

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Avaliação do cultivo de *Lentinula edodes* em substratos  
alternativos a base de gramíneas e resíduos agrícolas.**

**Pedro Afonso Gomes Teixeira**

Engenheiro Agrônomo

**2024**

**Avaliação do cultivo de *Lentinula edodes* em substratos alternativos a base de gramíneas e resíduos agrícolas.**

**Discente: Pedro Afonso Gomes Teixeira**

**Orientador: Prof. Dr. Diego Cunha Zied**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.**

**2024**

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T266a | <p>Teixeira, Pedro Afonso Gomes</p> <p>Avaliação do cultivo de Lentinula edodes em substratos alternativos a base de gramíneas e resíduos agrícolas. : . / Pedro Afonso Gomes Teixeira. -- , 2024</p> <p>57 p. : tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Diego Cunha Zied</p> <p>1. Cogumelos comestíveis. 2. Resíduos de culturas agrícolas. 3. Engenharia agrônômica. I. Título.</p> |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE *Lentinula edodes* EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS A BASE DE GRAMÍNEAS E RESÍDUOS AGRÍCOLAS

**AUTOR: PEDRO AFONSO GOMES TEIXEIRA ORIENTADOR:**  
**DIEGO CUNHA ZIED**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED (Participação Virtual) Departamento de Produção Vegetal / FCAT UNESP Dracena

Documento assinado digitalmente  
 **DIEGO CUNHA ZIED**  
Data: 13/12/2024 10:37:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EUSTÁQUIO SOUZA DIAS (Participação Virtual) Departamento de Microbiologia Agrícola / Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras/MG

Documento assinado digitalmente  
 **EUSTAQUIO SOUZA DIAS**  
Data: 17/12/2024 14:08:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES (Participação Virtual) Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
 **LUCIA MARIA CARARETO ALVES**  
Data: 17/12/2024 11:36:02-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 28 de novembro de 2024

"Um homem se aproximou de Zaratustra e disse: 'Mestre, o que é a sabedoria?' Zaratustra sorriu e respondeu: 'A sabedoria é o entendimento do ritmo da vida. É saber dançar entre as alegrias e as tristezas, entre os risos e as lágrimas. Não se trata apenas de conhecimento, mas de vivência. A verdadeira sabedoria surge quando aprendemos a ouvir nosso próprio coração e a reconhecer que somos parte de um todo maior, onde cada experiência tem seu lugar.'" Assim Falava Zaratustra, Friedrich Nietzsche.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Pedro Afonso Gomes Teixeira, nascido na cidade de São Paulo , no dia 1 de setembro de 1998., conclui o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), no campus de Dracena. Atualmente, mestrando em Microbiologia Agropecuária na UNESP, Jaboticabal, sob a orientação do professor Diego Cunha Zied. Minha pesquisa de mestrado é voltada para o cultivo de cogumelos comestíveis, especificamente o shiitake, explorando a utilização de resíduos agroindustriais como substratos para alternativas no cultivo do mesmo. Durante a graduação, desenvolvi um projeto de pesquisa junto ao professor Diego, que investigou a suplementação de inóculo de *Pleurotus ostreatus* com resíduos de *Agaricus bisporus*, a para um maior entendimento das interações entre diferentes espécies de cogumelos e a utilização de diferentes resíduos da produção. Desde o segundo ano da graduação, participo do Centro de Estudos em Cogumelos (CECOG), tendo o privilégio de experienciar na prática e teoria o contato com diversas espécies de cogumelos, como *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus djamour*, *Agrocybe aegerita*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*. Além disso pude ter a honra de contribuir como coorientador de alunos em atividades do grupo, podendo também participar em eventos de extensão, congressos, minicursos dentre outras atividades enriquecedoras em questão de conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Anaelilda Aparecida Gomes Teixeira, que ainda me dá todo amor e apoio que um filho pode ter. Obrigado por me mostrar o caminho do conhecimento, eu te escolheria mais mil vezes, eu sinto você comigo.

Ao meu Pai, Pedro Tarcísio Alves Teixeira, obrigado por continuar a mostrar o significado de parceria e amizade, amor, agradeço por todo seu amor e respeito, não há muitas palavras que possam descrever.

Ao meu orientador Diego Cunha Zied, por todas oportunidades e paciência, muita paciência, confiança e conhecimento, além de orientador, amigo, uma referência. A cada dia admiro mais e sou mais grato pela oportunidade de fazer ciência com o senhor, obrigado por todo apoio.

Ao meu irmão, Mikhaelo Gomes Teixeira, por me proporcionar enxergar e viver nesse mundo de uma maneira mais colorida. Você é luz cara.

Ao programa de Microbiologia Agropecuária da Unesp de Jaboticabal, que além de me receber e ensinar, deu todas as condições e possibilidades possíveis de desenvolver-me como pesquisador.

A todos os meus professores desde a graduação, o ensino médio e fundamental ao, cursinho, agradeço por todo conhecimento, só estou aqui graças a vocês. “Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” (SAINT-EXUPÉRY 1943).

A todos os funcionários da Unesp, desde os técnicos aos motoristas, todos estão envolvidos na produção da ciência e merecem nosso reconhecimento.

Aos meus familiares que aqui não foram citados, mas sempre me incentivaram.

Ao Wagner Gonçalves Vieira Junior por toda a parceria, ajuda na execução do projeto, além de todas as boas músicas compartilhadas, obrigado pela força.

Ao Lucas Silva Alves, que durante toda a pós graduação forneceu sua ajuda e companhia nas mais diversas etapas trilhadas neste caminho. Obrigado pela companhia.

A Cinthia Elen Cardoso Caitano pela paciência e todo o suporte fornecido na realização do projeto e pela amizade. Obrigado por tudo Cin.

A todos os outros integrantes do CECOG pela ajuda na realização do projeto e pelos bons momentos durante esses anos, sem vocês, nada disso seria possível, tudo isso é fruto do nosso trabalho, me sinto honrado em fazer parte dessa família.

Aos integrantes da República Rã K Saia por serem parte da minha família durante esses anos, garanto que sem vocês esse caminho não seria tão bom de ser trilhado.

Aos integrantes da República Canekão, que mesmo sem me conhecer, me abraçou e me permitiu viver momentos incríveis ao lado de pessoas sensacionais.

Por fim, mas não menos importante, a Gabriela Veloso pela companhia, amor e paciência nesse último ano, sua energia foi essencial para que eu conseguisse concluir. Obrigado por fazer essa jornada mais feliz.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

No Brasil, o cultivo do shiitake (*Lentinula edodes*) vem crescendo significativamente devido à utilização de resíduos agroindustriais, como a serragem, para o preparo do substrato do cogumelo. Considerando o longo tempo necessário para o crescimento de uma árvore até a colheita, o estudo teve como objetivo desenvolver tecnologias para o cultivo de shiitake utilizando gramíneas e resíduos da indústria da cana-de-açúcar, que têm um ciclo significativamente mais curto em comparação com as árvores. Outro aspecto positivo é a redução de custos através de uma possível pasteurização do substrato, o que diminui o nível de investimento tecnológico dos produtores de cogumelos, principalmente no que diz respeito à aquisição de grandes autoclaves, caldeiras e câmaras de fluxo laminar. Assim, o presente estudo foi dividido em 2 experimentos, ambos testando a eficiência da produção de shiitake em substratos à base de *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, bagaço de cana-de-açúcar, serragem de eucalipto, farelo de trigo e calcita, em diferentes concentrações. O substrato foi produzido misturando-se os materiais até a completa homogeneização e, em seguida, umedecido até atingir 70% de umidade. No primeiro cultivo, o substrato foi submetido a 6 dias de fermentação e depois autoclavado a 121°C por 4 horas. No segundo cultivo o substrato foi formulado de maneira idêntica ao primeiro e encaminhado diretamente ao tratamento térmico, não sendo submetido ao período de fermentação, o que o define como o cultivo não fermentado. Ambos os cultivos foram conduzidos a uma temperatura de 19°C e a uma humidade relativa de 85%. Observou-se que a experiência fermentada produziu resultados inferiores em comparação com a não fermentada. A estirpe mostrou pouco efeito na variação dos parâmetros agronômicos. O melhor desempenho foi observado no substrato a base de bagaço e cana, porém com um bom desempenho no substrato a base de *B. brizantha*. A utilização de materiais alternativo, como as palhas de braquiárias e os resíduos da indústria da cana-de-açúcar, como base das formulações demonstraram resultados promissores para a produção do *Lentinula edodes*.

Palavras-Chave: Cogumelos cultivo, Substrato alternativo, Micologia, Microbiologia, Shiitake

## ABSTRACT

In Brazil, the cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*) has been growing significantly due to the use of agro-industrial waste, such as sawdust, to prepare the mushroom substrate. Considering the long time it takes for a tree to grow until it is harvested, the study aimed to develop technologies for growing shiitake using grasses and waste from the sugar cane industry, which have a significantly shorter cycle compared to trees. Another positive aspect is the reduction in costs through possible pasteurization of the substrate, which reduces the level of technological investment by mushroom producers, especially with regard to the acquisition of large autoclaves, boilers and laminar flow chambers. This study was therefore divided into 2 experiments, both testing the efficiency of shiitake production in substrates based on *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, sugar cane bagasse, eucalyptus sawdust, wheat bran and calcite, in different concentrations. The substrate was produced by mixing the materials until they were completely homogenized and then moistened until it reached 70% humidity. In the first experiment, the substrate was subjected to 6 days of fermentation and then autoclaved at 121°C for 4 hours. In the second experiment, the substrate was formulated in the same way as the first and sent directly to the heat treatment, without being subjected to the fermentation period, which defines it as a non-fermented culture. Both cultivations were conducted at a temperature of 19°C and a relative humidity of 85%. It was observed that the fermented experiment produced inferior results compared to the unfermented one. The strain showed little effect on the variation in agronomic parameters. The best performance was observed in the bagasse and sugarcane-based substrate, but with a good performance in the *B. brizantha* based substrate. Brizantha. The use of alternative materials, such as brachiaria straw and waste from the sugar cane industry, as the basis for the formulations showed promising results for the production of *Lentinula edodes*.

Keywords: Mushroom cultivation, Alternative substrate, Mycology, Microbiology, Shiitake

## SUMÁRIO

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                               | 3  |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                    | 4  |
| <i>Lentinula edodes</i> .....                     | 5  |
| <i>Processo de fermentação</i> .....              | 6  |
| <i>Linhagens</i> .....                            | 7  |
| <i>Matéria prima</i> .....                        | 7  |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                      | 8  |
| <i>Produção do substrato fermentado</i> .....     | 9  |
| <i>Produção do substrato não fermentado</i> ..... | 11 |
| <i>Produção de inóculo e inoculação</i> .....     | 13 |
| <i>Incubação e corrida do micélio</i> .....       | 17 |
| <i>Cultivo e colheita</i> .....                   | 18 |
| <i>Parâmetros avaliados</i> .....                 | 21 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                    | 22 |
| <i>Fermentação</i> .....                          | 22 |
| <i>Análise química dos substratos</i> .....       | 25 |
| <i>Parâmetros agronômicos</i> .....               | 27 |
| <i>Análise nutricional dos cogumelos</i> .....    | 28 |
| <i>Cultivo fermentado</i> .....                   | 30 |
| <i>Cultivo não fermentado</i> .....               | 33 |
| <i>Comparação entre os cultivos</i> .....         | 36 |
| <i>Considerações finais</i> .....                 | 40 |
| 5. CONCLUSÃO.....                                 | 41 |
| 6. Referências Bibliográficas .....               | 43 |



## 1. INTRODUÇÃO

O *Lentinula edodes*, conhecido como shiitake, destaca-se como um cogumelo amplamente cultivado a nível mundial, com o seu centro de origem em países como a China, Japão e Coreia do Sul (Chen et al., 2016; Silva et al., 2005), e apresenta benefícios notáveis na sua incorporação na dieta humana. Este fungo distingue-se pela sua natureza nutritiva, carácter comestível e propriedades medicinais. Demonstra a capacidade de fornecer quantidades significativas de proteínas, aminoácidos, fibras e um espectro variado de vitaminas. Além disso, exibe a presença de moléculas medicinais, nomeadamente esteróis e lípidos, que lhe conferem propriedades terapêuticas relevantes (Sawan et al., 2021; Yu et al., 2022).

Tendo em vista a crescente preocupação com a sustentabilidade, a busca por recursos que entrem nesse contexto é muito importante, como exemplo a produção de cogumelos. Um ótimo contexto onde essas produções se encaixam, são os Objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU, que foram formulados para abordar desafios globais, incluindo a fome, a pobreza, a saúde, a educação e a sustentabilidade ambiental (ONU, 2015). Cenário esse, como citado anteriormente onde produção de cogumelos comestíveis pode ser uma estratégia eficaz para enfrentar parte desses desafios. Se levarmos em conta sua capacidade de crescimento utilizando em boa parte recursos sustentáveis, além de seu já destacado valor nutricional, onde cogumelos, como o shiitake (*L. Edodes*), champignon (*Agaricus bisporus*) e o shimeji (*Pleurotus ostreatus*), podem contribuir significativamente para a segurança alimentar (Chang & Miles, 2004). Além desses fungos serem ricos em proteínas, fibras e vitaminas os cogumelos podem ser cultivados em substratos orgânicos, aproveitando resíduos agrícolas e diminuindo a dependência de monoculturas intensivas (Stamets, 2005).

Assim como em outras esferas agrícolas, o cultivo de cogumelos busca incessantemente a implementação de modificações tecnológicas para otimizar o rendimento e os resultados produtivos. No contexto da produção de shiitake, um

dos avanços tecnológicos mais significativos foi a transição do cultivo em toras de madeira para a produção em blocos de serragem (Yu et al., 2022). Este processo demonstrou a capacidade de reduzir o período de cultivo e proporcionar aumentos substanciais nos rendimentos (Royse et al., 2017).

A produção de cogumelos em substrato de serragem representa uma prática sustentável para a utilização de resíduos (Royse et al., 2017). No entanto, a disponibilidade deste substrato pode variar consoante a região de produção. Adicionalmente, as árvores de eucalipto, comumente utilizadas e cultivadas no Brasil, podem levar até seis anos para atingir a maturidade (Kumar et al., 2021), constituindo um recurso com prazos de renovação prolongados. Diante desse cenário, torna-se imperativo explorar alternativas para a produção de cogumelos, especialmente aquelas que envolvem o uso de recursos rapidamente renováveis, como as palhas agrícolas, amplamente disponíveis em várias partes do mundo (Mata e Savoie 2018; Mengqi et al., 2023).

Os estudos utilizando palhas para a produção de shiitake são relativamente recentes e inovadores, tendo sido solidificados devido à significativa viabilidade econômica e ambiental, possibilitando o cultivo destes cogumelos em resíduos não tradicionais na sua produção (Gao et al., 2020). Sabe-se que o cultivo em gramíneas se destaca por utilizar palhas de trigo, arroz e cevada após a colheita dos grãos, ou seja, a palha é enfardada e armazenada, evitando assim a queima (Gaitán-Hernández e Norberto Cortés, 2014). Neste sentido, existe um duplo benefício - a colheita de grãos e a utilização da palha além de gerar um alimento de maneira sustentável a partir de um subproduto, também evita a utilização desse resíduo de maneira não adequada, tendo ainda a possibilidade da utilização do resíduo dessa produção em outras atividades posteriormente. Assim, o objetivo deste estudo é investigar a produção de *L. edodes* em diferentes substratos compostos por palhas agrícolas e resíduos de usinas de cana-de-açúcar.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## **Lentinula edodes**

Como já pontuado anteriormente, os substratos de cultivo são componentes cruciais na produção, influenciando diretamente a produtividade, qualidade, viabilidade e a sustentabilidade do cultivo. Tradicionalmente, o cultivo do shiitake era realizado em troncos de madeira. O cultivo de maneira geral era conduzido em troncos de árvores de crescimento rápido e com alta densidade de nutrientes, como o eucalipto e o pinheiro, no caso das produções brasileiras (Silva 2011; Andrade et al., 2011).

O preparo da madeira envolve não envolve a esterilização da mesma, apenas a seleção dos mourões, o preparo dos mesmos, que é constituído na limpeza dos brotos e folhas ainda persistentes e um período de “descanso” após o corte, onde as toras são depositadas na horizontal ao abrigo do sol por aproximadamente 7 dias. Esse período está diretamente ligado com as condições de umidade do tronco para a inoculação., apenas assepsia dos equipamentos utilizados no processo. Após a esterilização, a madeira é perfurada com auxílios de ferramentas e inoculada com o micélio de shiitake, que é inserido nas perfurações e coberto posteriormente com parafina afim de manter a umidade adequada nos materiais inoculados e de evitar contaminações. (Pascholati., et al 2014).

Embora a técnica tradicional reproduza as condições naturais do shiitake, o que possibilita a obtenção de cogumelos de alta qualidade, ela é consideravelmente mais trabalhosa além de exigir um período mais longo para a frutificação (Santos et al., 2022; Silva & Lima, 2021). Quando analisamos o cultivo do mesmo em serragem, a realidade é distinta, uma vez que quando se utiliza serragem como principal material é realizada a esterilização, pois o substrato é depositado em sacos plásticos contendo 2 kg (peso úmido) (Zied et al., 2016). O cultivo é realizado em pequenos espaços físicos, diferentemente do cultivo tradicional, no entanto o custo de produção é relativamente alto, uma vez que a tecnologia envolvida no processo como a autoclavagem exigem investimentos maiores se comparados ao método tradicional (. Pascholati et al., 2014; Nitta et al., 2016).

## Processo de fermentação

O processo de fermentação é amplamente utilizado na produção de substrato para o cultivo de cogumelos, principalmente para os gêneros *Agaricus* e *Pleurotus* (Suwannarach et al., 2020; Vieira & Pecchia, 2022; Shamugam & Kertesz, 2023). Dentre os objetivos desse processo, temos a estabilização do material orgânico através da ação microbiana sobre o carboidrato, a amônia e outros nutrientes/macromoléculas, promovendo um aumento da temperatura e da comunidade microbiana termofílica (Buth, 2017). Além de uma possível mineralização e disponibilização de nutrientes para o fungo. Estas alterações químicas ocorrem através da sucessão microbiana mesófila e termofílica, as quais produzem enzimas hidrolíticas e oxidativas, tais como: celobiohidrolase, endoglucanase, endoxilanase, endomananases, fenoloxidase e peroxidases (Xu et al., 2020; Suwannarach et al., 2022).

No entanto pouco se sabe sobre o efeito do processo de fermentação na produção de substrato para *L. edodes*. Estudos prévios realizados por nossa equipe, verificaram um resultado positivo de produtividade. Para esse processo em questão foi adotado um período de fermentação de 6 dias. Durante esse período passou por um total de 4 reviradas de seu material. No primeiro e no último dia do processo de o substrato não foi revirado, uma vez que a operação/procedimento do dia oxigenou o composto (a montagem da leira ou a transferência do substrato para o pasteurizador).

Na proposta desenvolvida durante o experimento, após a fermentação ou não, os substratos foram submetidos a pasteurização e/ou esterilização, que influenciou as características biológicas dos substratos e consequentemente os manejos a serem adotados na fase de produção. Um substrato biologicamente seletivo, possui menor índice de contaminação por *Trichoderma* spp., a principal doença no cultivo de shiitake (Carrasco et al., 2016). O mesmo atua como fungo competidor ao contaminar o substrato que seria para o desenvolvimento do fungo inoculado. Sendo assim, o processo de fermentação teve também como intenção otimizar o substrato em questões como essa.

## **Linhagens**

Com a caracterização e padronização dos processos químicos, físicos e biológicos para a produção de substrato, uma etapa muito importante que não poderia ser esquecida, é a utilização de dois organismos testes com alto poder de bioconversão (linhagens genéticas de *L. edodes*), uma vez que a utilização de linhagens sem essas características tornaria o sucesso do cultivo do shitake nessas condições mais complicado. Sabe-se que os fatores que possuem influência na produtividade do shitake é a qualidade da linhagem e do substrato (Atila, 2021). A linhagem deve apresentar um crescimento micelial rápido, a fim de limitar o crescimento de outros fungos competidores, além de proporcionar a formação de cogumelos com características morfológicas adequadas à comercialização (Serna-Díaz et al., 2020).

Atualmente algumas linhagens de *L. edodes* são encontradas no mercado nacional e utilizadas com sucesso por produtores de diversas regiões do Brasil, tendo destaque os Estados de São Paulo e Minas Gerais. No Centro de Estudos em Cogumelos (CECOG), da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP) também existe uma micoteca, a qual possui diversas linhagens que já foram (Processo FAPESP n° 2020/09321-8) e estão sendo caracterizadas (Processo FAPESP n° 2022/10224-2). Neste sentido a averiguação do comportamento agrônomo destas linhagens, em função dos tratamentos submetidos as mesmas, traz consigo informações importantes para o entendimento e melhor aproveitamento da tecnologia proposta pelo experimento.

## **Matéria prima**

Os cogumelos dependem de substratos orgânicos (matéria prima) para se nutrirem, normalmente uma fonte composta por lignina, hemicelulose e celulose, capazes de disponibilizar nutrientes para seu crescimento vegetativo e reprodutivo (Zied et al., 2023). No entanto, nem sempre as matérias primas são

o suficiente para proporcionar um crescimento rápido, isento de contaminação e produtivo. Assim, materiais concentrados, tais como farelos (rico em nitrogênio) e calcários (rico em cálcio) vêm sendo aplicados a formulação do substrato, com intuito de padronizar os processos químicos referentes à produção de substratos (Atila, 2019).

Resumidamente os principais parâmetros químicos a se considerar durante a formulação do substrato são: relação C/N, pH, condutividade elétrica, teor de lignina, hemicelulose e celulose (Nam et al., 2021; Yu et al., 2021; Huang et al., 2022; Suwannarach et al., 2022). Considerando a extensão territorial do Brasil e a disponibilidade de materiais, o Processo FAPESP n° 2020/13230-8, identificou a possibilidade de substituição de parte da serragem de eucalipto usada na formulação do substrato por gramíneas (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*), e também pelo bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*).

No entanto os resultados obtidos sofreram variações, principalmente no que se refere ao tempo de cultivo, o número de fluxos e a produtividade; comparados ao substrato padrão (majoritariamente composto por serragem e com a adição de farelos como o de trigo), submetido ao processo de autoclavagem. As principais justificativas para essas variações foram referentes à idade fisiológica das gramíneas, sendo que, as que já haviam atingido a senescência (*T. aestivum* e *O. sativa*) não necessitavam passar por um período de fermentação e a quantidade de serragem adicionada na formulação foi menor. Já as que não haviam atingido a senescência (*B. brizantha* e *B. decumbens*) precisavam ser fermentadas, para a estabilização do processo e liberação da amônia. Neste caso, as quantidades de serragem incorporada nestes substratos foram maiores, na ordem de 35%, a qual proporcionou também um incremento no teor de lignina do substrato (dados não publicados).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT, Campus de Dracena) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), nas

dependências do Centro de Estudos de Cogumelos (CECOG). Foi dividido em dois experimentos, sendo o primeiro focado na utilização do processo de fermentação antes da esterilização, e o segundo focado na produção de um substrato axênico a partir das mesmas fontes vegetais. É de salientar que foram utilizadas duas linhagens distintas em ambas as experiências.

## Produção do substrato fermentado

Após serem submetidas a um processo de secagem ao sol, os componentes principais, as diferentes palhas, foram trituradas em fragmentos de até 5 mm, em seguida, armazenadas em caixas plásticas ao abrigo do tempo até o momento da produção do substrato, salvo exceção do bagaço que é submetido apenas a um peneiragem para retirada de fragmentos grandes antes de seu armazenamento. Para iniciar a produção do substrato, os materiais foram misturados a seco até ficarem completamente homogêneos e, em seguida, humedecidos para atingir um nível de humidade de 70% (Liu et al., 2023). Os substratos foram produzidos utilizando, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, Bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, palha de arroz, serragem de eucalipto, farelo de trigo e calcita, conforme indicado na Tabela 01.

Tabela 01. Percentagem de materiais para a formulação de substrato para a produção de *Lentinula edodes*.

| Substrato(s)                   | Palha | Bagaço de cana | Serragem | Farelo de trigo | CaCO <sub>3</sub> |
|--------------------------------|-------|----------------|----------|-----------------|-------------------|
|                                |       |                | %        |                 |                   |
| 1. <i>Brachiaria brizantha</i> | 54    | -              | 35       | 10              | 1                 |
| 2. <i>Brachiaria decumbens</i> | 54    | -              | 35       | 10              | 1                 |
| 3. Bagaço de cana              | -     | 49             | 30       | 20              | 1                 |
| 4. Palha de trigo              | 49    | -              | 30       | 20              | 1                 |
| 5. Palha de arroz              | 49    | -              | 30       | 20              | 1                 |

Para a primeira experiência, foi realizado um processo de fermentação de 6 dias. O mesmo foi iniciado ao fim formulação do substrato. Após misturar de forma homogênea, corrigir a umidade dos substratos para 70%, os mesmos foram depositos em caixas plásticas formato de 1,5 m<sup>3</sup> (Figura 1) para a fase de fermentação. A mesma teve duração de 6 dias, sendo que nesse período, foram realizadas reviradas até o quarto dia do processo, essa ocorria uma vez ao dia. Nos dias subsequentes foram apenas realizadas as afeições de temperatura e umidade, além da adição de água nas camadas mais expostas das pilhas a fim de compensar a maior perda de umidade nas regiões em questão. As afeições de temperatura e umidade eram realizadas antes de revirada dos substratos.



*Figura 1. Caixas plásticas utilizadas para fermentação com duas das formulações distintas durante o processo.*

Como apresentado anteriormente o objetivo por trás do processo da fermentação foi estabilizar o substrato do ponto de vista químico, físico e microbiológico. Durante processo, a temperatura e umidade foram aferidas diariamente, tendo a umidade dos substratos corrigidas junto as reviradas, sendo esse processo realizado em todos os substratos utilizados. A fim do 6º dia de fermentação, os diferentes substratos foram ensacados (1,5 kg do substrato por

saco de plástico), prensados com auxílio de uma prensa mecânica, em seguida autoclavados à uma temperatura de 121°C com pressão de 1,1kgf/cm<sup>3</sup> durante 4 horas (Zied et al., 2023).



Figura 2. Blocos dispostos na autoclave para esterilização.

Após o resfriamento, os blocos foram conduzidos ao fluxo laminar onde foram inoculados com 2% (em relação ao peso úmido do substrato) do inóculo das duas diferentes linhagens de *L. edodes* (Ravlikovsky e Symochko 2019). Após a inoculação, os blocos foram selados e encaminhados a câmara de cultivo onde permaneceram para a fase de colonização do fungo sobre o substrato, processo conhecido como corrida do micélio.

## **Produção do substrato não fermentado**

Para a formulação realizada na segunda etapa a metodologia foi semelhante ao primeiro cultivo, com exceção à fermentação, sendo assim, para produção dos substratos, os materiais secos foram misturados de acordo com

as diferentes formulações (Figura 3) afim de homogeneizar os mesmos, em seguida, foi realizada a correção de humidade dos substratos até atingir o valor de aproximadamente 70%. Após a formulação e a correção dos níveis de água, os diferentes substratos foram depositados nos sacos de cultivo. Sendo o peso de cada um dos mesmos de 1,5 kg do substrato úmido.



*Figura 3. Materiais durante o processo de formulação dos substratos. a: palha de trigo antes da homogeneização; b: serragem antes da homogeneização; c: processo de homogeneização dos materiais a seco; d: momento da correção de umidade até os parâmetros desejados.*

Após a acomodação dos substratos, os sacos foram encaminhados para o processo da prensa mecânica, fechados e posteriormente conduzidos ao processo de esterilização em autoclave, como na primeira etapa, os blocos permaneceram na mesma por 4 horas a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,1kgf/cm<sup>3</sup> (Zied et al., 2023). Após os resfriamentos, os blocos foram encaminhados para o processo de inoculação e posteriormente incubação.

## Produção de inóculo e inoculação.

A produção do inóculo seguiu a metodologia proposta por (Serna-Díaz et al., 2020), envolvendo a produção de matriz primária, secundária, terciária e inóculo. As linhagens utilizadas foram a LED 19/11, isolada de produtores da região de Botucatu, SP, e a LED 20/06 fornecida pelo Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES), Quintanar del Rey, Cuenca, Espanha. Ambas foram selecionadas pelo desempenho prévio da mesma em cultivos realizados com shiitake em palha em experimentos anteriores (Ávila et Al., 2023).

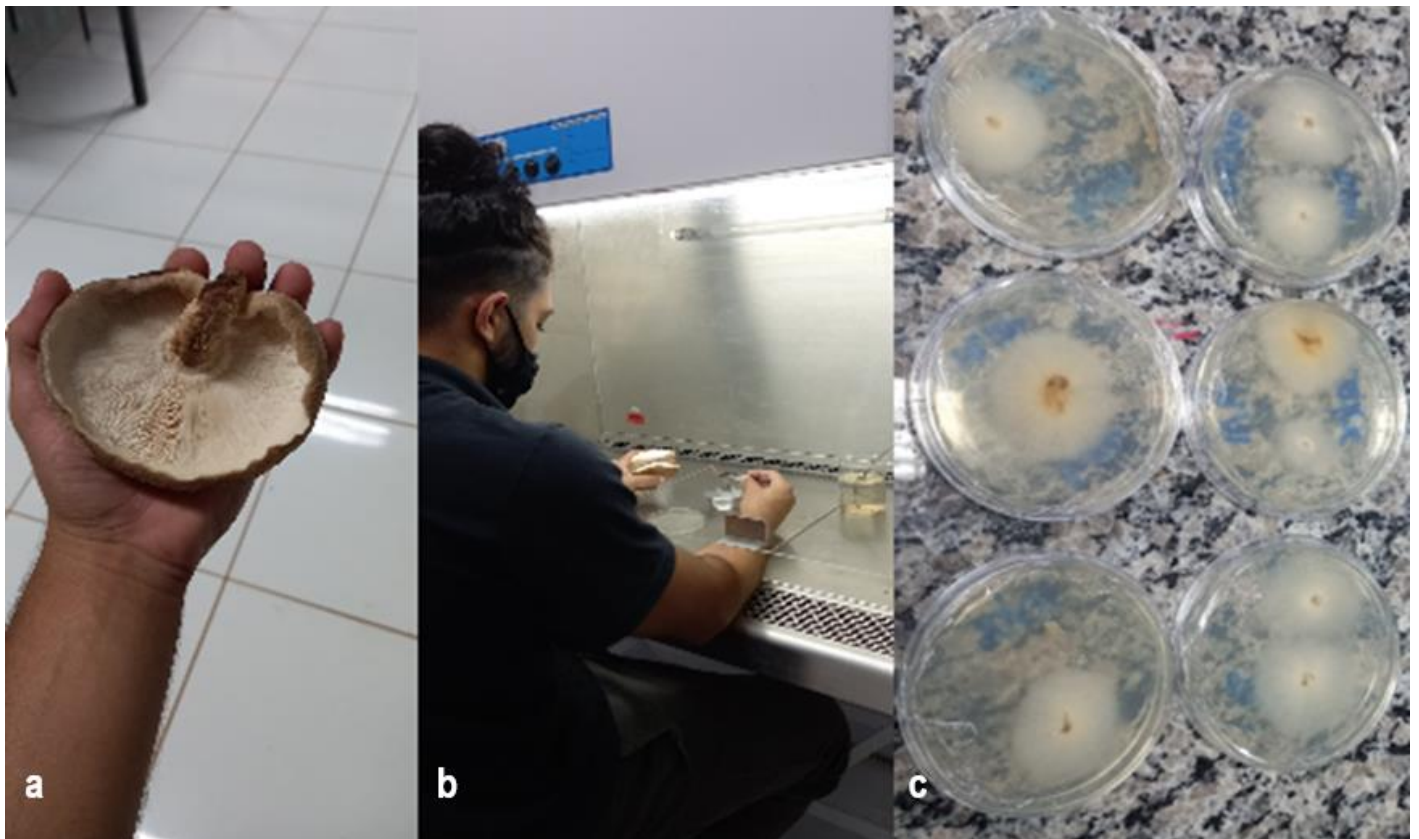


*Figura 4. Armazenamento e linhagens; a: BOD onde as linhagens estavam armazenadas em meio BDA com temperatura de 10°C; b: matriz primária utilizada para a produção do inóculo.*

As matrizes primárias que continham os materiais genéticos das linhagens selecionadas já estavam disponíveis na micoteca do CECOG (figura 4), sendo assim, as mesmas foram utilizadas para a produção das matrizes secundárias em BDA para o cultivo fermentado, que posteriormente foram utilizadas para

produção da terciária. A formulação escolhida para a matriz terciária e o inóculo, foi a base de grãos de sorgo com uma pequena adição de Carbonato de cálcio  $\text{CaCO}_3$ . (Avila et al., 2023).

No cultivo sem a fermentação, a confecção das matrizes começou a partir de um novo isolamento das linhagens, obtido através dos cogumelos que se desenvolveram no cultivo fermentado, mantendo assim o material genético mais viável e vigoroso. (Figura 5).



*Figura 5. Ilustração do processo de produção das matrizes; a: cogumelo utilizado pra produção da matriz primária; b: processo de Isolamento; c: isolados de ambas linhagens obtidos no cultivo fermentado.*

Para iniciar o processo, os grãos de sorgo foram cozidos durante 40 minutos em água fervente. Após os cozimentos, os mesmos foram encaminhados para a retirada do excesso de água, e em seguida suplementados, tendo como base seu peso úmido, foi adicionado 2% de carbonato de cálcio, para a elevação do pH (Serna-Díaz et al., 2020). Já suplementados, os mesmos foram acomodados em sacos plásticos, cada um dos sacos com filtro (figura 6) foi contemplado com 500 g dos grãos preparados

previamente, em seguida, os mesmos foram submetidos ao esterelização, de 4 horas a 121°C e pressão de 1,1kgf/cm<sup>3</sup> em autoclave. Ao fim do resfriamento, os sacos foram encaminhados para o fluxo laminar para realização do processo de inoculação do *L. edodes*. As matrizes secundárias realizadas em meio BDA foram produzidas a partir dos isolados e foram utilizadas para a propagação nos grãos. Após inoculados, a matriz terciária permaneceu durante 20 dias em condições adequadas para o crescimento vegetativo, sendo essas, temperatura de 25°C e umidade em torno dos 50%. O processo para a produção do inóculo utilizado no substrato foi similar, porém o material utilizado para inocular o mesmo, foram os grãos de sorgo colonizados pelo *L. edodes* produzidos na etapa anterior como matriz terciária.

Após inoculados com as diferentes linhagens, os sacos contendo os grãos foram selados e conduzidos para uma BOD mantida a 25°C. Ali permaneceram por 20 dias, onde da colonização dos grãos já estava completa (Figura7) (Gaitán-Hernández et al., 2014). Com o fim do período de colonização, os inóculos estavam prontos para a inoculação no substrato.



Figura 6. Inóculo a base de grãos de sorgo no vigésimo dia pós inoculação totalmente colonizado pelo *L. edodes*

A inoculação dos blocos foi efetuada em ambiente controlado, sendo iniciada somente após a queda da temperatura do substrato autoclavado. O

processo foi conduzido em fluxo laminar (Figura 8), onde os grãos de sorgo colonizados foram inoculados sobre o substrato previamente esterilizado na proporção de 2% em relação ao peso úmido do mesmo (Ravlikovsky e Symochko, 2019). Em seguida, os blocos foram selados afim de evitar contaminações e transferidos para a sala de incubação, onde foram mantidos durante 66 dias a uma temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e uma umidade relativa de  $80 \pm 5\%$  (Zied et al., 2016). A troca gasosa dos blocos ocorre através do filtro presente nos sacos de cultivo.



*Figura 7. Inoculação dos blocos com o L. edodes em fluxo laminar.*

## Incubação e corrida do micélio

Nos dois cultivos a condução no período de corrida do micélio foi semelhante. Após a inoculação as unidades foram dispostas na câmara de cultivo, e mantidas nas condições ideais para o desenvolvimento do fungo na fase vegetativa. Em ambos os experimentos, os blocos foram mantidos sobre condições de temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 5\%$  durante toda a fase de colonização (Zied et al., 2016). (Figura 8).



Figura 8. Blocos de substratos já colonizados pelo *L.edodes*, com a formação da capa ocorrendo, 50 dias após a inoculação..

Durante todo o período de incubação foi realizado o manejo em relação a luminosidade, uma vez que o shiitake demonstrou um melhor desenvolvimento do micélio na fase vegetativa quando o mesmo foi submetido a períodos de baixa ou ausência de luminosidade. Um pequeno experimento foi conduzido para a avaliação do desenvolvimento dos mesmos em diferentes condições de luminosidade (Figura 9) para definir uma metodologia para esses blocos (dados ainda não publicados). Esse comportamento e a influência da luz nessa fase já foi observado em outras espécies e no próprio *L. edodes* (Bernardi., et al 2008; Desisa., et al 2023; Montini 2001., Belletini., et al 2019).



*Figura 9. Blocos de diferentes tratamentos referentes ao experimento com níveis distintos de luminosidade*

O manejo adotado para a luminosidade foi simples, os blocos foram mantidos na ausência de luminosidade durante os primeiros 40 dias. Após esse período já temos o início da formação da capa, neste cenário, os blocos foram submetidos a 12 horas de luminosidade e 12 horas sem luminosidade. Além das condições já descritas anteriormente, foi realizado um manejo adicional com os blocos, sendo esse denominado descolamento. O mesmo consiste em descolar o plástico do bloco de forma manual afim de oxigenar o meio, ajudando assim o fungo a concluir seus processos fisiológicos como a formação da capa. O descolamento foi realizado a cada 10 dias a partir do trigésimo dia de corrida, totalizando 3 descolamentos ao todo por experimento.

## **Cultivo e colheita**

Ao fim do período de colonização e formação da capa os blocos foram encaminhados para a câmara de cultivo e submetidos ao processo de abertura. O mesmo foi realizado aos 60 dias para o substrato fermentado e aos 66 dias para o substrato não fermentado. Após a abertura dos blocos, os sacos foram retirados e os mesmos foram lavados com água corrente, e identificados conforme seus respectivos tratamentos e posteriormente transferidos para a câmara de cultivo (figura 10). As condições da câmara na fase de cultivo foram

de 19°C, e a umidade relativa a 85% afim de criar um ambiente propício pa indução e formação dos cogumelos (Miles e Changs 2004). Esses parâmetros foram utilizados para ambas as experiências.



Figura 10. Manejo da abertura dos blocos; a: abertura dos blocos de shiitake; b: lavagem dos blocos após completa remoção do plástico envolto; c: identificação dos blocos de acordo com seu tratamento.

Para iniciar a produção, os blocos tiveram de ser submersos em água durante 6 horas (figura 11). O primeiro processo de submersão foi feito afim de induzir a produção e foi realizado em dias distintos nos cultivos, uma vez que o tempo que os blocos levaram para atingir as condições para o processo foram distintas. O mesmo foi realizado no 105º dia para a experiência com substrato fermentado e no 90º dia para a experiência sem fermentação. O ideal para este processo de indução é após a formação da capa micelial, como os substratos passaram por tratamentos distintos em relação a fermentação, obtivemos esse cenário. Já foi observado na literatura a presença dessa indução através da submersão para produção inicial do shiitake (Rossi et al., 2002; Desisa et al., 2023). A indução foi repetida no final de cada fluxo, que teve a duração média

de 22 dias cada (Kobayashi et al., 2020).



*Figura 11. Processo de choque através da submersão realizado no tanque; a: transporte dos blocos para indução; b: adição dos blocos no tanque; c: blocos já posicionados aguardando completa submersão para iniciar a contagem regressiva de 6 horas.*

No total, foram realizados 4 fluxos para a experiência que não passou pelo processo de fermentação e 3 fluxos para a experiência fermentada. Totalizando 196 dias de cultivo para o fermentado e 174 dias de cultivo para o experimento não fermentado. Todos os cogumelos foram colhidos manualmente, contados e pesados para determinar os parâmetros agronômicos (figura 12). As colheitas foram realizadas de uma a duas vezes ao dia de acordo com a necessidade diariamente toda a fase de cultivo.



*Figura 12. Colheita e avaliação dos cogumelos durante o cultivo; a: colheita manual dos cogumelos; b: pesagem dos cogumelos colhidos; c: separação dos cogumelos para amostras; d: embalagem dos cogumelos para armazenamento.*

## Parâmetros avaliados

Os cogumelos colhidos, após contados e pesados, foram avaliados quanto a: eficiência biológica (massa fresca de cogumelos X 100/massa seca de substrato, expressa em percentagem), produtividade (massa fresca de cogumelos X 100/massa fresca de substrato, expressa em percentagem), número de cogumelos (média de cogumelos colhidos por unidade), massa média de cogumelos (massa fresca de cogumelos/número de cogumelos, expressa em gramas) e precocidade (massa fresca de cogumelos dos dois primeiros fluxos \* 100/massa total de cogumelos frescos, expressa em porcentagem) (Zied et al. 2013; Pardo-Giménez et al. 2012). Após colhidos, amostras de 500g dos diferentes tratamentos foram encaminhadas para a secagem em estufa para posterior a análise centesimal dos cogumelos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Fermentação

As afeições foram realizadas diariamente, com auxílio do termômetro e do medidor de umidade (Figura 13), onde eram aferidos 4 diferentes pontos nos substratos. Os valores foram submetidos ao cálculo de média.



Figura 13. Afeições realizadas diariamente nos substratos durante a fermentação; a: afeição da temperatura com a utilização do termômetro; b: medidor de umidade durante o processo.

Os substratos à base de palha de arroz e trigo apresentaram as maiores temperaturas até o quinto dia, vindo a reduzir no sexto dia, o que demonstra uma estabilização do substrato, possivelmente pela redução de açúcares solúveis e

outros compostos químicos prontamente disponíveis a comunidade microbiana (Amiri- Sadeghan et al., 2022; El-Ramady et al., 2022). No sexto dia, os substratos à base de *B. brizantha* e bagaço de cana apresentaram as maiores temperaturas, 45,6 e 45,2°C, respectivamente, demonstrando uma maior atividade metabólica dos microrganismos ali presentes nos últimos dias (Figura 14).

Verificou-se que no terceiro e no quarto dia ocorreram os maiores picos de temperatura, sendo no terceiro dia registrado a temperatura de 60,1 °C para a *B. decumbens*, 59,3 °C para a *B. brizantha* e 59,2 °C para o bagaço de cana. Para a palha arroz e palha de trigo, as maiores temperaturas ocorreram no quarto dia, 62,5 e 64,3 °C, respectivamente (Figura 14).

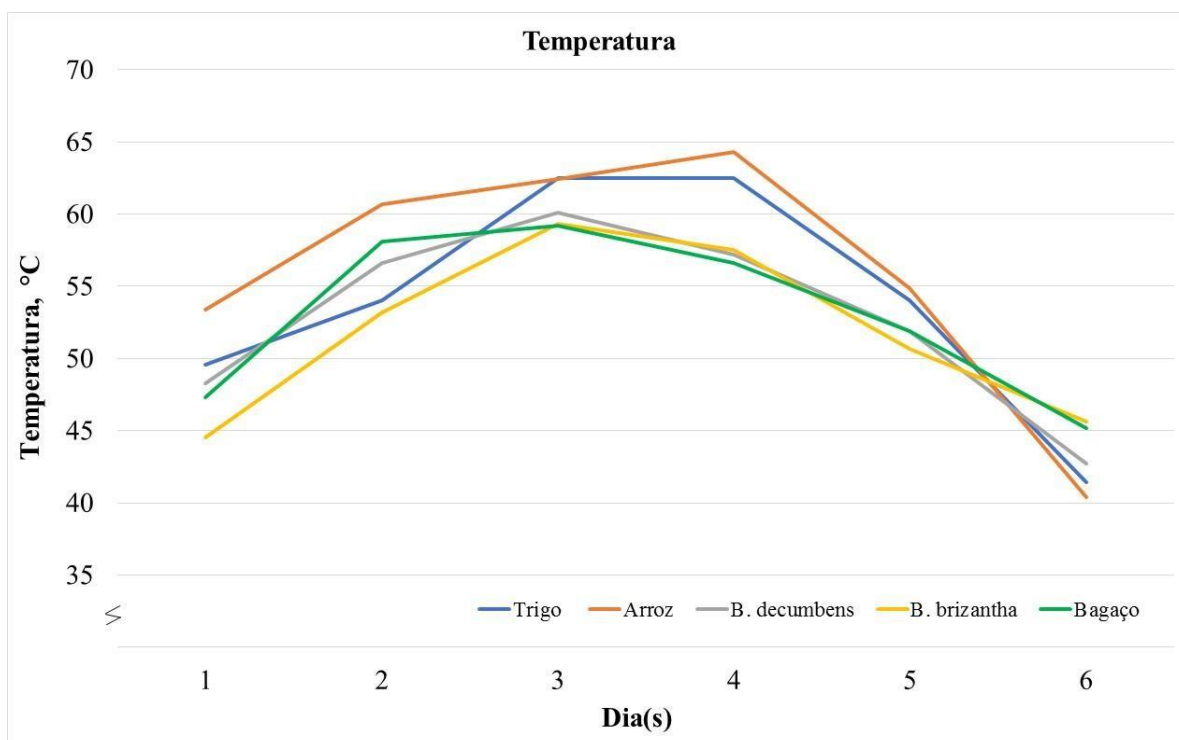


Figura 14. Temperatura diária dos substratos ao longo do processo de fermentação.

Observou-se que a umidade se manteve nos valores ótimos na faixa dos 65 a 75%, recomendados para a fermentação do substrato, proporcionando condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos mesófilos e a consequente sucessão para microrganismos termófilos, conforme descrito por Buth (2017). Uma redução no teor de umidade foi verificada após o segundo dia, que perdurou até o quarto dia, momento este que foi realizado a última revirada do substrato e adição de água.

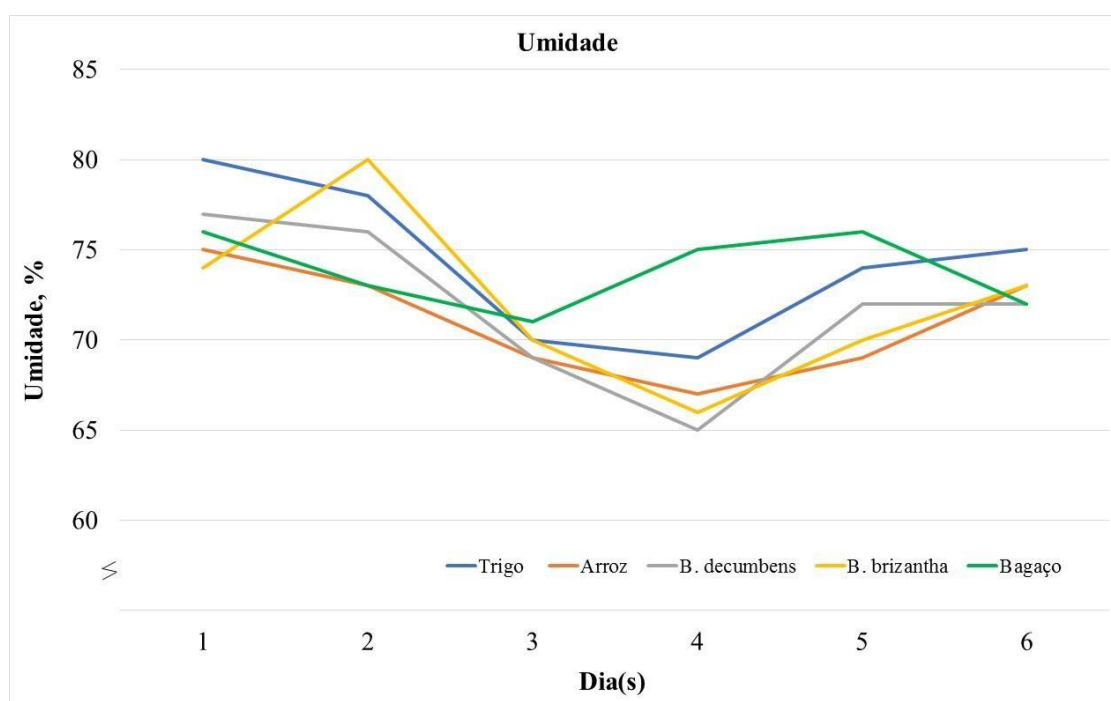


Figura 15. Umidade diária dos substratos ao longo do processo de fermentação.

O substrato que sofreu menos variação no teor de umidade foi o de bagaço de cana, com valores de 71 a 76%, devido sua granulometria menor, com partículas inferiores a 3 mm, o que favoreceu a retenção de água e reduziu a evaporação e a percolação. De certo modo, a pilosidade e a cutícula são característica morfológica das palhas de gramíneas que dificultam a absorção de água nos substratos.

## **Análise química dos substratos.**

A tabela 1 apresenta as características químicas dos substratos após a formulação. Os substratos à base de palha de trigo e arroz, apresentaram os maiores valores de nitrogênio, possivelmente devido a quantidade de farelo de trigo adicionado, o que proporcionou as maiores temperaturas durante a fase de fermentação. Já os substratos de braquiárias tiveram os teores de carbono menor, o que reduz a relação C/N, no entanto devido à natureza química do material, a mineralização ocorreu mais lenta, inclusive pela menor quantidade de farelo usada.

Tabela 1: Análise química dos substratos.

| Substrato           | C<br>% | N                              | Relação<br>C/N | P        | Ca  | Mg<br>g/kg           | S       |
|---------------------|--------|--------------------------------|----------------|----------|-----|----------------------|---------|
| <i>Trigo</i>        | 50     | 1,2                            | 41,6           | 2,6      | 6,0 | 3,4                  | 1,2     |
|                     | pH     | Condutividade<br>$\mu\text{S}$ |                | Celulose |     | Hemicelulose<br>g/kg | Lignina |
|                     | 6,8    | 2688                           |                | 210      |     | 330                  | 280     |
| <i>Arroz</i>        | C<br>% | N                              | Relação<br>C/N | P        | Ca  | Mg<br>g/kg           | S       |
|                     | 48     | 1,3                            | 39,2           | 1,9      | 6,8 | 8,7                  | 7,8     |
|                     | pH     | Condutividade<br>$\mu\text{S}$ |                | Celulose |     | Hemicelulose<br>g/kg | Lignina |
| <i>B. decumbens</i> | 6,1    | 2357                           |                | 210      |     | 293                  | 227     |
|                     | C<br>% | N                              | Relação<br>C/N | P        | Ca  | Mg<br>g/kg           | S       |
|                     | 42     | 0,9                            | 46,6           | 2,8      | 9,4 | 8,9                  | 7,2     |
| <i>B. brizantha</i> | pH     | Condutividade<br>$\mu\text{S}$ |                | Celulose |     | Hemicelulose<br>g/kg | Lignina |
|                     | 6,5    | 2668                           |                | 293      |     | 250                  | 205     |
|                     | C<br>% | N                              | Relação<br>C/N | P        | Ca  | Mg<br>g/kg           | S       |
| <i>B. brizantha</i> | 39     | 1,0                            | 39,0           | 2,1      | 7,3 | 6,2                  | 5,8     |
|                     | pH     | Condutividade<br>$\mu\text{S}$ |                | Celulose |     | Hemicelulose<br>g/kg | Lignina |
|                     | 6,4    | 2951                           |                | 291      |     | 270                  | 216     |
| <i>Bagaço</i>       | C<br>% | N                              | Relação<br>C/N | P        | Ca  | Mg<br>g/kg           | S       |
|                     | 51     | 0,8                            | 63,7           | 1,2      | 3,4 | 4,9                  | 3,8     |
|                     | pH     | Condutividade<br>$\mu\text{S}$ |                | Celulose |     | Hemicelulose<br>g/kg | Lignina |
| <i>Bagaço</i>       | 7,1    | 2774                           |                | 115      |     | 240                  | 410     |

O substrato à base de bagaço de cana apresentou a maior relação C/N (63,7/1), enquanto os demais substratos variaram entre 39/1 a 46,6/1, o que pode ter influenciado a elevada produtividade no experimento com o substrato no segundo experimento. Atila (2019) ressalta que a relação C/N ideal para a produção de *L. edodes* é de 40 a 60/1. Outra informação relevante sobre o substrato com bagaço de cana é o elevado teor de lignina (410 g kg<sup>-1</sup>). Os valores de pH e condutividade dos substratos estiveram dentro do nível ideal recomendado por Zied et al. (2010).

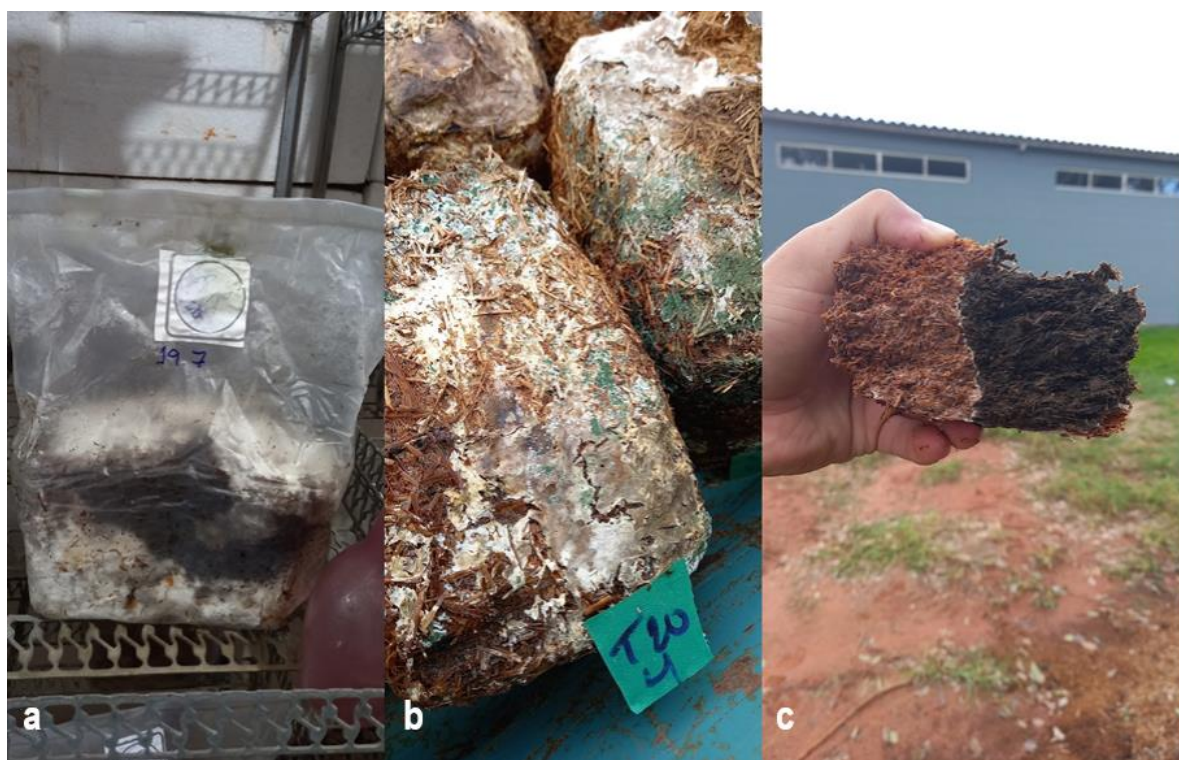
## Parâmetros agronômicos

A abertura dos blocos foi realizada a partir da total colonização e formação da capa, essa que durante os primeiros dias de cultivo após a abertura deteve uma mudança considerável em relação a sua coloração e resistência física como ilustrado na imagem. Essa situação pode ser observada em outros cultivos com shiitake em substratos a base de palha (Mata e Savoie 2018).



Figura 16. Processo de maturação da capa; a: estágio inicial de maturação da capa; b: bloco com uma capa mais maturada; c: bloco com o processo de maturação já finalizado.

Apesar dos substratos a base de palha de trigo e palha de arroz serem conduzidos da mesma maneira que os restantes, após abertos, os mesmos sofreram com contaminações e formação da capa mesmo antes de expostos foi possível observar problemas de colonização, esse cenário foi visualizado em ambos os cultivos (Figura 17). Mesmo conseguindo produzir em algumas unidades, houve muita irregularidade e os dados obtidos nas repetições destes tratamentos não foram suficientes para entrarem na estatística com os demais substratos. Contaminações semelhantes já foram visualizadas em pesquisas com palha de trigo (Mata e Savoie 2018).



*Figura 17. Contaminações e problemas de colonização nos blocos a base de palha de trigo e arroz; a: bloco a base de palha de arroz com problemas de colonização; b: blocos a base de palha de trigo contaminados por fungos competidores; c: descarte de bloco com problema de colonização.*

## **Análise nutricional dos cogumelos**

As amostras foram encaminhadas ao processo de secagem após a colheita., em seguida, enviadas para análise no laboratório da Unesp Dracena. Sendo utilizado o método de Weende (Salman et al., 2010).

| Tratamento     | Substrato           | Linhagem | MS (%) | MM (%) | Proteína (%) | FB (%) | EE (%) |
|----------------|---------------------|----------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| Fermentado     | <i>B. brizantha</i> | 19/11    | 87,92  | 1,46   | 14,87        | 18,36  | 6,13   |
|                |                     | 20/06    | 88,1   | 1,45   | 12,8         | 18,32  | 6,12   |
|                | <i>B. decumbens</i> | 19/11    | 88,33  | 1,45   | 12,58        | 18,27  | 6,1    |
|                |                     | 20/06    | 88,17  | 1,45   | 12,33        | 18,31  | 6,11   |
|                | Bagaço de cana      | 19/11    | 87,14  | 1,47   | 12,91        | 18,52  | 6,19   |
|                |                     | 20/06    | 87,62  | 1,46   | 12,64        | 18,42  | 6,15   |
| Não fermentado | <i>B. brizantha</i> | 19/11    | 88,37  | 1,45   | 12,16        | 18,26  | 6,1    |
|                |                     | 20/06    | 89,06  | 1,44   | 10,69        | 18,02  | 6,05   |
|                | <i>B. decumbens</i> | 19/11    | 88,98  | 1,44   | 11,24        | 17,95  | 6,06   |
|                |                     | 20/06    | 89,08  | 1,44   | 11,65        | 17,99  | 6,05   |
|                | Bagaço de cana      | 19/11    | 87,62  | 1,46   | 13,07        | 18,42  | 6,15   |
|                |                     | 20/06    | 88,34  | 1,45   | 12,75        | 18,27  | 6,1    |

Tabela 1: Análise centesimal dos tratamentos realizados com as linhagens 19/11 e 20/06 de *Lentinula edodes* em diferentes substratos, com as variáveis de Matéria Seca (MS), Matéria Mineral (MM), Proteína, Fibra Bruta (FB) e Extrato Etéreo (EE).

Uma análise centesimal dos cogumelos revelou que os valores de matéria seca (MS) se obtiveram resultados, que variaram entre 87% e 89%, com um teor constante de água, independentemente do substrato ou da linhagem. Da mesma forma, a matéria mineral (MM) apresentou pouca variação, com valores entre 1,44% e 1,47%, indicando que o conteúdo mineral não foi significativamente afetado pelos diferentes tratamentos aplicados.

O teor de proteína foi o componente que apresentou maior variação, com concentrações mais elevadas observadas na linhagem 19/11, especialmente quando cultivada nos substratos a base de *B. brizantha* e bagaço de cana. Em comparação, a linhagem 20/06 exibiu níveis proteicos mais baixos em quase todos os cenários, destacando-se afirmativamente apenas no substrato não fermentado de *B. decumbens*. As fibras brutas variaram de 17,95% a 18,52%, com diferenças mínimas, o que sugere uma composição de fibra relativamente constante, um fator relevante para a digestibilidade e as propriedades funcionais dos cogumelos.

Em relação ao extrato etéreo (EE), que reflete o teor de lipídios, observou-se uma estabilidade em torno de 6%, evidenciando o baixo teor lipídico

específico dessa espécie (Furlany e Godoy, 2007). Esses dados indicam que, embora substratos e linhagens influenciem certos componentes nutricionais, o perfil geral dos cogumelos manteve-se relativamente constante, com destaque para a linhagem 19/11, que demonstrou maior eficiência na produção de proteína.

A fermentação, por sua vez, teve um impacto moderado nos resultados. Nos substratos fermentados, foi observada uma leve tendência a valores mais elevados de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), mas não houve alterações significativas nos níveis de proteína, fibra bruta e extrato etéreo (EE), que fornecem relativamente constantes. Esses resultados sugerem que, embora o processo de interferência possa influenciar alguns componentes, os efeitos observados nas partes analisadas não foram suficientemente pronunciados para causar mudanças substanciais na composição nutricional dos cogumelos.

## **Cultivo do substrato fermentado**

O primeiro cultivo do *L. edodes*, foi o com o substrato previamente fermentado. Observou-se que a linhagem LED 19/11 no substrato a base de *B. brizantha* obteve melhores rendimentos, atingindo 23,08% de produtividade, em comparação, nos outros substratos utilizados, o valor atingido foi de 11,77% na *B. decumbens* e 12,85% no bagaço de cana. Quando analisamos a linhagem 20/06, podemos observar que o melhor desempenho em relação a produtividade foi com a *B. Decumbens*. onde obteve 16,77% de produtividade. A LED 19/11 obteve uma produtividade significativamente superior em *B. brizantha* quando comparada à LED 20/06, cenário que não foi observado no bagaço, com diferenças estatísticas indicadas pelas letras maiúsculas e minúsculas na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros agronômicos do cultivo com substrato fermentado

|                                 | Substrato           |                     |         |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| Linhagem                        | <i>B. brizantha</i> | <i>B. decumbens</i> | Bagaço  |
| Produtividade* (%)              |                     |                     |         |
| LED 19/11                       | 23.08 a A           | 11.77 b             | 12.85 b |
| LED 20/06                       | 13.42 B             | 16.77               | 10.58   |
| CV (%)                          | 21.96               |                     |         |
| Número de cogumelos* (unidades) |                     |                     |         |
| LED 19/11                       | 13.20               | 8.40                | 4.80    |
| LED 20/06                       | 10.60               | 11.40               | 4.60    |
| CV (%)                          | 31.61               |                     |         |
| Peso médio dos cogumelos* (g)   |                     |                     |         |
| LED 19/11                       | 44.05               | 22.93               | 59.7    |
| LED 20/06                       | 20.76               | 22.62               | 47.85   |
| CV (%)                          | 27.64               |                     |         |
| Precocidade* (%)                |                     |                     |         |
| LED 19/11                       | 70.54               | 59.66               | 34.02   |
| LED 20/06                       | 62.04               | 67.93               | 29.45   |
| CV (%)                          | 46.78               |                     |         |
| Eficiência biológica* (%)       |                     |                     |         |
| LED 19/11                       | 57.70 a A           | 32.70 b             | 31.09 b |
| LED 20/06                       | 33.56 B             | 46.59               | 25.61   |
| CV (%)                          | 22.38               |                     |         |

\*Dados transformados pela raiz quadrada de  $Y + 0,5 - \text{SQRT}(Y+0,5)$ . Médias distintas diferiram pelo teste estatístico Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam médias entre colunas e letras maiúsculas comparam entre linhas

Apesar da baixa produtividade encontrada no bagaço de cana, quando analisamos o peso médio dos cogumelos, que variou bastante entre os substratos analisados, foi possível observar que tanto a linhagem 19/11 quanto a 20/06 obtiveram o seu maior peso médio no substrato em questão 59,7 g e 47,85 g respectivamente. Os resultados obtidos pela 19/11 na *B. Brizantha* também foram interessantes, com peso médio de 44,0 g, com um bom número de cogumelos, o que resultou na mais alta produtividade observada entre os

tratamentos. No entanto, as duas linhagens produziram cogumelos menores na *B. decumbens*.

Em relação à precocidade, a 19/11 foi mais precoce no substrato a base de *B. brizantha* 70,54%, enquanto a **20/06** foi mais precoce em *B. decumbens* 67,93%. No bagaço por sua vez, foram obtidos valores a baixo dos 35% em ambas as linhagens. A eficiência biológica encontrada pela 19/11 foi significativamente maior em *B. brizantha* onde atingiu 57,70%, do que nos outros substratos, enquanto a 20/06 obteve seu melhor desempenho em *B. decumbens* com 46,59%.

Com isso é possível afirmar que no primeiro cultivo a linhagem 19/11 se destacou no substrato a base *B. brizantha*, com bons valores de produtividade, número de cogumelos e eficiência biológica, enquanto a linhagem 20/06 mostrou desempenho mais estável no substrato a base de *B. decumbens*. Esses resultados indicam que as linhagens respondem de maneira diferente às composições químicas dos substratos, o que sugere que a escolha do substrato pode ser otimizada de acordo com a linhagem utilizada para assim, maximizar o rendimento.

Sabe-se que a adição de nitrogênio aos substratos destinados à produção de *Lentinula edodes* é eficaz, sobretudo quando está presente na forma completa, como é o caso do farelo (Boyle, 1998). No entanto, nos metabolismos destes fungos de podridão, os açúcares são gerados mais rapidamente do que são consumidos, resultando em acumulação (Stamets, 2011). Embora a razão para o aumento do rendimento do shiitake com a disponibilidade de hidratos de carbono não seja totalmente compreendida, pode representar uma ferramenta relevante para aumentar os rendimentos (Reid, 1983).

Nesse sentido, é possível inferir que os menores rendimentos observados em substratos fermentados, como no caso deste primeiro cultivo, estão associados ao consumo de carboidratos pelos microrganismos envolvidos no processo de fermentação, o que influencia sutilmente os rendimentos quando comparados ao substrato não fermentado (Ayilara et al., 2020).

## Cultivo do substrato não fermentado

Ao analisar a utilização de substratos não fermentados, apenas autoclavados, observa-se que foram obtidas maiores produtividades nos substratos a base de *B. brizantha* e bagaço de cana, não sendo influenciados pela linhagem utilizada. A linhagem 19/11, quando cultivada no substrato a base de *B. decumbens*, apresentou rendimento abaixo dos 20% quando observamos a produtividade. Entretanto, valores maiores foram obtidos nos outros substratos, ambos acima dos 25% (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros agrônômicos do cultivo com substrato não fermentado.

|                                | Substrato           |                     |                |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| Linhagem                       | <i>B. brizantha</i> | <i>B. decumbens</i> | Bagaço de cana |
| Produtividade (%)              |                     |                     |                |
| LED 19/11                      | 25.04 a             | 16.19 b             | 30.29 a        |
| LED 20/06                      | 22.05               | 23.33               | 26.05          |
| CV (%)                         | 28.22               |                     |                |
| Número de cogumelos (unidades) |                     |                     |                |
| LED 19/11                      | 13.20 a             | 7.40 b              | 19.40 a        |
| LED 20/06                      | 11.80               | 11.20               | 13.60          |
| CV (%)                         | 42.82               |                     |                |
| Peso médio dos cogumelos (g)   |                     |                     |                |
| LED 19/11                      | 30.15               | 32.71               | 24.81          |
| LED 20/06                      | 33.01               | 33.35               | 29.11          |
| CV (%)                         | 20.96               |                     |                |
| Precocidade (%)                |                     |                     |                |
| LED 19/11                      | 68.96               | 71.11               | 86.29          |
| LED 20/06                      | 75.42               | 71.40               | 81.41          |
| CV (%)                         | 19.92               |                     |                |
| Eficiência biológica (%)       |                     |                     |                |
| LED 19/11                      | 68.04 a             | 41.89 b             | 81.87 a        |
| LED 20/06                      | 59.85               | 60.34               | 70.41          |
| CV (%)                         | 27.87               |                     |                |

As médias distintas diferiram pelo teste estatístico Scott-Knott a um nível de 5% de probabilidade, com letras minúsculas à comparar as médias entre colunas.

O peso médio dos cogumelos foi relativamente estável, variando entre 24,81 g e 33,35 g para as duas linhagens. Essa consistência sugere que a genética das linhagens tem um papel mais preponderante no tamanho final dos cogumelos do que as variações no substrato, estudos anteriores indicam que o peso dos cogumelos é menos influenciado pelo substrato e mais pelas características genéticas, desde que os nutrientes essenciais estejam presentes em quantidades adequadas (Chang e Miles 2004).

A linhagem LED 20/06 mostrou-se produtiva e eficiente em todos os substratos analisados, com produtividade acima dos 22% em todas as situações, com uma ligeira vantagem no bagaço de cana, porém sem diferença estatística. A estabilidade do rendimento, número de cogumelos e eficiência biológica entre os substratos sugere que essa linhagem possui uma plasticidade significativa, sendo capaz de se adaptar bem as diferentes condições de cultivo impostas. A vantagem observada no bagaço de cana reforça a ideia de que esse substrato, pode ser uma opção promissora para a produção comercial de shitake (figura 18).



Figura 18. Blocos a base de bagaço de cana durante o cultivo com diferentes estágios de desenvolvimento dos cogumelos.

Na literatura são registradas eficiências biológicas maiores quando analisamos substratos mais tradicionais que obtém médias de 92% (Freitas et al., 2024; Baktemur et al., 2022), superiores aos valores encontrados neste estudo, valores entre 41% e 81% para o substrato não fermentado e valores entre 25% e 57% para o substrato fermentado. Entretanto, ao observarmos estudos com formulações a base de palha ou bagaço, é possível avaliar os resultados obtidos de maneira positiva, evidenciando a possibilidade da utilização dos materiais para o cultivo do *L. edodes* (Montini 2002). Ao analisarmos a eficiência biológica individualmente, a mesma foi mais alta no substrato de *B. brizantha* com a linhagem 19/11, atingindo 68,04%, em bagaço de cana com 81,87%, e mais baixa na *B. decumbens*, com 41,89%. A linhagem 20/06 apresentou maior consistência entre os substratos, com a eficiência biológica variando de 59,85% até 70,41%. Substratos com maior concentração de lignocelulose, como o bagaço de cana, tendem a apresentar maiores valores de eficiência biológica. Isto pode explicar porque a mesma foi mais baixa para *B. Decumbens*, sendo o substrato quimicamente menos adequado para

decomposição pelo fungo em relação a outros substratos.

Shifeng et al. (2017), ao substituírem o substrato convencional utilizado para a produção de shiitake por palha de arroz, também observaram uma diminuição nos valores de eficiência biológica, onde quanto maior a substituição, mais a mesma afetada. Atualmente, este estudo permanece dentro das métricas estabelecidas para a produção deste fungo neste cenário, variando de 36% a 63%, principalmente em palha de arroz (Avila et al., 2023).

### Comparação entre os cultivos

Em relação a produtividade, as mesmas encontradas nos substratos fermentados foram, de maneira geral consideravelmente inferiores às observadas nos substratos não fermentados.

*Tabela 4. Produtividade dos cultivos fermentado e não fermentado (%).*

| Substrato                  | Fermentado |       | Não fermentado |       |
|----------------------------|------------|-------|----------------|-------|
|                            | 19/11      | 20/06 | 19/11          | 20/06 |
| <b><i>B. brizantha</i></b> | 23.08      | 13.42 | 25.04          | 22.05 |
| <b><i>B. decumbens</i></b> | 11.77      | 16.77 | 16.19          | 23.33 |
| <b>Bagaço de cana</b>      | 12.85      | 10.58 | 30.29          | 26.05 |

Um possível motivo para isso é que o processo de fermentação pode não ter sido suficientemente eficiente para liberar os nutrientes necessários para assim maximizar o rendimento, ou ciclo de fermentação tenha criado condições menos favoráveis ao desenvolvimento do shiitake, como compostos tóxicos que

podem ter inibido ou retardado o crescimento do micélio, ou até o consumo de nutrientes pelos microrganismos envolvidos na fermentação e que pudessem vir a ser importantes no desenvolvimento posterior do shiitake. Nos substratos não fermentados, especialmente no bagaço de cana, o *L. edodes* obteve resultados superiores (figura 19).



*Figura 19. Blocos com substratos não fermentados durante a fase de produção e colheita*

O número de cogumelos também foi inferior nos substratos fermentados quando comparados aos não fermentados, especialmente no bagaço de cana (tabela 5). No substrato não fermentado a base de bagaço de cana a linhagem 19/11 produziu quase 4 vezes mais cogumelos do que o substrato fermentado, sugerindo que a fermentação pode ter reduzido a qualidade do substrato para a frutificação, ou que o processo pode ser otimizado.

Tabela 5. Número de cogumelos dos cultivos fermentado e não fermentado (u).

| Substrato                  | Fermentado |       | Não Fermentado |       |
|----------------------------|------------|-------|----------------|-------|
| Linhagem                   | 19/11      | 20/06 | 19/11          | 20/06 |
| <b><i>B. brizantha</i></b> | 13.20      | 10,6  | 13.20          | 11.8  |
| <b><i>B. decumbens</i></b> | 8.40       | 11.40 | 7.40           | 11.20 |
| <b>Bagaço de cana</b>      | 4.8        | 4.6   | 19.40          | 13.6  |

Curiosamente, no substrato fermentado, os cogumelos obtidos pela 19/11 cresceram com maior massa média nos substratos a base de *B. brizantha* e bagaço de cana, com até 59,7g no bagaço, sugerindo que a fermentação pode ter favorecido a qualidade nutricional do substrato para cogumelos maiores, porém a produtividade obtida em ambos os substratos foi consideravelmente menor que nos substratos não fermentados (tabela 6). A linhagem 20/06 por sua vez, apresentou resultados melhores no substrato não fermentado, com cogumelos de peso médio superiores em todos os substratos.

Tabela 6. Peso médio dos cogumelos nos cultivos fermentado e não fermentado (g).

| Substrato                  | Fermentado |       | Não Fermentado |       |
|----------------------------|------------|-------|----------------|-------|
| Linhagem                   | 19/11      | 20/06 | 19/11          | 20/06 |
| <b><i>B. brizantha</i></b> | 44.05      | 20.76 | 30.15          | 33.01 |
| <b><i>B. decumbens</i></b> | 22.93      | 22.62 | 32.71          | 33.35 |
| <b>Bagaço de cana</b>      | 59.7       | 47.85 | 24.81          | 29.11 |

A precocidade foi, de modo geral, superior nos substratos não fermentados, especialmente no bagaço de cana onde a linhagem 19/11, por exemplo, foi muito mais precoce no substrato de bagaço não fermentado, com 86,29%, em comparação ao fermentado, 34,02%).

*Tabela 7. Eficiência biológica dos cultivos fermentado e não fermentado (g).*

| <b>Substrato</b>      | <b>Fermentado</b> |              | <b>Não Fermentado</b> |              |
|-----------------------|-------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| <b>Linhagem</b>       | <b>19/11</b>      | <b>20/06</b> | <b>19/11</b>          | <b>20/06</b> |
| <b>B. brizantha</b>   | 57.7              | 33.56        | 68.04                 | 59.85        |
| <b>B. decumbens</b>   | 32.7              | 46.59        | 41,89                 | 60.34        |
| <b>Bagaço de cana</b> | 31.09             | 25.61        | 81.87                 | 70,41        |

Assim como na maioria dos parâmetros, a eficiência biológica foi consistentemente maior nos substratos não fermentados (Tabela 7). Para a 19/11, por exemplo, o valor foi significativamente superior no bagaço de cana não fermentado, com 81,87% em comparação ao fermentado que obteve 31.09%. Esse padrão sugere que, no caso desse experimento, os substratos não fermentados forneceram melhores condições para a conversão de substrato em biomassa fúngica.

## Considerações finais

A fermentação do substrato, em vez de melhorar os resultados, parece ter reduzido o desempenho de ambas as linhagens, especialmente em termos de produtividade e eficiência biológica. Embora o processo fermentativo tenha um potencial de aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes, esses resultados sugerem que a fermentação pode ter sido inadequada para o cultivo do shiitake nestes substratos avaliados ou que o ciclo de fermentação pode ter criado um ambiente menos favorável para o crescimento e frutificação do shiitake.

Este estudo evidencia que o rendimento dos cogumelos está relacionado com o substrato, a linhagem, e a técnica de preparo do substrato a se utilizar, especialmente quando se utiliza-se resíduos agrícolas com menor concentração de lignina para a produção do *L. edodes*. Através da proposta de uma possível redução no uso de serragem, implicando, conseqüentemente, na diminuição da concentração de lignina no substrato, como era de se esperar, esse processo impactou diretamente no crescimento e desenvolvimento do fungo no substrato. devido à sua capacidade adaptativa em produzir enzimas para degradação da lignina (peroxidase, manganês peroxidase, aryl álcool oxidase e lacase) (Harris-Valle et al., 2007). Dessa forma, a produção de shiitake em resíduos agrícolas com menor concentração de lignina, como as palhas utilizadas e o bagaço de cana-de-açúcar, ainda não se estabeleceu como uma ferramenta tão eficaz quanto a produção com substratos a base de serragem (Freitas et al., 2024). Mesmo sendo menos eficiente comparado ao substrato tradicional, cenário que era esperado, os resultados demonstram um bom potencial para a utilização dos materiais, principalmente se levarmos em consideração em alguns dos cenários, como a produção no não fermentado que em ambas as linhagens obtiveram boa produtividade principalmente no bagaço de cana de açúcar. É importante ressaltar que uso de resíduos agrícolas, como bagaço de cana e forragens, contribui para a diminuição de problemas relacionados ao mesmo além de prover mais opções ao produtor, isso não apenas ajuda a minimizar o impacto ambiental, mas também agrega valor a subprodutos que, de outra forma, poderiam ser descartados. A utilização de diferentes substratos permite a exploração de diferente linhagens e condições de cultivo, ampliando o potencial

de desenvolvimento e da adesão dos produtores a possibilidade de ampliar seus produtos e mercados.

Apesar das vantagens, a utilização de substratos alternativos também apresenta seus desafios. A variabilidade na composição e na qualidade dos substratos afetam diretamente o desempenho das linhagens de shitake, como demonstrado. Portanto, a padronização e o controle das condições de cultivo são essenciais para assim garantir resultados consistentes.

## 5. CONCLUSÃO

A utilização de materiais alternativos, como a palha e os resíduos da indústria da cana-de-açúcar, que têm concentrações mais baixas de lignina, demonstrou-se eficaz na produção de *Lentinula edodes*. No entanto, são necessários estudos adicionais para abordar questões relacionadas com a redução dos rendimentos. A fermentação do substrato, nesse caso, não resultou em melhores resultados de produtividade e eficiência biológica. O substrato não fermentado demonstrou ser mais eficaz em relação a produtividade, número de cogumelos e precocidade, sugerindo que pode ser uma estratégia melhor para o cultivo de *Lentinula edodes* nas condições específicas do experimento.

O entendimento das interações entre as linhagens com os substratos, as características dos mesmos e as condições de cultivo são fundamentais para aprimorar as técnicas de cultivo e aumentar a eficiência da produção. Com isso a adoção de substratos alternativos, como *B. brizantha*, *B. decumbens* e bagaço de cana, pode vir a ser uma estratégia valiosa para a produção de *Lentinula edodes*, contribuindo para um sistema de cultivo mais sustentável, com mais opções e podendo ser economicamente viável, desde que os desafios sejam adequadamente abordados.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, I., Arif, M., Xu, M., Zhang, J., Ding, Y., and Lyu, F. (2023). Therapeutic values and nutraceutical properties of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): A review. Trends in Food Science & Technology 134, 123–135. doi: 10.1016/j.tifs.2023.03.007
- Andrade, M. C. N. de, Minhoni, M. T. de A., Sansígolo, C. A., Zied, D. C., and Sales-Campos, C. (2011). Estudo comparativo da constituição nutricional da madeira e casca de espécies e clones de Eucalipto visando o cultivo de Shiitake em toras. Rev. Árvore 35, 183–192. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622011000200002>
- Atila, F. (2019). Compositional changes in lignocellulosic content of some agro-wastes during the production cycle of shiitake mushroom. Scientia Horticulturae 245, 263–268. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.029
- Avila, I.A.F., da Silva Alves, L., Zied, D.C., (2023). Bioconversion of rice straw by *Lentinula edodes* under different spawn formulations. Braz. J. Microbiol. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01116-w>
- Ayilara, M.S., Olanrewaju, O.S., Babalola, O.O., Odeyemi, O., (2020). Waste Management through Composting: Challenges and Potentials. Sustainability 12, 4456. <https://doi.org/10.3390/su12114456>
- Ashrafuzzaman, M., Kamruzzaman, A. K. M., Ismail, M. R., Shahidullah, S. M., and Fakir, S. A. (2009). Substrate affects growth and yield of shiitake mushroom. African Journal of Biotechnology 8. Available at: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60972>
- Baktemur, G., Kara, E., Yazar, M., Yilmaz, N., Ağçam, E., Akyildiz, A., Taşkin, H., (2022). Yield, quality and enzyme activity of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) grown on different agricultural wastes. Not. Bot. HORTI Agrobot. CLUJ-NAPOCA 50. <https://doi.org/10.15835/nbha50112553>
- Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., et al. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus spp.* Saudi Journal of Biological Sciences 26, 633–646. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.12.005
- Bernardi, E., Donini, L. P., Minotto, E., and Nascimento, J. S. do (2021). DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE LUZ NO CRESCIMENTO E MASSA MICELIANA DE *AGARICUS BRASILIENSIS* S. WASSER ET AL. Arq. Inst. Biol. 75, 375–378. doi: 10.1590/1808-1657v75p3752008
- Boyle, D., (1998). Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. Soil Biol. Biochem. 30, 817–823. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00159-4)

- Buth J (2017) The Mushroom Industry in the Netherlands. In: Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications, pp. 197-209. Wiley Blackell.
- Carrasco J, Navarro MJ, Santos M, Diáñez F, Gea FJ (2016) Incidence, identification and pathogenicity of *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on *Agaricus bisporus* mushroom crops in Spain. *Annals of Applied Biology* 168(2):214-224.
- Chen, L., Gong, Y., Cai, Y., Liu, W., Zhou, Y., Xiao, Y., Xu, Z., Liu, Y., Lei, X., Wang, G., Guo, M., Ma, X., Bian, Y., (2016). Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. *PLOS ONE* 11, e0160336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160336>
- Desisa, B., Muleta, D., Dejene, T., Jida, M., Goshu, A., and Martin-Pinto, P. (2023). Substrate Optimization for Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) Mushroom Production in Ethiopia. *Journal of Fungi* 9, 811. doi: 10.3390/jof9080811
- Dias, E. S. (2010). Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. *Ciênc. agrotec.* 34, 795–803. doi: 10.1590/S1413-70542010000400001
- Ferreira, D. G., Neto, O. B. de A., and Assunção, L. S. (2020). Utilização da Técnica Jun-Cao para o Cultivo de Cogumelos Comestíveis no Brasil. *Caderno de Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia* 2, 52–63. doi: 10.21166/cpitt.v2i1.2033
- Freitas, M. A. da S., Teixeira, P. A. G., Vieira Junior, W. G., Pardo-Giménez, A., and Zied, D. C. (2024). Liquid calcium supplementation between flushes increases shiitake yield. *Scientia Horticulturae* 338, 113695. doi: 10.1016/j.scienta.2024.113695
- Furlani, R. P. Z., and Godoy, H. T. (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Food Sci. Technol* 27, 154–157. doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100027>
- Gaitán-Hernández, R., Norberto Cortés, G.M.,(2014). Improvement of yield of the edible and medicinal mushroom *Lentinula edodes* on wheat straw by use of supplemented spawn. *Braz. J. Microbiol.* 45, 467–474. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200013>
- Gaitán-Hernández, R., Aquino-Bolaños, E. N., Herrera, M., and Salmenes, D. (2020). Yield, and phenolic content of shiitake mushrooms cultivated on alternative substrates. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 188–197. doi: 10.9755/ejfa.2020.v32.i3.2076
- Gao, S., Huang, Z., Feng, X., Bian, Y., Huang, W., Liu, Y., (2020). Bioconversion of rice straw agro-residues by *Lentinula edodes* and evaluation of non-volatile taste compounds in mushrooms. *Sci. Rep.* 10, 1814. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58778-x>

Harris-Valle, C., Esqueda, M., Sánchez, A., Beltrán-García, M., Valenzuela-Soto, E.M., (2007). Polar vineyard pruning extracts increase the activity of the main ligninolytic enzymes in *Lentinula edodes* cultures. Can. J. Microbiol. 53, 1150–1157. <https://doi.org/10.1139/W07-080>

Liu, Q., Niu, S., Hu, S., Cui, X., Shi, Z., Wu, J., et al. (2023). Lignocellulose degradation pattern and structural change of the sawdust substrate and enzyme secretion by *Lentinula edodes* during its production. Wood Sci Technol 57, 389–405. doi: 10.1007/s00226-023-01460-y.

Jeffries, Thomas W. "Biodegradation of lignin and hemicelluloses." Biochemistry of microbial degradation (1994): 233-277.

Kobayashi, T., Oguro, M., Akiba, M., Taki, H., Kitajima, H., and Ishihara, H. (2020). Mushroom yield of cultivated shiitake (*Lentinula edodes*) and fungal communities in logs. Journal of Forest Research 25, 269–275. doi: 10.1080/13416979.2020.1759886.

Kumar, P., Mishra, A.K., Chaudhari, S.K., Sharma, D.K., Rai, A.K., Singh, K., Rai, P., Singh, R., (2021). Carbon Sequestration and Soil Carbon Build-Up under Eucalyptus Plantation in Semi-Arid Regions of North-West India. J. Sustain. For. 40, 319–331. <https://doi.org/10.1080/10549811.2020.1749856>

Maciel, W. P. (2013). Cultivo de *Lentinula edodes* em diferentes condições de substrato e temperatura. Available at: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/1007>.

Mahdizadeh, V., Safaie, N., Salehi, M., and Jahedi, A. (2021). Substrate preference of Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains. Journal of Crop Protection 10, 63–74.

Mata, G., and Savoie, J.-M. (2018). "Shiitake cultivation on straw: an alternative for subtropical regions," in Updates on tropical mushrooms. Basic and applied research (El Colegio de la Frontera Sur), 227 p. Available at: <https://hal.inrae.fr/hal-02789650>

Mengqi, Z., Shi, A., Ajmal, M., Ye, L., Awais, M., (2023). Comprehensive review on agricultural waste utilization and high-temperature fermentation and composting. Biomass Convers. Biorefinery 13, 5445–5468. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01438-5>

Miles, P. G. (n.d.). Cogumelos: Cultivo, Valor Nutricional, Efeito Medicinal e Impacto Ambiental. doi: 10.1201/9780203492086

Montini, R. M. de C. [UNESP (2001). Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade em cultivo axênico de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler). Available at: <http://hdl.handle.net/11449/101743>.

- Moreaux, K., (2017). Spawn Production, in: Edible and Medicinal Mushrooms. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 89–128. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch5>
- Pardo-Giménez, A., Zied, D. C., Álvarez-Ortí, M., Rubio, M., and Pardo, J. E. (2012). Effect of supplementing compost with grapeseed meal on *Agaricus bisporus* production. J Sci Food Agric 92, 1665–1671. doi: 10.1002/jsfa.5529.
- Pascholati, S. F., Marassatto, C. M., Stangarlin, J. R., and Brand, S. C. (2014). Produção de Shiitake em toras de eucalipto. Available at: <https://repositorio.usp.br/item/002692257>
- Paswal, S., Kakraliya, S. S., and Fogawat, V. (2024). Effect of Different Substrates on Nutritional Composition of Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). Archives of Current Research International 24, 156–161. doi: 10.9734/acri/2024/v24i4671
- Reid, I.D., (1983). Effects of Nitrogen Supplements on Degradation of Aspen Wood Lignin and Carbohydrate Components by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 830–837. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.830-837.1983>
- Royse, D.J., Baars, J., Tan, Q., (2017). Current Overview of Mushroom Production in the World, in: Edible and Medicinal Mushrooms. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 5–13. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch2>
- Ravlikovsky, A., and Symochko, L. (2019). Agroecological Aspects of Cultivation Shiitake Mushroom in Ukraine. 2019 International Council on Technologies of Environmental Protection (ICTEP), 221–225. doi: 10.1109/ICTEP48662.2019.8968979.
- Rossi, I. H., Monteiro, A. C., Machado, J. O., Andrioli, J. L., and Barbosa, J. C. (2003). Shiitake (*Lentinula edodes*) production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sugarcane molasses. Braz. J. Microbiol. 34, 66–71. doi: 10.1590/S1517-83822003000100014
- Salman, A. K. D., Ferreira, A. C. D., Soares, J. P. G., and Souza, J. P. de (2010). Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. Available at: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/884369>.
- Salwan, R., Katoch, S., Sharma, V. (2021). Desenvolvimentos recentes em cogumelos shiitake e sua importância nutracêutica. Em: Dai, X., Sharma, M., Chen, J. (eds) Fungos na produção sustentável de alimentos. Biologia fúngica. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64406-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64406-2_10)
- Serna-Días, M. G.; Mercado-Flores, Y.; Jiménez-González, A.; Anducho-Reyes, M. A.; Medina-Márin, J.; Seck Tuoh, J. C.; Téllez-Jurado, A., (2020). Use of barley straw as a support for the production of conidiospores of *Trichoderma harzianum*. Biotechnology Reports, [s. l.], v. 26, p. e00445, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00445>

Shamugam, S., & Kertesz, M. A. (2023). Bacterial interactions with the mycelium of the cultivated edible mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1), 1xac018.

Shifeng Y, Yang X, Tianji H, Jian Z, Junpeng L, Yuhua G, Yinbing B (2017) Effects of incorporating rice straw in *Lentinula edodes* cultivation substrates on mycelial growth and selected fruit body parameters. *Acta Edulis Fungi* 24:30–34. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173346112>.

Silva, M. M. e (2011). Cultivo de cogumelos comestíveis pela técnica Jun-Cao. Available at: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-99VHT3>

Silva, E.M., Machuca, A., Milagres, A.M.F., (2005). Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 283–288. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01669.x>

Stamets, P. (2011). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Clarkson Potter/Ten Speed.

Suwannarach, N., Kumla, J., Zhao, Y., and Kakumyan, P. (2022). Impact of Cultivation Substrate and Microbial Community on Improving Mushroom Productivity: A Review. *Biology* 11, 569. doi: 10.3390/biology11040569

Vane, C.H., Drage, T.C., Snape, C.E., (2003). Biodegradation of Oak (*Quercus alba*) Wood during Growth of the Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*): A Molecular Approach. *J. Agric. Food Chem.* 51, 947–956. <https://doi.org/10.1021/jf020932h>

Vieira, F. R., and Pecchia, J. A. (2022). Bacterial Community Patterns in the *Agaricus bisporus* Cultivation System, from Compost Raw Materials to Mushroom Caps. *Microb Ecol* 84, 20–32. doi: 10.1007/s00248-021-01833-5

Xu S, Wang F, Fu Y, Li D, Sun X, Li C, Li Y (2020) Effects of mixed agro-residues (corn crop waste) on lignin-degrading enzyme activities, growth, and quality of *Lentinula edodes*. *RSC advances* 10:9798-9807

Yu, H., Zhang, D., Zhang, L., Li, Q., Song, C., Shang, X., Bao, D., Tan, Q., Chen, H., Lv, B., (2022). Corncob as a Substrate for the Cultivation of *Lentinula edodes*. *Waste Biomass Valorization* 13, 929–939. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01575-y>

Zied, D. C.; Da Silva Freitas AS, M. A.; De Almeida Moreira, B. R.; Da Silva Alves, L.; Pardo-Gimenez, A., (2023). A Comparative Analysis of Biodegradation and Bioconversion of *Lentinula edodes* and Other Exotic Mushrooms. *Microorganisms*, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 897. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040897>

Zied, D. C.; Maciel, W. P.; Marques, S. C.; Da Silveira e Santos, D. M.; Rinker, D. L.; Dias, E. S., (2016). Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. *World Journal*

Zied, D. C., Pardo Giménez, A., Pardo González, J. E., Souza Dias, E., Carvalho, M. A., and Minihoni, M. T. de A. (2014). Effect of Cultivation Practices on the  $\beta$ -Glucan Content of *Agaricus subrufescens* Basidiocarps. J. Agric. Food Chem. 62, 41–49. doi: 10.1021/jf403584g.

Zied, D. C., Silva, B. D., Caitano, C. E. C., Vieira Junior, W. G., da Silva Freitas, M. A., Teixeira, P. A. G., et al. (2024). Use of Eucalyptus Charcoal Waste in the Formulation of Substrate for the Cultivation of Two Strains (LED 20/11 and LED 20/12) of *Lentinula edodes*. Agronomy 14, 811. doi: 10.3390/agronomy14040811

Zied DC, González JEP, Dias ES, Pardo-Giménez A (2017) Characteristics, Production, and Marketing of the Sun Mushroom: The New Medicinal Cultivated Mushroom, IN: Edible and Medicinal Mushrooms. John Wiley & Sons p. 361–384.

Zied DC, Minihoni MA (2009) Influência do ambiente de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* ss. *Heinemann* (*A. brasiliensis*). Energia na Agricultura 24:17–36.

Zied DC, Minihoni MTA, Kopytowski-Filho J, Andrade MCN (2010) Production of *Agaricus blazei* ss. *Heinemann* (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:1857–1863.

Zied DC, Pardo Giménez A, Pardo González JE, Dias ES, Carvalho MA, Minihoni MTA (2014) Effect of Cultivation Practices on the  $\beta$ -Glucan Content of *Agaricus subrufescens* Basidiocarps. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62:41–49.

Zied DC, Pardo JE, Tomaz RS, Miasaki CT, Pardo-Giménez A (2017b). Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process. BioMed Research International 2017:ID27