micélio zoneado de *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), 8 dias após inoculação; b) Meio de cultura com coloração alterada, pontos e linhas negros. *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura Batata-Açúcar-Ágar (BAA), 20 dias após inoculação; c) Basidiomas de *P. djamor* crescendo na lateral da placa, meio de cultura BDA, 23 dias após inoculação; d) Micélio de *P. eryngii* em meio de cultura Bagaço de Malte-Ágar (SBG), 10 dias após inoculação.....30

Figura 5. Crescimento micelial de *Pleurotus djamor* em diferentes formulações de substrato. Os números 1-6 indicam os tratamentos descritas na Tabela 1, destacando o percentual de bagaço de malte presente em cada um. O tamanho do micélio apresentado é a média com desvio-padrão das triplicatas para cada tratamento.....31

Figura 6. *Boxplot* apresentando a Eficiência Biológica (EB) de *Pleurotus djamor* em diferentes tratamentos. Os substratos 1-6 são os descritos na Tabela 1. Em destaque, as diferentes proporções (%) de bagaço de malte em cada tratamento.....32

Figura 7. Eficiência Biológica (EB) e Crescimento Micelial Máximo aos 17 dias de *Pleurotus djamor* em substratos contendo diferentes proporções de Bagaço de Malte (SBG - Em destaque). Os tratamentos são os descritos na Tabela 1.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos substratos utilizados para o cultivo de basidiomas e corrida micelial de *Pleurotus djamor*.....24

Tabela 2. Teor de umidade de amostras de bagaço de malte (SBG - *Spent Beer Grains*) recém-coletadas.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAA – Batata-Açúcar-Ágar

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio (Câmara de cultivo)

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

EB – Eficiência Biológica

INPM – Instituto Nacional de Pesos e Medidas

OAC – *Online Auction Color Chart*

PP – Polipropileno

r – Raio (metade do diâmetro)

SBG – *Spent Beer Grains* (Bagaço de Malte)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	TEOR DE UMIDADE DO SBG	23
3.2	CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIOS DE CULTURA	23
3.3	CORRIDA MICELIAL	23
3.4	DESENVOLVIMENTO DE BASIDIOMAS	24
3.4.1	Preparo do inóculo (<i>Spawn</i>)	24
3.4.2	Preparo do substrato e inoculação	24
3.4.2	Colheita e análises	25
4	RESULTADOS	26
4.1	TEOR DE UMIDADE DO SBG	26
4.2	CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIOS DE CULTURA	27
4.2.1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	28
4.2.2	<i>Pleurotus djamor</i>	29
4.2.3	<i>Pleurotus eryngii</i>	29
4.3	CORRIDA MICELIAL	29
4.4	DESENVOLVIMENTO DE BASIDIOMAS	30
5	DISCUSSÃO	33
5.1	CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIOS DE CULTURA	34
5.2	CORRIDA MICELIAL E EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE <i>Pleurotus djamor</i>	35
6	CONCLUSÃO	36
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE – Quadro comparativo dos aspectos físicos e tempo de colonização de <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>P. djamor</i> e <i>P. eryngii</i> em meios de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), BAA (Batata-Açúcar-Ágar) e SBG (Bagaço de malte-Ágar).....	42

1 INTRODUÇÃO

Em 2016, a produção de cerveja no Brasil alcançou a marca de 14,1 bilhões de litros/ano, colocando o país como o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos da América e da China (Cervbrasil, 2016). O número de cervejarias tem aumentado em todo o país, com mais de 1200 empreendimentos registrados em 2019. A região Sul destaca-se com o maior número de cervejarias – 515 estabelecimentos – o que corresponde a 42,5% do total (Marcusso & Muller, 2020).

O bagaço de malte (SBG – *Spent Beer Grains*) é o principal resíduo das cervejarias: corresponde a 85% do material sólido descartado. O resíduo é originado no início do processo de produção de cervejas, quando ocorre a filtração do mosto (cevada germinada e moída misturada com água) precedendo a fervura (Reinold, 1997). A composição química do SBG varia, porém o resíduo pode ser considerado, de forma geral, um material lignocelulósico rico em proteínas e fibras, que correspondem a cerca de 20 e 70% de sua composição, respectivamente (Mussatto, Dragone & Roberto, 2006).

Estima-se que, para cada 100 litros de cerveja, cerca de 20kg de SBG sejam produzidos (Reinold, 1997). Gerado em larga escala durante todo o ano, é um material disponível gratuitamente ou com baixo custo (Mussatto, Dragone & Roberto, 2006). Considerando que o volume médio anual de produção de cerveja no Brasil entre 2006 e 2016 foi de 12,8 bilhões de litros (Marcusso & Muller, 2017), cerca de 2,5 milhões de toneladas de SBG foram produzidos anualmente nesse período.

Cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. (popularmente conhecidos como cogumelos ostra) são mundialmente cultivados com objetivos comerciais, e correspondem a cerca de 19% da produção total de cogumelos (Royse, Baars & Tan, 2017). Devido à capacidade de síntese de enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) e oxidativas (ligninolíticas), muitas espécies desse gênero apresentam excelentes taxas de crescimento e produção de basidiomas em resíduos lignocelulósicos diversos (Mikiashvili et al., 2006).

Nobles (1948), buscando uma maneira de identificar espécies de fungos decompositores de madeira através do micélio somático, avaliou características macro e microscópicas do crescimento micelial de 126 espécies. O protocolo desenvolvido, apesar de não possibilitar a identificação de espécies, é uma excelente ferramenta para conhecer e comparar as particularidades do crescimento micelial (em laboratório) de diferentes espécies/variedades em meios de cultura. Características como velocidade e vigor de colonização, coloração e resistência a contaminações podem auxiliar na escolha de espécies/variedades e meios de

cultura adequados para produção comercial de fungos comestíveis, medicinais e com potencial biotecnológico.

Wang, Sakoda & Suzuki (2001) avaliaram o uso de SBG como substrato para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. atingindo resultados promissores. O resíduo lignocelulósico foi considerado adequado para o cultivo de cogumelos não apenas devido ao seu alto conteúdo de proteínas e fibras, mas também por causa de suas propriedades físicas, como tamanho de partículas, peso em volume, porosidade e capacidade de retenção de água. Gregori et al. (2008) confirmaram que o SBG pode ser utilizado para o cultivo de *P. ostreatus*, ainda que quantidades significativas de basidiomas tenham sido produzidas somente quando baixas proporções do resíduo foram utilizadas nas preparações de substrato. Os resultados foram, de certa forma, contrastantes com o do trabalho anterior, visto que não foi possível cultivar cogumelos em substratos contendo mais que 20% de SBG. Apesar disso, o micélio apresentou crescimento rápido e consistente em todas as formulações de substrato, indicando que o substrato miceliado pode ser utilizado com outros fins, como em projetos de micorremediação e para alimentação animal.

Relativamente poucos estudos foram desenvolvidos até o momento avaliando o uso de SBG como substrato para cultivo de cogumelos e produção de micélio. No que diz respeito às espécies do gênero *Pleurotus*, os trabalhos disponíveis na literatura científica em geral foram baseados na espécie-modelo *P. ostreatus* (Wang, Sakoda & Suzuki, 2001; Gregori et al., 2008; Rugolo et al., 2020) ou em *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. (Lara, Arias & Villaseñor, 2002) e *P. albidus* (Berk.) Pegler (Stoffel et al., 2019). As conclusões diferentes e até contrastantes que os estudos anteriores obtiveram evidenciam uma necessidade de realização de mais testes. Além disso, outras espécies de cogumelos comercialmente relevantes, como *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn e *P. eryngii* (DC.) Quél., ainda não foram avaliadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Descrever e comparar o crescimento de *Pleurotus* spp. em diferentes meios de cultura;
- Avaliar o desempenho do bagaço de malte (SBG) como meio de cultura e componente de substrato para o cultivo de *Pleurotus djamor*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o SBG como fonte de nutrientes para o cultivo micelial de *Pleurotus djamor*, *P. eryngii* e *P. ostreatus*, comparando o crescimento com meios de cultura à base de amido e açúcares (meio ágar batata caseiro e comercial);
- Avaliar a corrida micelial de uma cepa de *Pleurotus djamor* em formulações de substrato com diferentes proporções de SBG;
- Determinar a taxa de conversão de biomassa de substrato em basidiomas (Eficiência Biológica – EB) de *P. djamor* em formulações de substratos com diferentes proporções de SBG.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O bagaço de malte foi doado pela Cervejaria Refúgio, localizada em Florianópolis-SC, e armazenado em sacos plásticos por cerca de 6h para que o excesso de água escoasse para o fundo. Os sacos foram transportados até o Laboratório de Micologia (MICOLAB-UFSC), onde os experimentos foram conduzidos. Amostras da superfície e do fundo dos sacos foram coletadas para avaliação do teor inicial de umidade. O restante do resíduo foi desidratado em estufa a 75°C por 18h.

Todos os procedimentos de repique e inoculação foram realizados em sala desinfetada, em câmara de fluxo laminar, utilizando o calor seco de uma lamparina e álcool 70° INPM para assepsia dos equipamentos. As culturas utilizadas no experimento foram isoladas a partir de basidiomas provindos de variedades comerciais cultivadas em Frei Rogério-SC (*Pleurotus ostreatus* AFJ29 e *P. eryngii* AFJ31) e Florianópolis-SC (*P. djamor* AFJ24). Vouchers das três espécies foram depositados no Fungário FLOR e as culturas mantidas na coleção do Laboratório de Micologia - UFSC. As condições abióticas para as etapas de corrida micelial e cultivo de basidiomas de *P. djamor* foram estabelecidas de acordo com Stamets, 1993.

3.1 TEOR DE UMIDADE DO SBG

Depois do período de descanso de 6 horas para o escoamento da água, 3 amostras de SBG do fundo do saco e 3 amostras da superfície foram coletadas, com 10g cada. O teor de umidade do material foi calculado a partir da variação da massa de cada amostra antes e depois da desidratação a 75°C por 36h.

3.2 CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIOS DE CULTURA

O crescimento micelial em placas de Petri foi avaliado considerando a velocidade de crescimento, presença de contaminações, aspecto da zona de avanço, cor e textura do micélio (adaptado de Nobles, 1948). Três diferentes meios de cultura foram comparados: Batata-Açúcar-Ágar (BAA), como descrito por Bononi et al., 1995; Batata-Dextrose-Ágar (BDA) da marca Merck™ & SBG-Ágar com 4g de SBG desidratado por placa (SBG). As placas e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20min. Após verter e esfriar o meio, as placas foram inoculadas e acondicionadas em câmara do tipo BOD a 23±3°C.

Os aspectos físicos foram visualmente determinados e o diâmetro do micélio foi medido diariamente em duas dimensões separadas por um ângulo de 90°, a partir das quais obteve-se uma média. O inóculo foi posicionado no centro da placa, de forma que a colonização foi considerada finalizada quando o micélio atingiu o diâmetro de 9cm, alcançando as bordas da placa em todas as direções. Para a análise de coloração, foi utilizado o *Online Auction Color Chart* (Kramer, 2004). Cada tratamento foi feito em 5 réplicas e uma média dos resultados foi obtida para análises. O experimento teve duração de 20 dias.

3.3 CORRIDA MICELIAL

Seis diferentes formulações de substratos (Tabela 1), todas com 65% de umidade e contendo proporções variáveis de SBG e serragem de *Eucalyptus* sp., 20% farelo de trigo e 2% CaCO₃ foram usadas para preencher tubos de borossilicato (150mm compr. × 21,6mm diâmetro) com aberturas em ambas as extremidades para analisar a corrida micelial. Cada formulação foi feita em triplicata. A densidade de empacotamento foi mantida a 60g/100ml e ambas as aberturas foram fechadas com tampões de algodão e gaze (Figura 1a). Os tubos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 60min. Os substratos foram inoculados, em uma das faces, por um fragmento micelial com o mesmo diâmetro do tubo, previamente cultivado em meio BDA por 7 dias.

Tabela 1. Composição dos substratos utilizados para o cultivo de basidiomas e corrida micelial de *Pleurotus djamor*.

	Bagaço de Malte (%)	Serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. (%)	Farelo de Trigo (%)	CaCO ₃ (%)
1	0	78	20	2
2	15	63	20	2
3	30	48	20	2
4	45	33	20	2
5	60	18	20	2
6	75	3	20	2

Fonte: Elaborada pelo autor

Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $85\pm 5\%$ de umidade relativa, com troca de ar 3 vezes ao dia. A distância entre o ponto de inoculação e o ápice do micélio foi diariamente mensurada (Figura 1b-d) por 17 dias, até que o micélio em todos os tubos atingisse a marca de 8cm de comprimento.

3.4 DESENVOLVIMENTO DE BASIDIOMAS

3.4.1 Preparo do inóculo (*Spawn*)

Grãos de trigo foram deixados de molho por 12h, cozidos por 10 min e peneirados para retirar o excesso de água. Dezoito potes de vidro de 15mL com tampas de polipropileno (PP) foram preenchidos com 5g de grãos de trigo e esterilizados a 121°C por 30min. Os potes foram inoculados com micélio de *Pleurotus djamor* previamente cultivado em meio BDA. A colonização se deu em câmara de cultivo do tipo BOD a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por cerca de 10 dias, até que os grãos estivessem completamente colonizados (Figura 2a).



Figura 1. Corrida micelial de *Pleurotus djamor* em substratos com diferentes proporções de bagaço de malte. a) Substratos posicionados em tubos de borossilicato com tampões de algodão em ambas as extremidades; b) Substratos inoculados, ao terceiro dia de colonização; c) Substratos ao oitavo dia de colonização; d) Substratos ao décimo-quarto dia de colonização.

3.4.2 Preparo do substrato e inoculação

Potes de vidro de 120ml (Figura 2b) foram preenchidos com os substratos descritos na tabela 1 em uma densidade de empacotamento de 60g de substrato por 100ml de volume e fechados com tampas de metal perfuradas (furos de 5mm preenchidos com estofamento sintético), cada um em três réplicas. Os recipientes foram autoclavados a 121°C por 120 min. Após resfriar, os substratos foram inoculados com cerca de 10% do seu peso de inóculo (*spawn*) de *Pleurotus djamor*, preenchendo sulcos feitos na parte central do substrato (Figura 2c). Durante a colonização, os potes foram mantidos fechados em câmara de cultivo do tipo BOD a 25±2°C.

3.4.3 Colheita e análises

Assim que o substrato foi completamente colonizado, cerca de 10 dias após inoculação (Figura 2e), os potes foram abertos e transferidos para uma câmara de incubação a 24±2°C e 85±5% de umidade relativa, com troca de ar 3 vezes ao dia. Após crescimento dos basidiomas e antes da inversão das bordas do píleo (Figura 2d), os cogumelos foram colhidos e a massa fresca foi determinada.

A eficiência biológica (EB) de cada réplica foi calculada dividindo a massa de basidiomas frescos pela massa inicial de substrato seco, multiplicados por 100 (Chang, Lau & Cho, 1981; Gregori et al., 2008). Em seguida, para testar se houve influência do substrato na EB, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada e os resultados foram apresentados na forma de *boxplot*. A medida de tendência escolhida para representar os resultados foi a mediana dos resultados, porque essa medida não dá tanto peso a valores discrepantes, auxiliando no entendimento de tendências centrais. Todas as análises estatísticas e gráficos foram elaborados utilizando a plataforma R (R Core Team, 2016) e o programa Illustrator CC (Adobe Inc, 2016).

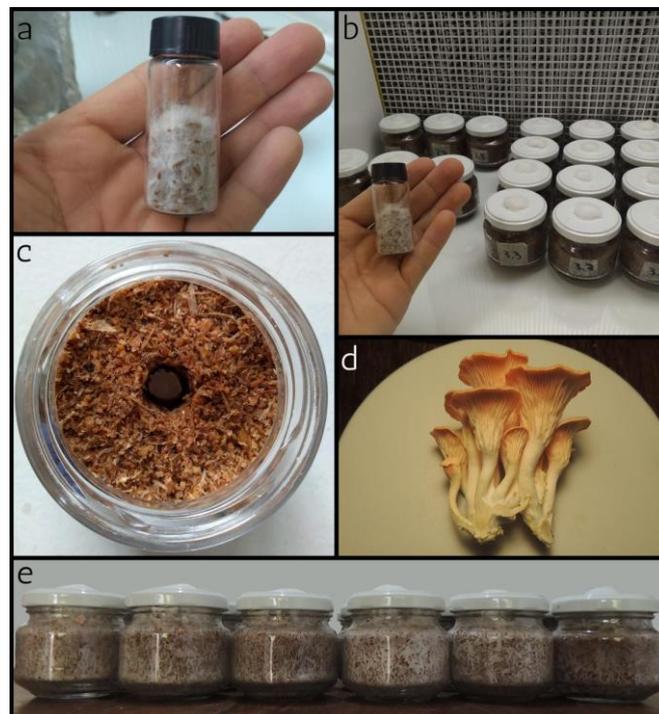


Figura 2. Preparo de substrato e colheita. a) Inóculo (*spawn*) colonizado com micélio de *Pleurotus djamor*; b) Inóculo e recipientes de cultivo em câmara de fluxo laminar; c) Sulco central nos recipientes de cultivo para inoculação; d) Basidiomas recém-colhidos, antes da inversão das bordas do píleo; e) Recipientes de cultivo colonizados com micélio de *P. djamor*.

4 RESULTADOS

4.1 TEOR DE UMIDADE DO SBG

Dentre as amostras testadas, aquelas coletadas do fundo do recipiente de transporte apresentaram o maior teor de umidade, variando entre 78% e 79,4%. As amostras de superfície apresentaram menor teor de água, entre 72,8% e 72,9% (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de umidade de amostras de bagaço de malte (SBG - *Spent Beer Grains*) recém-coletadas.

Amostras		Teor de umidade (%)	Média (%)
Fundo	1	79,4	78,66
	2	78,0	
	3	78,6	
Superfície	1	72,9	72,83
	2	72,8	
	3	72,8	

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIOS DE CULTURA

Dentre todas as placas de Petri preparadas e inoculadas (45, no total), apenas 1 apresentou contaminação e não foi considerada nas análises (*Pleurotus djamor* em meio Batata-Açúcar-Ágar). De forma geral, as características “aspecto da zona de avanço” e “textura do micélio” mantiveram-se indistintas entre os três tratamentos para todas as espécies; *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* e *P. eryngii* apresentaram zona de avanço uniforme e adpressa, bem como foram caracterizados por uma textura algodonosa do micélio em placas com crescimento inicial. Ainda assim, a diferença na textura gradualmente tornou-se evidente conforme o meio foi colonizado: o micélio tendeu a colapsar em todas as espécies, tornando-se feltro-lanoso em *P. ostreatus*, flocoso em *P. djamor* e feltro-lanoso com aspecto pulverulento em *P. eryngii*.

Os aspectos “velocidade de crescimento”, “cor” e outras anotações individuais estão apresentados de forma comparativa entre os três meios de cultura distintos para cada espécie. Observações detalhadas do crescimento micelial podem ser encontradas no apêndice. A Figura 3 apresenta o tempo despendido (em dias) para colonização completa do meio de cultura (r = 45mm) em cada tratamento nas três espécies avaliadas.

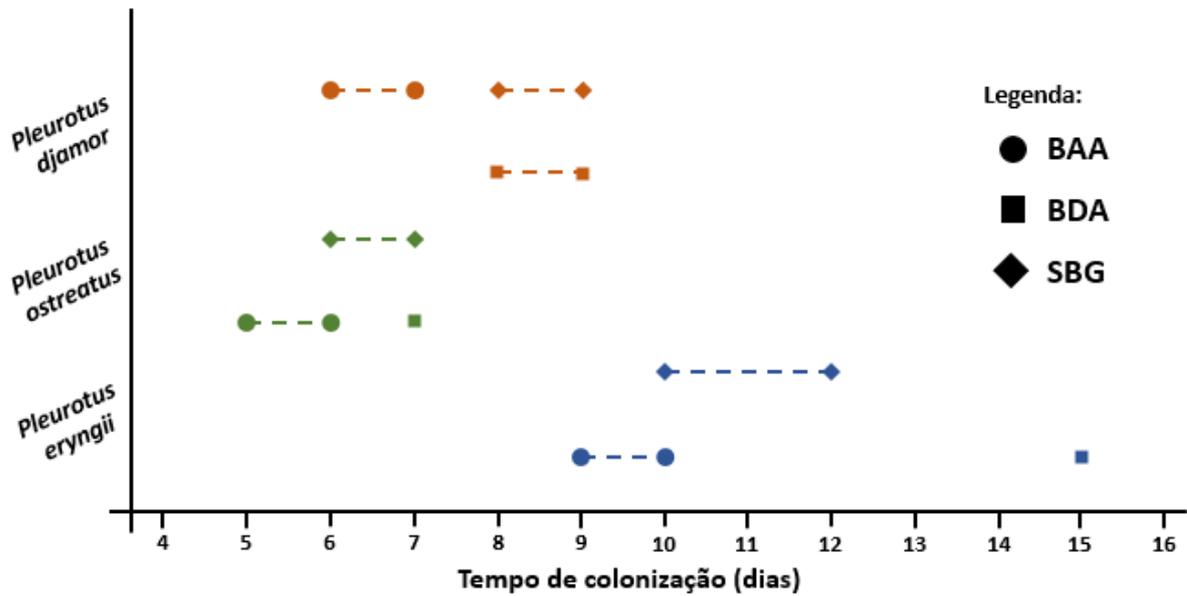


Figura 3. Tempo para colonização total dos meios de cultura por *Pleurotus djamor*, *P. ostreatus* e *P. eryngii*. Símbolos representam o tratamento: Círculo - Batata-Açúcar-Ágar (BAA); Quadrado - Batata-Dextrose-Ágar (BDA); Losango - Bagaço de Malte-Ágar (SBG).

4.2.1 *Pleurotus ostreatus*

De forma geral, *P. ostreatus* apresentou o crescimento mais rápido dentre as três espécies, com todas as placas completamente colonizadas entre 5 e 7 dias, em todos os meios. A colonização mais rápida aconteceu no meio BAA, atingindo os 9cm diâm. entre 5 e 6 dias, com micélio delgado e bastante aderido ao meio de cultura. Nos meios BDA e SBG o micélio organizou-se em tufo levemente erguidos, formando linhas concêntricas e dando aspecto zoneado às culturas (Figura 4a).

Em todos os meios, a coloração do micélio foi inicialmente branca (OAC909) e alterou-se com o crescimento, em alguns casos apresentando gotículas de exsudato. As cores variaram entre amarelado (OAC852), salmão (OAC633) e alaranjado (OAC790), e em todas as placas o meio de cultura apresentou alteração da cor conforme a cor do micélio quando observado pelo verso da placa. As placas do meio BAA apresentaram pontos e linhas negras no meio de cultura (Figura 4b).

4.2.2 *Pleurotus djamor*

Para *P. djamor*, a colonização total da placa levou de 6 a 9 dias, sendo a mais rápida no meio BAA. Neste meio o micélio se desenvolveu com aparência notavelmente delgada e retilínea, mantendo-se aderido ao meio de cultura. Somente ao atingir as bordas das placas começou a ganhar volume e erguer-se. Nos meios BDA e SBG, pelo contrário, o micélio cresceu de forma constante e consistente, apresentando tufos erguidos e aspecto zoneado muito bem demarcado. Em BDA o micélio colapsou após algum tempo, e em SBG se mostrou especialmente denso e consistente.

A coloração do micélio iniciou branca (OAC909), passando por tons amarelados (OAC004) e/ou alaranjados (OAC611 e OAC852) em todos os meios, tendendo a estabelecer-se com a cor rosada (OAC618), exceto no meio BDA. Em todos os meios, ao menos uma das réplicas apresentou aparecimento de primórdios nas margens das placas (Figura 4c).

4.2.3 *Pleurotus eryngii*

Para *P. eryngii*, a coloração do micélio não se alterou em nenhum dos meios de cultura, permanecendo branca (OAC909) do início ao fim. O tempo de colonização variou entre 9 e 15 dias, sendo que o melhor desempenho foi atingido em meio BAA.

Dentre as três espécies analisadas, *P. eryngii* foi a que menos apresentou variação em características físicas durante o crescimento nos três meios de cultura distintos. De forma geral, apresentou textura algodonosa no início e posteriormente colapsada, com aspecto pulverulento. Em todos os meios o micélio alcançou alta densidade, com hifas entrelaçadas e tufos em alguns pontos, porém em meio SBG o micélio pareceu mais vigoroso, formando cordões hifais distintos (Figura 4d).

4.3 CORRIDA MICELIAL

Ao 17º dia de acompanhamento, em todos os tratamentos avaliados, o micélio de *Pleurotus djamor* ultrapassou a marca de 8cm de comprimento. Os primeiros a atingir a marca foram os tratamentos 2 (15% SBG) e 3 (30% SBG), seguidos pelos tratamentos 1 (0% - Controle), 4 (45%), 5 (60%) e 6 (75%), respectivamente. A Figura 5 apresenta a média de crescimento micelial a cada dia nos diferentes substratos avaliados.

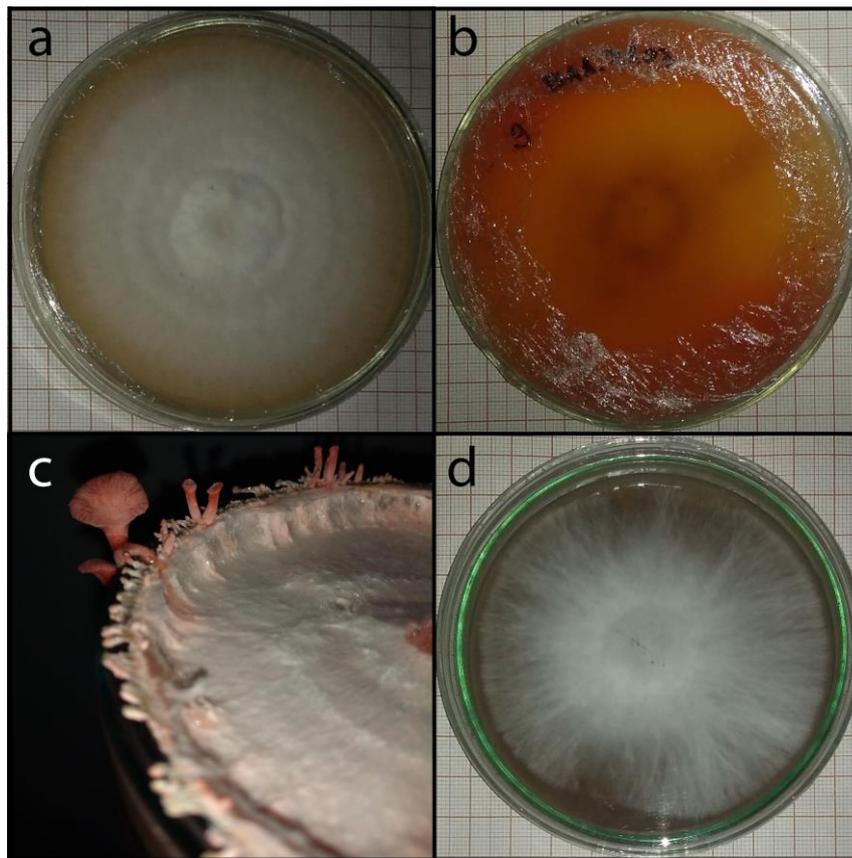


Figura 4. Crescimento micelial em placas de Petri. a) Micélio zoneado de *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), 8 dias após inoculação; b) Meio de cultura com coloração alterada, pontos e linhas negros. *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura Batata-Açúcar-Ágar (BAA), 20 dias após inoculação; c) Basidiomas de *P. djamor* crescendo na lateral da placa, meio de cultura BDA, 23 dias após inoculação; d) Micélio de *P. eryngii* em meio de cultura Bagaço de Malte-Ágar (SBG), 10 dias após inoculação.

4.4 DESENVOLVIMENTO DE BASIDIOMAS

Na etapa de desenvolvimento de basidiomas e avaliação da eficiência biológica dos substratos foi necessário um período e processos de adaptação da técnica para reduzir eventuais contaminações do substrato. Na primeira tentativa (dados não mostrados), o substrato foi autoclavado por 60min e inoculado por um fragmento micelial de 1cm de diâmetro previamente cultivado em meio BDA. Todos os substratos contaminaram. Na segunda tentativa, cujos resultados são considerados para esse trabalho, o tempo de esterilização do substrato foi ampliado para 120min e a inoculação ocorreu com *spawn* de trigo, conforme descrito nos materiais e métodos. Ainda assim, uma das réplicas dos substratos 2 (15% SBG), 3 (30% SBG), 5 (60% SBG) e 6 (75% SBG) apresentou crescimento de fungos de coloração esverdeada (possivelmente gênero *Trichoderma*) durante a incubação e precisou ser descartada. Essas amostras foram desconsideradas nas análises.

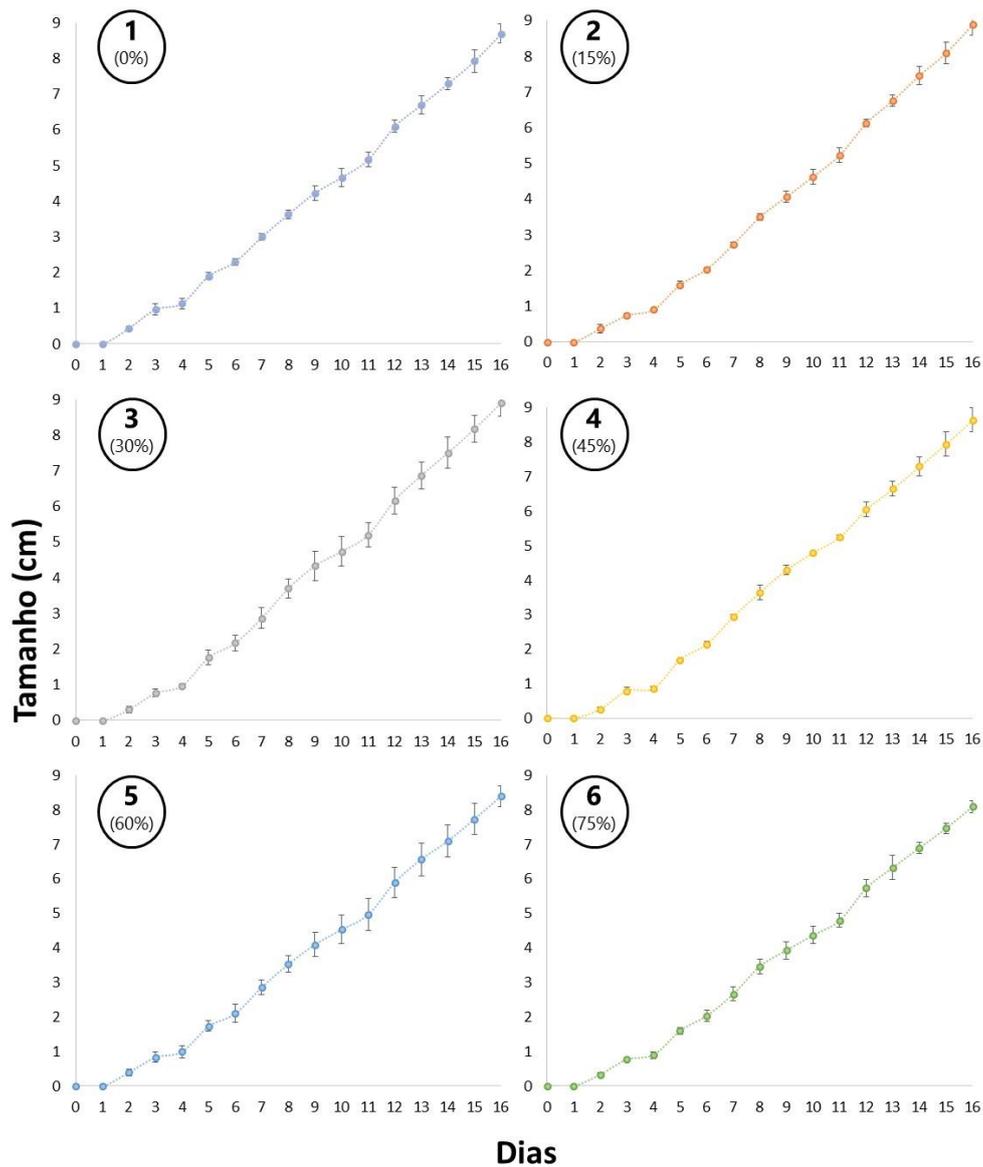


Figura 5. Crescimento micelial de *Pleurotus djamor* em diferentes formulações de substrato. Os números 1-6 indicam os tratamentos descritas na Tabela 1, destacando o percentual de bagaço de malte presente em cada um. O tamanho do micélio apresentado é a média com desvio-padrão das triplicatas para cada tratamento.

A mediana da eficiência biológica (EB) em todos os tratamentos avaliados variou entre 26% no substrato contendo 15% de bagaço de malte (tratamento 2) e 55% naquele contendo 45% (tratamento 4). Observou-se uma tendência à obtenção de melhores índices de EB nos tratamentos contendo proporções intermediárias de bagaço de malte (Figura 6), apesar de análises de variância (ANOVA) demonstrarem que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

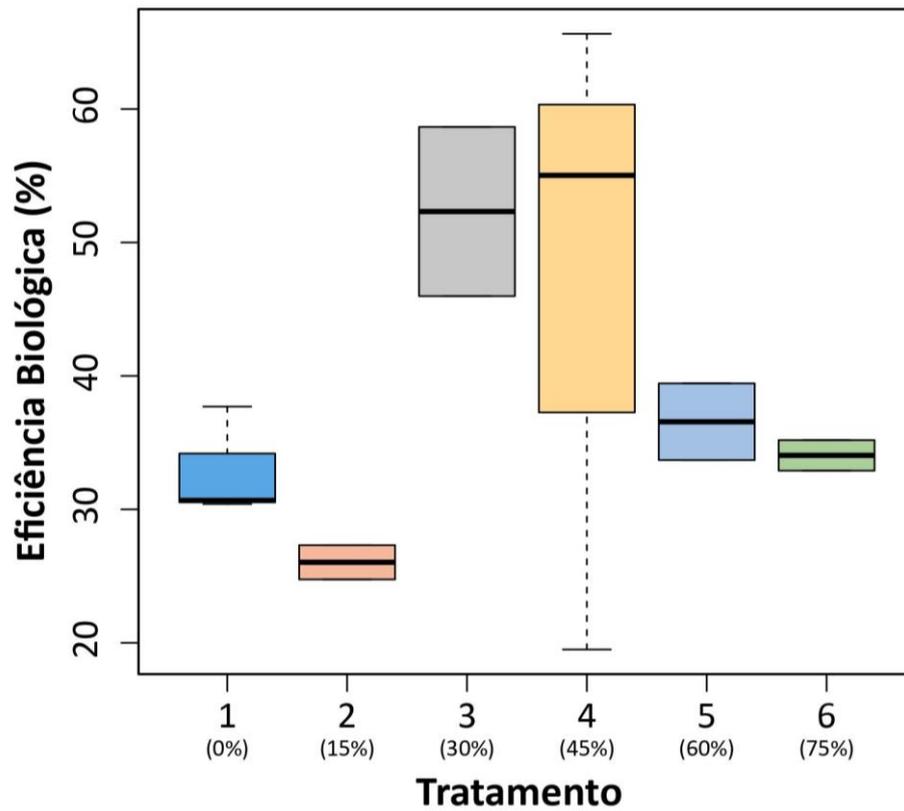


Figura 6. *Boxplot* apresentando a Eficiência Biológica (EB) de *Pleurotus djamor* em diferentes tratamentos. Os substratos 1-6 são os descritos na Tabela 1. Em destaque, as diferentes proporções (%) de bagaço de malte em cada tratamento.

De forma comparativa, a Figura 7 apresenta a mediana da eficiência biológica observada em cada tratamento e o crescimento micelial máximo, ou seja, a colonização atingida pelo micélio de *P. djamor* no experimento de avaliação da corrida micelial ao 17º dia de crescimento. Nos tratamentos com maior quantidade de SBG em relação à serragem, apesar da colonização ter ocorrido mais lentamente, a densidade e vigor do micélio visualmente estimados foi maior.

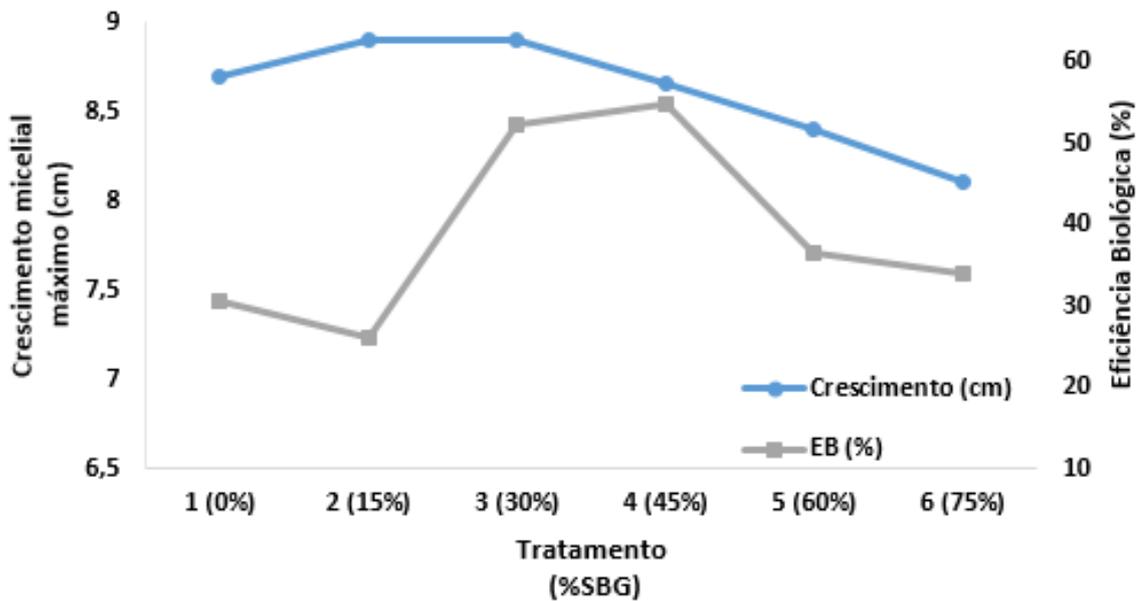


Figura 7. Eficiência Biológica (EB) e Crescimento Micelial Máximo aos 17 dias de *Pleurotus djamor* em substratos contendo diferentes proporções de Bagaço de Malte (SBG - Em destaque). Os tratamentos são os descritos na Tabela 1.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo demonstramos a viabilidade do cultivo de *Pleurotus djamor* em substratos à base do principal resíduo de cervejarias, o bagaço de malte, desde a etapa de expansão de culturas miceliais em placas de petri até o crescimento consistente de micélio e basidiomas em substratos completos. Foram apresentadas comparações e descrições de diversos parâmetros do crescimento micelial de *Pleurotus djamor*, *P. eryngii* e *P. ostreatus* em um meio de cultura largamente utilizado (BDA), outro comumente utilizado em cultivos caseiros/artesanais (BAA) e em um meio de cultura mais barato e de simples preparo à base de bagaço de malte (SBG).

Sendo o bagaço de malte um recurso subutilizado e disponível a um baixo custo durante todo o ano (Mussatto, Dragone & Roberto, 2006), empregá-lo como substrato é uma alternativa capaz de reduzir o desperdício e baratear os custos com o cultivo de cogumelos, atividade que tem crescido no Brasil nos últimos anos (São Paulo, 2019).

5.1 CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIOS DE CULTURA

Meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) são largamente utilizados para o cultivo micelial de diferentes espécies de fungos por serem pouco seletivos (Himedia Laboratories, 2019; Neogen, 2020). Apesar disso, podem ser inacessíveis para cultivadores iniciantes, que muitas vezes dispõem de recursos financeiros limitados. O bagaço de malte, por outro lado, é uma rica fonte de nutrientes com potencial para uso em diversos setores da economia, mas que ainda é muitas vezes visto como um problema para as cervejarias, as quais precisam dar uma destinação adequada ao abundante resíduo (Bolwig et al., 2019). A possibilidade de utilizar esse recurso para o cultivo de cogumelos desde a etapa de crescimento micelial proporciona uma redução de custos com insumos e potencializa a utilização de um material subexplorado.

Descrições detalhadas de características de crescimento micelial em diferentes meios de cultura disponibilizam a produtores de fungos, micólogos e pesquisadores informações valiosas sobre o ciclo de vida e parâmetros de cultivo das espécies (Atri, Sharma & Gulati, 2012). O gênero *Pleurotus* é o segundo mais cultivado em todo o mundo (Royse, Baars & Tan, 2017) e possivelmente o mais versátil. Diferentes espécies são largamente exploradas ou apresentam potencial para uso alimentar, medicinal e biotecnológico (Cerimi et al., 2019; Gregori, Svagelj & Pohleven, 2007; Golak-Siwulska et al., 2018; Sekan et al., 2019). O meio de cultura utilizado para crescimento micelial impacta diretamente na morfologia e fisiologia do fungo (Sekan et al., 2019), e conhecer as características de crescimento permite avaliar e adequar o cultivo para os mais variados fins.

Meios de cultura que promovem um crescimento micelial acelerado, como Batata-Açúcar-Ágar, podem ser utilizados quando se busca obter rápida colonização do meio, visando a subsequente produção de *spawn*, por exemplo. A consistência e densidade micelial observada para as espécies de *Pleurotus* cultivadas em meio de cultura à base de SBG, por outro lado viabilizam a utilização desse resíduo com fins biotecnológicos e alimentares diversos. Stoffel et al., 2019 avaliaram o conteúdo nutricional de farinhas produzidas a partir do micélio de *Pleurotus albidus* cultivado em substratos à base de SBG, ao que foi observado aumento significativo da qualidade nutricional do resíduo, indicando potencial uso alimentício do próprio micélio. Ainda, diversas patentes concedidas nos últimos anos tem demonstrado um crescente interesse em se utilizar micélio fúngico para a produção de biomateriais (Cerimi et al., 2019), cujas características mecânicas, químicas, morfológicas e hidrodinâmicas são determinadas de acordo com o substrato utilizado (Haneef et al., 2017), o que indica o potencial de uso de diferentes substratos em projetos com objetivos distintos.

Pleurotus eryngii, dentre todas as espécies avaliadas, apresentou o crescimento micelial mais lento em todos os meios de cultura. Notavelmente, o crescimento em meio BDA ocorreu em 15 dias após a inoculação, o que parece demonstrar menor eficiência do fungo em utilizar os recursos nesse meio de cultura. Resultado similar foi encontrado por ZAGREAN et al., 2016, em um estudo que demonstrou que a velocidade de crescimento de *P. eryngii* foi consideravelmente menor em meio Batata-Dextrose-Ágar do que em meio Extrato de Malte-Ágar.

5.2 CORRIDA MICELIAL E EFICIÊNCIA BIOLÓGICA DE *Pleurotus djamor*.

A eficiência biológica (EB) é uma medida que descreve a taxa de conversão de substrato em basidiomas, ou seja, o quanto uma espécie ou cepa é capaz de aproveitar os recursos disponíveis e transformá-los em massa de estruturas reprodutivas (Chang, Lau & Cho, 1981; Wang, Sakoda & Suzuki, 2001). A corrida micelial representa a velocidade com que o micélio é capaz de colonizar o substrato, e está relacionada tanto a fatores físico-químicos da formulação utilizada quanto com variações de expressão enzimática entre as espécies e condições ambientais (Assan & Mpofo, 2014; Stamets, 1993; Zervakis et al., 2001).

De forma geral, a corrida micelial apresentou melhores resultados em substratos com menores quantidades de bagaço de malte, atingindo crescimento máximo de 8,9 cm ao 17º dia nos substratos com 15 e 30% do resíduo, e somente 8,1cm em substratos com 60% SBG. O percentual de bagaço de malte em relação à serragem na formulação altera características físicas e químicas do substrato, como as proporções entre carbono e nitrogênio, celulose e lignina e a porosidade (Wang, Sakoda & Suzuki, 2001), fatores intimamente ligados com a produção de enzimas e capacidades de crescimento e reprodução dos fungos (Mikiashvili et al., 2006). A tendência de crescimento mais lento (menor crescimento micelial máximo) em substratos com quantidades crescentes de SBG pode estar relacionada à menor porosidade dessas formulações, as quais são notavelmente mais compactas. Apesar disso, a densidade micelial visualmente estimada tendeu a se elevar conforme o aumento da proporção SBG:Serragem, formando cordões hifais em alguns casos, o que parece indicar um uso eficiente dos recursos nutricionais pelo fungo.

Observou-se uma tendência a melhores resultados de Eficiência Biológica em substratos contendo proporções intermediárias de SBG (30 e 45%). Tal tendência também foi observada por Wang, Sakoda & Suzuki, 2001, que relatam um aumento na EB em substratos contendo até 55% SBG e um decréscimo na eficiência de conversão do substrato em massa de basidiomas a

partir de 60% SBG para *P. ostreatus*. Os resultados encontrados por Gregori et al., 2008 e Lara, Arias & Villaseñor, 2002, por outro lado, apontam que menores concentrações de bagaço de malte (até 25%) promoveram maior eficiência biológica em *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*. Essa variação pode ser atribuída às diferenças biológicas inerentes a cada espécie ou cepa avaliada e características físico-químicas do bagaço de malte relacionadas ao processo de produção. Por outro lado, o elevado teor de nitrogênio do bagaço de malte reduz a proporção C/N das formulações e pode dificultar ou inibir o aparecimento de primórdios, resultado que vai ao encontro dos estudos supracitados.

O cultivo de fungos comestíveis pode ser considerado um exemplo de sucesso na reutilização de resíduos agroindustriais diversos (Sekan et al., 2019), porém poucos estudos foram realizados até o momento investigando o potencial do uso de SBG como substrato para o cultivo de espécies de interesse comercial. Além dos estudos já citados envolvendo o cultivo de *Pleurotus* spp., destacam-se os trabalhos recentes de Cooray & Chen, 2018, que avaliaram a fermentação por *Rhizopus microsporus* Tiegh. visando agregar valor nutricional ao substrato e Chimini et al., 2020, que cultivaram basidiomas de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. em bagaço de malte com sucesso.

Apesar do vasto potencial para reaproveitamento, o bagaço de malte apresenta limitações importantes que devem ser consideradas em projetos de cultivo fúngico. Por ser rico em nutrientes e água (até 79,4% em amostras recém-coletadas, conforme demonstrado nesse estudo), logo após o processo de brassagem o material é colonizado por bactérias e fungos e passa a fermentar, atraindo também insetos e roedores (Thomas & Rahman, 2006). Dessa forma, torna-se necessário utilizar rapidamente o resíduo ou aplicar um método de preservação.

O método mais comum de preservação do resíduo é a desidratação, por ser eficiente no controle de microrganismos e reduzir o volume do material, apesar de ter um custo energético alto (Mussatto, Dragone & Roberto, 2006). Conhecendo o teor de umidade do bagaço de malte logo após sua geração, é possível adicionar diretamente os suplementos secos que formam o substrato de cultivo, reduzindo o consumo de água. Após isso, no entanto, é necessário que o substrato passe por um processo de esterilização ou pasteurização severa antes da inoculação do fungo de interesse. Vale ressaltar que o processo térmico deve ser mantido por tempo suficiente para eliminar a maior parte dos microrganismos, e que o processo de inoculação deve ser realizado no ambiente mais limpo possível. O cuidado é necessário para evitar perdas por contaminação.

6 CONCLUSÃO

Meios de cultura “caseiros” à base de SBG ou amido de batatas demonstraram ser eficientes substitutos para o meio comercial batata-dextrose-ágar (BDA). O crescimento micelial foi vigoroso em todos os meios de cultura, sendo a colonização mais rápida em meio batata-açúcar-ágar (BAA) para todas as espécies. As características de crescimento micelial de *Pleurotus djamor*, *P. eryngii* e *P. ostreatus* em meios de cultura distintos permitem avaliar e adequar o cultivo para fins biotecnológicos, comerciais e alimentícios, além de servirem como guias para que cultivadores iniciantes avaliem a qualidade de seus próprios cultivos.

O bagaço de malte (SBG) também se mostrou um componente de substrato viável para o cultivo micelial e de basidiomas de *Pleurotus djamor*. A mais elevada Eficiência Biológica (55,0%) foi atingida no substrato contendo 45% SBG, 33% serragem, 20% farelo de trigo e 2% CaCO₃, e os melhores resultados de crescimento micelial foram encontrados nos substratos com 15 e 30% do bagaço de malte. Os resultados demonstram que é possível aplicar o resíduo como substrato de cultivo em projetos de biorremediação, fabricação de biomateriais e cultivo de basidiomas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de permitir a adequação dos meios de cultura de acordo com o objetivo do cultivo, descrições do crescimento micelial possibilitam maior entendimento do ciclo de vida dos fungos de interesse comercial. Um dos objetivos primordiais em se cultivar o micélio de fungos comestíveis em meios de cultura é ativar o metabolismo e colocá-lo em um estado de vigor para que colonize rapidamente o *spawn* e substrato final (Ukoima et al., 2009). Cultivar o micélio em um meio de cultura com nutrientes similares ao do substrato pode resultar em uma colonização mais rápida, e novos estudos devem ser realizados avaliando essa possibilidade.

Nesse trabalho, as condições abióticas de crescimento micelial e desenvolvimento de basidiomas de *Pleurotus djamor* foram definidas de acordo com o que foi descrito por Stamets, 1993. Os ambientes de cultivo foram adaptados a fim de garantir condições de crescimento o mais próximas do ideal, controlando fatores como umidade, troca de ar e iluminação. Limitações relacionadas ao espaço físico, recursos e tempo disponíveis impossibilitaram que os experimentos fossem realizados com mais réplicas. Novos estudos deverão ser realizados utilizando outros materiais em conjunto com o SBG, como palha de gramíneas, visando adaptar

o cultivo aos materiais disponíveis em cada região e buscando melhores resultados de eficiência biológica.

REFERÊNCIAS

- ADOBE INC. **Illustrator CC 2017**. Versão 21.0.0 (64 bits). San Jose: Adobe, 2016.
- ASSAN, N. & MPOFU, T. The influence of substrate on mushroom productivity. **Scientific Journal of Crop Science**, v. 3, n. 7, p. 86-91, 2014.
- ATRI, N. S.; SHARMA, S. K. & GULATI, A. Study on Mycelial Growth Pattern of Five Wild *Pleurotus* Species from North West India. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 1, p. 12-15, 2012.
- BOLWIG, S.; MARK, M. S.; HAPPEL, M. K.; BREKKE, A. Beyond animal feed? The valorisation of brewers' spent grain. In: KLITKOU, A.; FEVOLDEN, A. M.; CAPASSO, M. (eds.). **From Waste to Value: Valorisation Pathways for Organic Waste Streams in Circular Bioeconomies**. Abingdon: Routledge, 2019. p. 107-126.
- BONONI, V. L.; CAPELARI, C.; MAZIERO, M.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995.
- CERIMI, K.; AKKAYA, K. C.; POHL, C.; SCHMIDT, B.; NEUBAUER, P. Fungi as source for new bio-based materials: a patent review. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17-26, 2019.
- CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário 2016**. São Paulo, 2016. Documento PDF. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf. Acesso em: 01 maio 2019.
- CHANG, S. T.; LAU, O. W. & CHO, K. Y. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 58-62, 1981.
- CHIMINI, A. C.; ABILIO, D. P.; SIQUEIRA, O. A. P. A.; MARTINS, O. G.; ANDRADE, M. C. N. Resíduos da indústria cervejeira na produção de novos substratos para o cultivo do cogumelo *Ganoderma lucidum*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 265-275, 2020.
- COORAY, S. T. & CHEN, W. N. Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 85-94, 2018.
- GREGORI, A.; SVAGELJ, M. & POHLEVEN, J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 238-249, 2007.
- GREGORI, A.; SVAGELJ, M.; PAHOR, B.; BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. **New Biotechnology**, v. 25, n. 2/3, p. 157-161, 2008.
- GOLAK-SIWULSKA, I.; KALUZEWICS, A.; SPIZEWSKI, T.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, K. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). **Folia Horticulturae**, v. 30, n. 2, p. 191-201, 2018.
- HANEEF, M.; CESERACCIU, L.; CANALE, C.; BAYER, I. S.; HEREDIA-GUERRERO, J.; ATHANASSIOU, A. Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- HARARI, Y. N. **Homo Deus**. 1 ed. São Paulo: Companhia das letras, 2016, p. 30.

HIMEDIA LABORATORIES. **Potato Dextrose Agar Technical Data (M096)**. Mumbai, 2019. Disponível em: <http://himedialabs.com/TD/M096.pdf>. Acesso em: 28 set. 2020.

KRAMER, L. A. **The Online Auction Color Chart**. Online Auction Color Chart Company. Stanford University, 2004.

LARA, M.; ARIAS, A. & VILLASEÑOR, L. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* on spent brewer's grain and tequila maguey bagasse. In: Sánchez, J.E.; Huerta G.; Montiel E. (eds). **Mushroom Biology and Mushroom Products: Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products**. Cuernavaca: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2002.

MARCUSSO, E. F. & MULLER, C. V. A Cerveja no Brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/view>. Acesso em: 01 jun. 2019.

MARCUSSO, E. F. & MULLER, C. V. Anuário da cerveja: 2019. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2020. Disponível em: www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2019/view. Acesso em: 02 nov. 2020.

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 999-1002, 2006.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G. & ROBERTO, I. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 1-14, 2006.

NEOGEN. **Technical Specification Sheet Potato Dextrose Agar (NCM0018)**. Lansing, 2020. Documento PDF. Disponível em: https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10006/ncm0018_ts_en-us.pdf. Acesso em: 28 set. 2020.

NOBLES, M. K. Studies in forest pathology: VI. Identification of cultures of wood rotting fungi. **Canadian Journal of Research**, v. 26, n. 3, p. 281-431, 1948.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2006. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 19 maio 2020.

REINOLD, M. R. **Manual prático de cervejaria**. 1. ed. São Paulo: Aden, 1997.

ROYSE, D. J.; BAARS, J. & TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. In: DIEGO, C. Z.; PARDO-GIMENEZ, A. (eds.). **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**. 1. ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2017. p. 5-13.

RUGOLO, M.; LECHNER, B.; MANSILLA, R.; MATA, G.; RAJCHENBERG, M. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* basidiomes production on *Pinus* sawdust and other agricultural and forestry wastes from Patagonia, Argentina. **Maderas - Ciencia y Tecnologia**, v. 22, n. 4, p. 517-526, 2020.

SÃO PAULO (estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Estado de São Paulo é o maior produtor de cogumelos do país**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 04 set. 2019. Disponível em: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/sala-de-imprensa/release/estado-de-sao-paulo-e-o-maior-produtor-de-cogumelos-do-pais/>. Acesso em: 27 set. 2020.

SEKAN, A. S.; MYRONICHEVA, O. S.; KARLSSON, O.; GRYGANSKYI, A. P.; BLUME, Y. Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. **PeerJ**, v. 7, n. 1. p. e6664, 2019.

STAMETS, P. Growth parameters for gourmet and medicinal mushroom species. *In*: STAMETS, P. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. Berkeley: Ten Speed Press, 1993. p. 211-418.

STOFFEL, F.; SANTANA, W. O.; GREGOLLON, J. G. N.; KIST, T. B. L.; FONTANA, R. C.; CAMASSOLA, M. Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 58, n. 1, p. 102227, 2019.

THOMAS, K. R. & RAHMAN, P. K. S. M. Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review. **Aspects of Applied Biology**, v. 80, n. 1, p. 147-153, 2006.

UKOIMA, H. N.; OGBONNAYA, L. O.; ARIKPO, G. E.; IKPE, F. N. Cultural studies of mycelia of *Volvarella volvacea*, *Pleurotus tuber-regium* and *Pleurotus sajor-caju* on different culture media. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 7, p. 1052-1054, 2009.

WANG, D.; SAKODA, A. & SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 293-300, 2001.

ZAGREAN, V.; SBIRCIOG, G.; BUZATU, M-A.; MÂNDRU, I. Effect of nutritive media and pH on mycelial growth of some *Pleurotus eryngii* strains *in vitro*. **Bulletin UASVM Horticulture**, v. 73, n. 2, 2016.

ZERVAKIS, G.; PHILIPPOUSSIS, A.; IOANNIDOU, S.; DIAMANTOPOULOU, P. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. **Folia microbiologica**, v. 46, n. 3, p. 231-234, 2001.

Apêndice – Quadro comparativo dos aspectos físicos e tempo de colonização de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* e *P. eryngii* em meios de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), BAA (Batata-Açúcar-Ágar) e SBG (Bagaço de malte-Ágar).

	<i>Pleurotus ostreatus</i>		<i>Pleurotus djamor</i>		<i>Pleurotus eryngii</i>	
BDA	Colonização	7 dias	Colonização	8 a 9 dias	Colonização	15 dias
	Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, feltro-lanosa. Micélio branco (OAC909) no início, tornando-se amarelado (OAC852) a partir do dia 8. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio levemente erguido, com tufos organizados em zonas concêntricas, produzindo aspecto zoneado. Alteração branda de coloração no meio de cultura.		Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, flocosa. Micélio branco (OAC909) a laranja-rosado (OAC611), passando por amarelado (OAC004) e alaranjado (OAC852) a partir do dia 8. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio levemente erguido, com tufos organizados em zonas concêntricas, produzindo aspecto zoneado e depois colapsando. Alteração de coloração no meio de cultura. Primórdios em 4 placas.		Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, feltro-lanosa, com aspecto pulverulento. Micélio branco (OAC909), delgado nas bordas e muito denso no centro. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio denso, hifas muito entrelaçadas, com pequenos tufos de micélio em alguns locais.	
BAA	Colonização	5 a 6 dias	Colonização	6 a 7 dias	Colonização	9 a 10 dias
	Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, feltro-lanosa. Micélio branco (OAC909) no início, tornando-se alaranjado (OAC790) a partir do dia 5. Zona de avanço uniforme, adpressa. Observou-se alteração de cor no meio de cultura, alguns apresentando linhas e pontos negros próximos ao inóculo.		Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, flocosa. Micélio branco (OAC909) no início, tornando-se rosado (OAC618) a partir do dia 9. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio muito delgado, alongado e adpresso. Alteração de cor do meio de cultura. Primórdios aparecendo em 1 placa.		Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, feltro-lanosa, com aspecto pulverulento. Micélio branco (OAC909), delgado nas bordas e muito denso no centro. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio denso, hifas muito entrelaçadas, com pequenos tufos de micélio em alguns locais.	
SBG	Colonização	6 a 7 dias	Colonização	8 a 9 dias	Colonização	10 a 12 dias
	Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, feltro-lanosa. Micélio branco (OAC909) no início, tornando-se salmão (OAC633) a alaranjado (OAC790) a partir do dia 11. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio levemente erguido, com tufos organizados em zonas concêntricas, produzindo aspecto zoneado. Alteração de cor no meio de cultura.		Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, flocosa. Micélio branco (OAC909) a alaranjado (OAC852) e rosado (OAC618), a partir do dia 11. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio muito denso desde o início e levemente erguido, com tufos organizados em zonas concêntricas, produzindo aspecto zoneado. Aparecimento de primórdios em 1 placa.		Textura algodonsa em crescentes mais jovens, depois colapsada, feltro-lanosa, com aspecto pulverulento. Micélio branco (OAC909), muito vigoroso, mais denso em algumas partes, formando cordões hifais. Zona de avanço uniforme, adpressa. Micélio denso, hifas muito entrelaçadas, com pequenos tufos de micélio em alguns locais.	