

VIVIANY VIRIATO DE FREITAS

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DO *Pleurotus*
ostreatus EM RESÍDUOS ORGÂNICOS**

Botucatu

2020

VIVIANY VIRIATO DE FREITAS

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DO *Pleurotus*
ostreatus EM RESÍDUOS ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
– Energia na Agricultura.

Orientadora: Meire Cristina Nogueira de Andrade

Botucatu

2020

V818c Viriato, Viviany
Cultivo e caracterização do perfil enzimático do *Pleurotus ostreatus* em resíduos orgânicos / Viviany Viriato. -- Botucatu, 2020
92 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientadora: Meire Cristina Nogueira de Andrade

1. Cogumelos Cultivo. 2. *Pleurotus ostreatus*. 3. Resíduos orgânicos Reaproveitamento. 4. Enzimas de fungos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DO *Pleurotus ostreatus* EM RESÍDUOS ORGÂNICOS

AUTORA: VIVIANY VIRIATO DE FREITAS

ORIENTADORA: MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE
Engenharia / Faculdade Gran Tietê

Profa. Dra. SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO
Depto. Microbiologia e Imunologia/IBB

Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI
Depto. de Ciências Químicas e Biológicas / IB/Botucatu - Unesp

Botucatu, 02 de setembro de 2020

[Handwritten signatures of the three examiners, each preceded by the initials 'PI']

Pos meus amados pais,

Pirlon e Marina,

dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Airton Viriato e Marina Viriato, pelo apoio incondicional em todas as esferas em que um filho espera ser apoiado.

A minha irmã Cristina Viriato, pelo companheirismo insubstituível e inigualável de sempre.

Ao meu companheiro de vida, Caio Simões Ballarin e a sua família, a qual considero como minha segunda família.

A Prof^{fa}. Dr^a. Meire Cristina Nogueira de Andrade, pela orientação e amizade, ensinamentos e acompanhamento de toda a pesquisa.

Aos meus amigos e amigas pelo apoio emocional imprescindível e pela ajuda nos experimentos, principalmente a Isabela Kamiguchi, Thaís Prado, Melissa Ninuma, Priscila Ninuma, Pedro Leite, Izaías Leite, Otávio Siqueira, Olivia Gomes Martins, Roseli Vicentin, Lia Harumi, César Trevelin, Guilherme Augusto Fernandes, Miguel Leopardi, Giovanna Rizzo, Luísa Fonseca, Giovana Carreira, Ana Carolina Pereira e Lucas Patudo.

A república Manga Rosa, família do coração.

A Giovana Alves e a sua querida família, pela ajuda incansável nos experimentos, não tendo palavras para expressar a gratidão.

A Prof^{fa}. Dr^a. Sandra de Moraes Gimenes Bosco e ao Prof. Dr. Eduardo Bagagli, pela amizade, por terem me orientado desde o primeiro ano de graduação, até os dias de hoje.

Ao Prof. Dr. José Raimundo de Souza Passos, pela contribuição, ensinamentos e auxílio na estatística do trabalho.

Ao Prof. Dr. Newton Goulart Madeira por todo apoio, orientação durante a graduação e amizade de sempre.

Ao Depto de Parasitologia, principalmente a Assistente Administrativa Olga Demant pelos conselhos e ensinamentos.

Ao coordenador do programa Energia na Agricultura, Marco Antonio Biaggioni, pela prestatividade de sempre.

A equipe das Fazendas Experimentais de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) pelo auxílio no experimento, em especial ao auxiliar de campo Claudemir.

As empresas parceiras na pesquisa Estância Saad, Eucatex, Fungibras, Fungi&Flora, Reino Fungi e Madeireira Murba.

A toda equipe da secretaria de pós-graduação, em especial a Adriana de Oliveira e Kátia Duarte.

A Faculdade de Ciências Agronômicas e ao Instituto de Biociências, ambos da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de Botucatu.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

“Os cogumelos nunca deixaram de me surpreender. Quanto mais os estudo, mais
soo o pouco que sei e o quanto ainda há para aprender”.

STAMETS, P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3. ed. New York: Crown Publishing Group, 1993.

RESUMO

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. é produzido em cultivo axênico comumente a partir de serragem de eucalipto. Entretanto, a serragem possui demais finalidades podendo se tornar escassa ou de difícil acesso aos produtores de cogumelos, quando não disponível em abundância na região de cultivo. Visando o aproveitamento de resíduos orgânicos disponíveis na cidade de Botucatu/SP e fontes alternativas para a produção do cogumelo, foram utilizadas diferentes formulações com casca de eucalipto, serragem de peroba do Norte e composto exaurido de *P. ostreatus*. Foram formulados treze tratamentos à base de serragem de eucalipto e das diferentes concentrações dos resíduos orgânicos, sendo 100%, 75%, 50% e 25% de cada resíduo, combinados ou não de forma complementar com a serragem de eucalipto, tendo como grupo controle 100% de serragem de eucalipto. Os tratamentos obtiveram dez repetições e foram utilizados para produção do meio de cultura (Experimento 1) e para a produção de cogumelos (Experimento 2). No experimento 1 constatou-se que o diâmetro micelial dos tratamentos à base de 100% de casca de eucalipto, 75% de composto exaurido + 25% de serragem de eucalipto e 25% de composto exaurido + 75% de serragem de eucalipto, obtiveram maior diâmetro micelial com 81,06, 78,99 e 78,84 mm, respectivamente, em relação ao grupo controle, 72,99 mm. Já no experimento 2 foi constatado que todos os tratamentos possuem eficiência biológica equivalente ao grupo controle (51,75%), com exceção do tratamento com 100% de composto exaurido (18,09%), o qual obteve menor produtividade. Entretanto, os resíduos orgânicos avaliados, casca de eucalipto, serragem de peroba do Norte e composto exaurido de *P. ostreatus*, podem ser aproveitados no cultivo de *P. ostreatus* em substituição ao substrato convencional (à base de 100% de serragem de eucalipto), com exceção do composto exaurido na sua forma integral (100%), possibilitando um destino ecológico para estes descartes e produzindo alimento altamente nutritivo. O perfil enzimático do fungo também foi caracterizado em relação a produção de Lacase, Manganês Peroxidase e Versátil Peroxidase nos mesmos treze tratamentos. Para isto, foram separadas amostras de cada um dos tratamentos, as quais são chamadas de extratos brutos. Estes, foram assepticamente unidos ao meio de cultura LN-AS (*low-nitrogen asparagine-succinate*), conhecido como meio mínimo. A mesma linhagem do *P. ostreatus* (linhagem SB) foi inoculada nos frascos, os quais foram incubados a 28°C em estufa microbiológica. Foram aliqüotadas amostras a cada três dias, sendo estes, 3, 6, 10, 13, 17 e 20 dias de incubação, totalizando seis amostras para cada substrato. A partir de então, foi calculada a concentração de proteínas através do coeficiente de extinção molar, o qual foi determinado por uma curva padrão confeccionada com uma solução de albumina de soro bovino, diluída em concentrações entre 500 e 2500 µg/mL, respeitando a lei de Lambert-Beer. Assim, pode-se calcular a atividade específica das enzimas, correlacionando-se a concentração de proteínas com a atividade enzimática. Somente a enzima Lacase obteve produtividade, com maior produção no décimo sétimo dia de incubação para todos os tratamentos. As outras duas enzimas não obtiveram produção.

Palavras-chave: Cogumelo ostra. Aproveitamento de resíduos. Meio ambiente. Atividade Enzimática.

ABSTRACT

The edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. is produced in axenic cultivation generally from eucalyptus sawdust. However, the sawdust has other purposes and may become scarce or difficult access for mushroom producers when it is not abundantly available in the cultivation area. Aiming at the use of available organic residues in the region of Botucatu/SP and alternative sources to the mushroom production, different formulations with eucalyptus bark, northern peroba sawdust and spent mushroom substrate were used, being these residues highly available in the region. Thirteen treatments were formulated from eucalyptus sawdust with different proportions of organic residues, being 100%, 75% 50% and 25% of each organic residue, combined or not with the eucalyptus sawdust, and the control group with 100% of eucalyptus sawdust. The treatments were used to produce the culture medium (Experiment 1) and to produce mushrooms (Experiment 2) containing ten replicates each. In experiment 1 was found that the mycelial diameter of the treatments based on 100% eucalyptus bark, 75% spent mushroom substrate + 25% eucalyptus sawdust and 25% spent compost + 75% eucalyptus sawdust, obtained larger mycelial diameter with 81,06, 78,99 e 78,84 mm, respectively, in relation to the control group, 72,99mm. In experiment 2 was found that all treatments have biological efficiency equivalent to the control group (51,75%), except for the treatment with 100% spent mushroom substrate (18,09%), which obtained the least productivity. However, the evaluated organic residues, eucalyptus bark, northern peroba sawdust and spent mushroom compost can be used in the *P. ostreatus* cultivation replacing the conventional substrate (100% of eucalyptus sawdust), except the spent mushroom substrate in its entirety (100%), enabling an ecological destination to these residues and producing a highly nutritional food. The enzymatic profile of the fungus was also characterized in relation to the production of Lacase, Manganese Peroxidase and Versatile Peroxidase in the same thirteen treatments. For this, samples from each of the treatments were separated, which are called crude extracts. These were aseptically joined to the LN-AS (low-nitrogen asparagine-succinate) culture medium, known as the minimal medium. The same strain of *P. ostreatus* (strain SB) was inoculated in the flasks, which were incubated at 28°C in a microbiological incubator. Samples were aliquoted every three days, these being 3, 6, 10, 13, 17 and 20 days of incubation, totaling six samples for each substrate. From then on, the protein concentration was calculated using the molar extinction coefficient, which was determined by a standard curve made with a solution of bovine serum albumin, diluted in concentrations between 500 and 2500 ug/mL, respecting the law Lambert-Beer. Thus, one can calculate the specific activity of the enzymes, correlating the protein concentration with the enzymatic activity. Only the enzyme Lacase obtained productivity, with higher production on the seventeenth day of incubation for all treatments. The other two enzymes were unsuccessful.

Keywords: Oyster mushroom. Use of waste. Environment. Enzymatic Activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações dos tratamentos em base seca.....	42
Tabela 2 – Análise química inicial dos substratos antes da produção de cogumelos.....	59
Tabela 3 – Análise química final dos substratos após a produção de cogumelos.....	60
Tabela 4 – Formulações dos tratamentos em base seca.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azino-bis-etilbentiazoline
BCA	ácido bicinconínico
Lac	Lacase
LN-AS	<i>low-nitrogen asparagine-succinate</i>
MnP	Manganês Peroxidase
PFNM's	Produtos florestais não madeireiros
SA	Substrato ágar
SP	São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VP	Versátil Peroxidase

LISTA DE SÍMBOLOS

N	Nitrogênio
C	Carbono
P	Fósforo
K	Potássio
Mg	Magnésio
g	Gramas
Kg	Kilogramas
%	Porcentagem
nkat	Nanokat
mL	Mililitros
mM	Milimolar
μmols	Micromols

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	23
CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO DO COGUMELO <i>Pleurotus ostreatus</i> EM SUBSTRATOS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS.....	37
1.1 INTRODUÇÃO.....	37
1.2 OBJETIVOS.....	39
1.2.1 Gerais.....	39
1.2.2 Específicos.....	39
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
1.3.1 Formulação dos tratamentos e delineamento experimental.....	40
1.3.2 Linhagem de <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
1.3.3 Proveniência e preparo dos substratos.....	43
1.3.4 Análise química dos substratos.....	48
1.3.5 Experimento 1: Crescimento in vitro de <i>Pleurotus ostreatus</i> em meios de cultura à base de resíduos orgânicos.....	49
1.3.6 Experimento 2: Produção de <i>Pleurotus ostreatus</i> em substratos à base de resíduos orgânicos.....	53
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
1.4.1 Análise química do substrato.....	57
1.4.2 Crescimento micelial.....	61
1.4.3 Produção de cogumelos.....	66
1.5 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DE <i>Pleurotus ostreatus</i> CULTIVADO NA PRESENÇA DE SUBSTRATOS PREPARADOS A PARTIR DE DIFERENTES RESÍDUOS ORGÂNICOS	77
2.1 INTRODUÇÃO.....	77
2.2 OBJETIVOS.....	77
2.2.1 Gerais.....	77
2.2.2 Específicos.....	78
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	78

2.3.1	Produção enzimática por <i>Pleurotus ostreatus</i>	78
2.3.2	Preparação dos meios de cultivo.....	79
2.3.3	Determinação da atividade de Lacase.....	80
2.3.4	Determinação da atividade de Manganês Peroxidase.....	81
2.3.5	Determinação da atividade de Versátil Peroxidase.....	81
2.3.6	Concentração de proteína.....	82
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
2.4.1	Lacase.....	82
2.4.2	Manganês Peroxidase.....	87
2.4.3	Versátil Peroxidase.....	88
2.5	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
	REFERÊNCIAS	92

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de cogumelos representa a produção de alimentos saudáveis e ricos em nutrientes, tais como proteínas, aminoácidos e vitaminas. Não o bastante, o cultivo de cogumelos também representa a produção de produtos medicinais efetivos na saúde humana, reduz o impacto ambiental originado do potencial de conversão de materiais poluentes ao meio ambiente em produtos alimentícios e por fim, origina oportunidades de emprego e desenvolvimento do setor rural (CHANG e WASSER, 2017).

O cogumelo *Pleurotus ostreatus*, popularmente conhecido como Shimeji, é considerado como o mais fácil de cultivar e também, o mais econômico, sendo produzido em grande escala mundialmente e ocupando o segundo lugar da produção mundial (KAPAHI, 2018).

A biomassa vegetal, a qual é degradada pelos fungos através de suas atividades enzimáticas, é considerada como a biomassa renovável mais abundante da Terra, já sendo amplamente utilizada na agricultura e indústria devido a produção de alimentos, produtos bioquímicos, biocombustíveis e outros produtos de base biológica (MÄKËLA, et al., 2014).

Devido a capacidade de ser cultivado em diversos resíduos agrícolas, esta pesquisa objetivou avaliar o crescimento micelial e a produção do cogumelo *P. ostreatus* em resíduos orgânicos (casca de eucalipto, serragem de peroba do Norte e composto exaurido de cogumelos) e também, caracterizar o perfil enzimático do fungo *P. ostreatus* quanto a sua capacidade de produzir Lacase, Manganês Peroxidase e Versátil Peroxidase.

REVISÃO DE LITERATURA

Produção de cogumelos no Brasil e no mundo

Considerando que a população mundial em 1978 representava 4.2 bilhões e que em 2013 chegou a 7.1 bilhões de pessoas, houve um aumento de apenas 1.7x, enquanto que, a produção mundial de cogumelos aumentou no mesmo período mais de 30x, sendo 1 bilhão de kg de cogumelos produzidos em 1978 e 34 bilhões de kg em 2013. Isso representa que o aumento da produção de cogumelos teve um rápido avanço e que o consumo per capita é de aproximadamente 5kg por ano (ROYSE et al., 2017).

Os cogumelos mais cultivados no mundo são *Lentinula*, contribuindo com cerca de 22% da produção mundial, *Pleurotus* spp. em segundo lugar, com cerca de 19% da produção, *Auricularia*, contribui com aproximadamente de 17%, *Agaricus*, responsável por 15%, *Flamulina* com 11%, *Volvariella* com 5% e outros gêneros com 10% da produção mundial (ROYSE et al., 2017).

A China é o país que representa a maior produtividade de cogumelos, com uma produção de aproximadamente 30 bilhões de quilogramas de cogumelos em 2013, representando 87% da produção mundial, seguida pelo resto da Ásia, com 1.3% da produção, União Europeia com 1.1%, Américas com 1% e outros países 1% (ROYSE et al., 2017).

Na África, dois terços da população depende diretamente de produtos florestais para sobrevivência ou como fonte de renda, derivada de um amplo alcance de produtos florestais não madeireiros (PFNMs), incluindo-se os cogumelos comestíveis (DEGREEF et al., 2016). Sendo uma das culturas cultivadas comercialmente mais importantes e considerada como agricultura sustentável, o cultivo de cogumelos é um exemplo de desenvolvimento econômico rural, auxilia no combate a fome em diversos países em desenvolvimento e rejuvenesce as economias locais (KAPAH, 2018).

Em Bangladesh, na Ásia, uma das soluções viáveis para o desemprego no país é o florescimento do setor de cultivo de cogumelos, no qual os agricultores podem produzir com baixas tecnologias de produção e baixos investimentos,

proporcionando oportunidades de emprego nas áreas rurais e renda para grupos desfavorecidos e pequenas propriedades familiares (EASIN et al., 2017).

Segundo Gomes et al. (2016) o estado que mais se encontra produtores de cogumelos no Brasil é o estado de São Paulo. Em 2016 foi realizado um levantamento, o qual apontou que haviam 505 produtores distribuídos em 93 municípios do estado, os quais foram responsáveis por produzir um total de 1.062 toneladas de cogumelos por mês, gerando aproximadamente 5.000 empregos diretos.

O cogumelo *Pleurotus ostreatus*

Os fungos têm papel indispensável na degradação da madeira na natureza, em particular, os pertencentes aos filos *Basidiomycota* e *Ascomycota*, incluindo espécies que convertem eficientemente os compostos presentes na parede celular da madeira (HILDÉN e MÄKELÄ, 2018). O cogumelo *Pleurotus ostreatus* é pertencente ao filo *Basidiomycota*, família *Pleurotaceae*, sendo originado na China, entretanto, é distribuído no mundo todo atualmente (PISKA et al., 2017).

Há muitos anos, culturas humanas fazem uso de cogumelos do gênero *Pleurotus*, também conhecido como "cogumelos ostra", representando um dos grupos de cogumelos mais produzidos e consumidos no mundo devido às suas incríveis propriedades e inúmeras formas de cultivo (BONONI et al., 1999). Além de suas propriedades nutricionais, possuem também propriedades medicinais, com efeitos benéficos promotores à saúde (MASRI et al., 2017). Este gênero possui aproximadamente 40 espécies, as quais são comumente comestíveis e disponíveis na natureza (VALVERDE, 2015).

O cogumelo *P. ostreatus* começou a ser cultivado no Brasil de modo incipiente na década de 70, a partir de linhagens introduzidas da Europa e da Ásia, em substratos a base de gramíneas, bagaço de cana de açúcar ou serragem, mas somente na década de 80 é que houve o aumento de sua produção e consumo, devido a popularização do cogumelo (BONONI et al., 1995). As técnicas de cultivo deste cogumelo foram melhoradas e atualmente, são os cogumelos mais fáceis de se cultivar, ocupando o segundo lugar com produção máxima por todo o mundo (KAPAH, 2018).

O fungo é considerado um decompositor primário, o qual degrada hemicelulose, lignina e outros componentes da matéria vegetal (GRIMM e WÖSTEN, 2018), portanto, tem um papel significativo no gerenciamento de resíduos agrícolas que se tornaram um problema crítico para descarte (YAMUCHI et al., 2019). Outro benefício é que, de acordo com Kapahi (2018), os “cogumelos ostra” também apresentam características desejáveis na produção, tais como, alta resistência a pragas, alta eficiência biológica e rendimento e se adaptam facilmente a fatores ambientais.

A tecnologia envolvida no processo de produção deste cogumelo é muito simples e de baixo custo, baseando-se em um tipo de agronegócio lucrativo que proporciona um crescimento consistente e alta eficiência biológica (KHAN et al., 2017). A biotecnologia existente no cultivo envolve práticas essenciais, tais como, isolamento, mantimento das linhagens, elaboração do inóculo, seleção dos substratos e produção dos corpos de frutificação (VALENCIA DE ITA et al., 2018).

Os sistemas de cultivo de cogumelos baseiam-se em substratos em condições não assépticas (cultivo pasteurizado) ou em substratos submetidos à esterilização (cultivo axênico) (EIRA, 2000). Os substratos esterilizados isentam a presença de micro-organismos competidores, sendo ideal para o cultivo de cogumelos comestíveis, embora, o processo seja mais caro para cultivo em larga escala (CHANG e WASSER, 2017). No cultivo axênico, os substratos lignocelulósicos são esterilizados e os inóculos adequados são colocados assepticamente para a corrida do micélio. A espécie *P. ostreatus* produz micélio de coloração branca, por isso é chamado popularmente de “fungo de podridão branca”, a qual leva geralmente quinze dias para colonização do substrato (KAPAH, 2018). Após a completa colonização, em condições ambientais adequadas, a germinação natural ocorre e é seguida pela formação dos corpos de frutificação (CHANG e WASSER, 2017).

Substratos alternativos na produção de *Pleurotus ostreatus*

Muitos resíduos orgânicos vêm sendo testados para a produção de cogumelos comestíveis a fim de serem reaproveitados. Sales-Campos et al. (2010) testaram alguns resíduos amazônicos do setor madeireiro e agroindustrial para o cultivo de *P. ostreatus*, sendo eles, serragem de marupá (*Amarouba amara*), pau de

balsa (*Ochroma pyramidale*), estipe de pupunheira (*Bactris gasipaes*) e bagaço de cana de açúcar, os quais apresentaram eficiência biológica alta com 94, 64,6, 125,6 e 99,8% respectivamente, dando destaque para o estipe de pupunheira com mais de 100% de eficiência biológica.

No quadro 1 encontram-se alguns trabalhos relevantes sobre a produção do cogumelo comestível *P. ostreatus* em substratos alternativos no período de 2010 a 2019.

Quadro 1 - Substratos alternativos já avaliados na produção de *Pleurotus ostreatus* no período de 2010 a 2019

Substrato	Referência
Serragem de marupá, pau de balsa, estipe de pupunheira e bagaço de cana de açúcar	Sales-Campos et al. (2010)
Cachos vazios de frutos, cascas do dendezeiro, cascas de <i>Acacia mangium</i> e a gramínea <i>Imperata cylindrica</i>	Rizki e Tamai (2011)
Cascas de café, serragem de eucalipto e cascas de eucalipto	Luz et al. (2012)
Cultivares de bananeira	Carvalho et al. (2012)
Palha de arroz, palha de trigo, serragem de Alder (<i>Alnus nepalensis</i>), bagaço de cana de açúcar e jornal	Sharma et al. (2013)
Papéis reaproveitados	Fernandes et al. (2014)
Cachos vazios de frutos do dendezeiro	Marlina et al. (2015)
<i>Brachiaria decumbens</i> , palha de cana de açúcar, <i>Brachiaria brizantha</i> e palha de trigo.	Vieira e Andrade (2016)
Palhas de gramínea e raspas de madeira	Masevhe et al. (2016)
Resíduos do algodoeiro	Khan et al. (2017)
Palha de grão de bico, cascas de sementes de algodão, extrato de azeitona, extrato de semente de girassol e açúcar extraído de beterrabas	Atila (2017)
Sobras de alimento	Martins et al. (2018)
Bambu mossô	Yamauchi et al. (2019)
Resíduos do cogumelo <i>Lentinula edodes</i>	Silva et al. (2019)

Rizki e Tamai (2011) formularam substratos a partir de alguns resíduos lignocelulósicos para a produção de *P. ostreatus*, incluindo cachos vazios de frutos

do dendezeiro (*Elaeis guineensis*), cascas do dendezeiro, cascas de *Acacia mangium* e a gramínea *Imperata cylindrica* (*Congograss*). Utilizaram folhas do dendezeiro como fonte de suplementação e obtiveram como resultado as seguintes eficiências biológicas: tratamento a base de *Congograss* (70,5%), seguido pelo tratamento a base de cachos vazios de dendezeiro (56,6%), cascas do dendezeiro (40,9%) e cascas de *Acacia mangium* (1,1%).

Luz et al. (2012) prepararam substratos para o cultivo de duas linhagens de *P. ostreatus* (PLO 2 e PLO 6) em cascas de café, serragem de eucalipto e cascas de eucalipto. Para cada resíduo obtiveram-se dois tratamentos, um com 100% do resíduo e outro com 80% do resíduo + 20% de farelo de arroz como suplemento. Para a linhagem PLO 2, todos os tratamentos suplementados obtiveram as melhores eficiências biológicas, sendo a casca de eucalipto (~80%), seguido pelo tratamento a base de casca de café (~70%) e serragem de eucalipto (~65%). Para a linhagem PLO 6, os tratamentos também obtiveram melhores produtividades quando suplementados, sendo a casca de café (~93%) de eficiência biológica, seguido pela casca de eucalipto (~90%) e serragem de eucalipto (~90%).

Carvalho et al. (2012) avaliaram a produção do cogumelo *P. ostreatus*, em quatro cultivares de bananeira (Pelipita, Thap Maeo, Prata Anã e Caipira), em três tratamentos para cada cultivar, sendo 100% folha, 100% pseudocaule e 50% folha + 50% pseudocaule. Concluíram que os cultivares nos tratamentos com 100% de pseudocaule obtiveram as melhores produtividades, com exceção da cultivar Prata Anã, a qual obteve eficiência biológica de ~27%. As cultivares Pelipita, Thap Maeo e Caipira obtiveram eficiências biológicas em torno de 45, 63 e 35%, respectivamente.

Sharma et al. (2013) utilizaram como controle na produção de *P. ostreatus* 100% de palha de arroz (T1), substrato mais utilizado no Nepal para a produção do cogumelo. Em adição, avaliaram alguns resíduos disponíveis na região nas seguintes formulações: 50% de palha de arroz + 50% de palha de trigo (T2), 50% de palha de arroz + 50% de jornal (T3), 100% de bagaço de cana de açúcar (T4) e 100% de serragem de Alder (*Alnus nepalensis*) (T5). Os tratamentos foram suplementados com 10% de farelo de arroz, com exceção do grupo controle. Como resultado, a melhor eficiência biológica ocorreu no grupo controle com 95,46%, seguido pelos tratamentos 2 e 3, os quais não diferiram estatisticamente, com 77,32

e 74,89%, respectivamente, e por último, os tratamentos 4 e 5, os quais também não diferiram estatisticamente, com 67,04 e 61,96%, respectivamente.

Fernandes et al. (2014) realizaram o cultivo de *P. ostreatus* em três tratamentos a base de papéis rascunhos já utilizados anteriormente (100% de papéis em branco (T1) e 100% de papéis impressos (T2)), como forma de reciclagem destes resíduos. Concluíram que os cogumelos produzidos a partir dos resíduos apresentam características químicas e nutricionais similares em relação aos cogumelos do cultivo convencional (100% de palha de aveia, neste caso, (T3)), podendo ser utilizados na produção comercial do cogumelo.

Marlina, et al. (2015) verificaram o desenvolvimento e a produtividade do “cogumelo ostra” em substratos a base de cachos vazios de frutos do dendezeiro, com o objetivo de dar uma alternativa para este resíduo, o qual é produzido em altas quantidades pelas indústrias de óleos de palma na Indonésia. Propuseram quatro tratamentos com as formulações: (T1 - 85% de serragem + 15% de farelo de arroz, grupo controle; T2 - 75% de cachos vazios do dendezeiro + 25% de farelo de arroz; T3 - 85% de cachos vazios do dendezeiro + 15% de farelo de arroz e T4 – 95% de cachos vazios do dendezeiro + 5% de farelo de arroz). Como resultado, os substratos com o resíduo obtiveram melhores produtividades em relação ao substrato controle, com o seguinte rendimento no final da produção T1 - 95,9g; T2 - 392,8g; T3 - 398,13g e T4 - 436,6g.

Vieira e Andrade (2016) testaram diferentes formulações no cultivo de *P. ostreatus* a partir de *Brachiaria decumbens* (T1), palha de cana de açúcar (T2), *Brachiaria brizantha* (T3) e palha de trigo (T4). Adicionaram bagaço de cana de açúcar, com e sem suplementação de farelo de trigo para obterem taxa de relação C/N de 60:1 e os não suplementados com relação C/N de 90/1. Os tratamentos não suplementados (C/N - 90:1) obtiveram a maior média de eficiência biológica no T2 (84,92%), sendo que, os demais não diferem estatisticamente. Com relação aos tratamentos suplementados (C/N – 60:1), a maior eficiência biológica encontra-se no T3 (123,9%) e a menor encontra-se no T4 (65,57%), os tratamentos 1 e 2 não diferem do T3 e T4. Os autores concluem que os tratamentos suplementados aumentam o rendimento e eficiência biológica dos cogumelos.

Masevhe et al. (2016) avaliaram na África do Sul, a produção de massa fresca do cogumelo ostra em substratos a base de palhas de gramínea (T2) e raspas de madeira (T3), como substituição ao substrato convencional utilizado, palha de trigo (T1). A massa fresca foi obtida através da soma dos pesos dos basidiomas em cada tratamento, obtendo como resultado T1 (4113g), T2 (3944g) e T3 (361g). Os autores concluem que apenas o tratamento 2, palhas de gramínea, é eficiente e pode ser substituir a palha de trigo no cultivo de *P. ostreatus*.

Khan et al. (2017) testaram resíduos do algodoeiro, cultivo comum na Ásia, em três tratamentos distintos: 95% do resíduo + 5% de farelo de trigo, 95% do resíduo + farelo de arroz e 95% do resíduo + 5% de farinha de grão de bico e 100% do resíduo de algodoeiro. A eficiência biológica foi calculada e obteve como resultado 46,33, 37, 32,33 e 30% respectivamente, sendo a melhor suplementação encontrada no farelo de trigo.

Atila (2017) avaliaram a produção do “cogumelo ostra” em cinco tratamentos a base de palha de grão-de-bico, substrato controle sem suplementação (T1), suplementada com 20% dos seguintes resíduos abundantes na Turquia: cascas de sementes de algodão (T2), extratos de azeitona (T3), extratos de sementes de girassol (T4) e açúcar extraído de beterrabas (T5), obtendo eficiência biológica de 68,3, 99,8, 76,5, 93,1, 55,3%, respectivamente. Concluíram que com exceção do resíduo açúcar extraído de beterrabas, os demais podem ser utilizados como fontes de suplementação para a produção do cogumelo.

Martins et al. (2018) utilizaram bagaço de cana de açúcar e serragem de eucalipto (1:1) no cultivo de *P. ostreatus*, verificando a possibilidade de utilizar sobras de alimentos nas proporções de 0% (T1); 5% (T2); 10% (T3); 15% (T4) e 20% (T5), em substituição ao farelo de trigo. Calcularam a massa de basidiomas frescos de cada tratamento e obtiveram os seguintes resultados: T1 (333,6g); T2 (274,6g); T3 (217,9g); T4 (128,9g) e T5 (113,8g). Concluíram que quanto maior for a quantidade do composto de sobra de alimentos no substrato, menor é a produtividade, não sendo suplementos eficientes para a produção do cogumelo.

Yamauchi et al. (2019) cultivaram o cogumelo ostra em serragem de bambu mossô, fermentada durante dois meses, com o acréscimo de fontes nutricionais. Concluíram que o substrato pode substituir o convencional, serragem de conífera,

neste caso, não alterando as composições minerais dos basidiomas e possuindo maior quantidade de aminoácidos livres em relação ao grupo controle.

Silva et al. (2019) utilizaram resíduos do cogumelo *Lentinula edodes* como substituição ao farelo de soja para a produção de *P. ostreatus*, nas proporções (0, 5, 10, 15 e 20%). Concluíram que a eficiência biológica no grupo controle, com 20% de farelo de soja e 0% do resíduo de cogumelos obteve a média mais alta (20,1%). Assim, os substratos suplementados com a pós colheita do cogumelo *L. edodes* não foram eficientes na produção de *P. ostreatus*.

Casca de eucalipto

O gênero *Eucalyptus* foi originado na Austrália, sendo introduzido no Brasil no século XIX. Devido às favoráveis características edafoclimáticas ao desenvolvimento do eucalipto no Brasil, a importância econômica e social vem aumentando desde o século passado (SANTAROSA et al., 2014). Estima-se que a produção de eucalipto no Brasil é de aproximadamente 7,4 milhões de hectares, representando 37% da produção mundial (ELLI et al., 2019). Muitos estudos têm sido realizados para verificação do potencial produtivo das florestas brasileiras na produção de eucalipto, entretanto, sabe-se que do ano de 1970 até 2015 a produtividade teve um aumento de 4 vezes mais (BINKLEY et al., 2017).

Dentre as principais utilizações do eucalipto, destacam-se a produção de energia, madeira, celulose e papel, chapas de fibras ou partículas e lâminas e compensados (SANTAROSA et al., 2014).

Na produção de energia, destaca-se o uso de cascas de eucalipto através da carbonização e queima para a produção de carvão vegetal, principalmente para indústrias siderúrgicas e uso residencial urbano e rural (JUIZO et al., 2017). Em contrapartida, a casca de eucalipto representa 8% da biomassa da árvore, contendo um número expressivo de nutrientes que se mantêm retidos por dentro da casca, sendo, 18% de N, 19% de P, 21% de K, 60% de Ca e 48% de Mg (MARTINS et al., 2019). Isto é um exemplo de que os nutrientes contidos na casca de eucalipto podem ser melhor aproveitados de outras formas que não a queima, como por exemplo, o cultivo de cogumelos.

Como já mencionado anteriormente (item 2.3), Luz et al. (2012) utilizaram substratos para o cultivo de duas linhagens de *P. ostreatus* a partir de cascas de café, serragem de eucalipto e cascas de eucalipto. Os tratamentos a base de casca de eucalipto obtiveram altas eficiências biológicas com aproximadamente 80 e 90% de eficiência biológica, sendo eficientes na produção do cogumelo.

Da Luz et al. (2013) avaliaram a produção de *P. ostreatus* em cascas de eucalipto e resíduos de biodiesel produzido a partir da planta *Jatropha curcas*, sendo, somente o resíduo (T1); resíduo + 10 (g/100g) de serragem de eucalipto (T2), resíduo + 10 (g/100g) de casca de eucalipto (T3) e resíduo + 30 (g/100g) de cascas de café + 30 (g/100g) de farelo de arroz (T4), para balancear a taxa de carbono e nitrogênio. A maior eficiência biológica (~110%) foi encontrada com 33 dias de produção, no tratamento 3, a base do resíduo + casca de eucalipto, diferindo do grupo controle (T1) com ~40% de eficiência biológica.

Composto exaurido

Embora a tecnologia de cultivo de cogumelos seja ambientalmente sustentável, a produção gera grandes volumes de resíduos orgânicos, os quais são chamados de composto exaurido de cogumelos (ATILA, 2017). Este resíduo orgânico contém micélio de cogumelos e altos níveis de nutrientes residuais, tais como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (MENG et al., 2018).

De acordo com Grimm e Wösten (2018) a produção de cogumelos está crescendo cada vez mais, e conseqüentemente, a produção de composto exaurido também, podendo exceder a quantia de 1 trilhão de quilogramas por ano. Os autores também acreditam que o composto exaurido pode ser utilizado de forma circular através da extração enzimática, produção de mais um ou dois ciclos de cogumelos, fertilizante, produção de alimentos e produção de biocombustível.

Zhu et al. (2013) pontua que a maioria do composto exaurido produzido a partir do cultivo de cogumelos é queimado para a produção de energia, o que não é econômico e muito menos ecologicamente correto. Entretanto, este composto tem sido avaliado para mais fluxos de produção de cogumelos (GIMÉNEZ e GONZÁLES, 2009; FAVARA et al., 2014; ASRAFHI et al., 2014 e SIQUEIRA et al., 2016).

Giménez e Gonzáles (2009) avaliaram o cultivo de *P. ostreatus* em misturas de composto exaurido de *P. ostreatus* e composto exaurido de *Agaricus bisporus* e obtiveram bons resultados de produtividades nas proporções de (9:1) e (8:2), com produtividades de 36,0 e 39,7 kg/100kg de substrato, respectivamente.

De acordo com Favara et al. (2014) o composto exaurido do cogumelo *Agaricus blazei* é considerado como um substrato viável para utilização na produção de novos ciclos de cultivo, tendo em vista que não houve diferença entre a massa, número de cogumelos e eficiência biológica, bem como, a composição nutricional dos cogumelos produzidos, destacando-se a eficiência biológica com 47,56% no substrato tradicional (bagaço de cana e *Brachiaria*) e 43,37% no composto exaurido.

Asrafhi et al. (2014) avaliaram a eficiência biológica de *P. ostreatus* em diversas proporções de serragem e composto exaurido de cogumelos com ou sem suplementação de farelo de trigo. Concluíram que a melhor eficiência biológica (107,5%) encontra-se no substrato a base de 60% de serragem, 20% de composto exaurido e 20% de farelo de trigo, sendo eficiente para a produção do cogumelo.

Siqueira et al. (2016) avaliaram a produção de *P. ostreatus* em composto exaurido de *P. ostreatus* e concluíram que o uso do resíduo é viável até a quantia de 26%, combinado de forma suplementar com o substrato tradicional (palha de cana de açúcar, neste caso), não alterando a produtividade e valor nutricional dos cogumelos.

Serragem de peroba do Norte

A peroba do Norte, cientificamente conhecida como *Goupia glabra*, família Goupiaceae, possui também outros nomes populares, tais como, cupiúba no estado do Pará, cutiúba no Maranhão, bragantina, perobinha, dentre outros. (GURGEL et al., 2015). A espécie destaca-se por seu forte potencial de aplicação devido a ser facilmente trabalhada (SALES et al., 2011).

No Brasil, a árvore de *Goupia glabra* ocorre principalmente na região amazônica dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia e também, no estado do Mato Grosso (SALES et al., 2011).

Algumas das utilizações da madeira de *Goupia glabra* podem ser na construção civil (fabricação de vigas, caibros, tábuas, portas e janelas, entre outros), na indústria moveleira, na produção de corantes e cosméticos (GURGEL et al., 2015). Outra utilização da madeira de *Goupia glabra* foi na produção de carvão vegetal através da carbonização, o qual demonstrou boas propriedades físicas e químicas, sendo indicado como fonte de energia (NUMAZAWA, 1990).

Atividade enzimática de fungos de podridão branca

Os fungos são capazes de esgotar os nutrientes de um meio devido a degradação dos mesmos pela produção de diversas enzimas, dentre estas, as ligninolíticas, que fazem parte dos processos metabólicos secundários (KAMITSUJI et al., 2004).

Um dos grupos de fungos mais eficientes na degradação de material orgânico vegetal pertence aos Basidiomicetos, sendo caracterizado como fungos de podridão branca, os quais são capazes de degradar os três componentes lignocelulósicos, sendo estes, celulose, hemicelulose e lignina (CORREIA, et al., 2011).

Para a degradação da complexa estrutura da parede celular vegetal, é necessário que os fungos produzam uma série de enzimas extracelulares oxidativas ou hidrolíticas (HILDÉN e MÄKELÄ, 2018).

Enzimas extracelulares oxidativas não específicas são altamente necessárias na degradação da estrutura irregular dos polímeros aromáticos da lignina, sendo estas, chamadas peroxidases modificadoras de lignina, exclusivamente encontradas em fungos de podridão branca. Estas enzimas são hemiperoxidases e requerem H_2O_2 como um oxidante, sendo conhecidas por: Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e Versátil Peroxidase (VP) (MÄKELÄ, et al., 2014).

Lacase

As lacases - Lac – (EC 1.10.3.2) são oxidases extracelulares produzidas por quase todos os basidiomicetos degradadores de material lignocelulósico (CORREIA et al., 2011).

A produção de lacase por fungos é influenciada pelas condições de cultivo, como, natureza e concentração de carbono e nitrogênio, composição do meio de cultura, pH, temperatura, entre outros (EDAE e ALEMU, 2017).

A temperatura é considerada um fator crucial para o crescimento de micro-organismos, influenciando em seu metabolismo, e consequentemente, a produção de biomassa micelial, proteínas e de lacase (EDAE e ALEMU, 2017).

Manganês Peroxidase

As Manganês Peroxidases – MnP - (EC 1.11.1.13) são enzimas ligninolíticas extracelulares produzidas por fungos de podridão branca. As MnP's junto com as Lacs e as LiP's têm papel ativo no processo de despolimerização da lignina (SALAME et al., 2013).

São enzimas dependentes de Manganês, apresentando um potencial oxidativo que separa elétrons de estrutura fenólicas (CORREIA et al., 2011).

Versátil Peroxidase

As Versátil Peroxidases – VP - (EC 1.11.1.16), são enzimas pertencentes à classe das peroxidases, sendo secretadas por muitos fungos do grupo dos Basidiomicetos. Estas enzimas não são específicas para Manganês (II) como as Manganês peroxidases, porém, podem oxidar compostos típicos de Lignina peroxidases na ausência de manganês (CORREIA et al, 2011).

Segundo Kamitsuji et al. (2004), a versátil peroxidase se classifica como uma isozima de Manganês peroxidase, sendo uma enzima híbrida do tipo MnP e LiP.

CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO DO COGUMELO *Pleurotus ostreatus* EM SUBSTRATOS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

1.1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos são reconhecidos como um dos mais importantes suplementos alimentares devido ao seu papel considerável na saúde humana, como fonte nutricional (vitaminas, sais minerais, proteínas, aminoácidos), através de seus compostos bioativos (polissacarídeos, fibras, terpenos, polifenóis, entre outros), e também por seus aspectos medicinais (propriedades antitumorais, antidiabéticas, antimicrobianas, dentre outras) (GANESAN e XU, 2018). Além destes aspectos, os cogumelos também se destacam nutricionalmente devido a serem a única fonte de alimento não animal que fornece vitamina D, o que os torna altamente relevantes em dietas vegetarianas (VALVERDE, 2015), considerando que existam aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas no mundo que optam por seguirem dietas vegetarianas (NESLEK e FORESTEL, 2020).

Os cogumelos geram impacto global na qualidade da saúde, alimentação, meio-ambiente, crescimento econômico e mudanças sociais, gerando renda e oportunidades de empregos, principalmente em áreas rurais de países em desenvolvimento (CHANG e WASSER, 2017).

O cultivo comercial dos cogumelos essencialmente transforma resíduos agrícolas em um alimento único e altamente nutritivo, sendo uma forma economicamente viável e vantajosa para obtenção de proteínas, necessitando de pouco espaço de terra, clima temperado, umidade alta e resíduos de materiais orgânicos (DEGREEF et al., 2016).

Os materiais orgânicos dos quais os cogumelos obtêm sua nutrição são chamados de substratos (CHANG e WASSER, 2017), os quais são degradados pelo fungo, sendo esta, uma maneira muito útil para eliminar resíduos agrícolas do meio ambiente, que podem ser altamente tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente quando não descartados de forma correta (CARVALHO et al., 2012). Os cogumelos podem ser cultivados em dois sistemas de cultivo, sendo estes, sistema axênico, quando o substrato é esterilizado e mantido em condições assépticas até a total colonização

do mesmo pelo fungo, ou pelo sistema não axênico, quando o substrato de cultivo passa por compostagem curta seguida de pasteurização (EIRA, 2000).

Devido a urbanização, uma alta quantidade de resíduos orgânicos é produzida por todo o mundo, frente às atividades humanas, agrícolas, industriais e municipais (PATCHAYE et al., 2018). De acordo com Hoornweg et al. (2013) é previsto que até o final do ano de 2100 as taxas de geração de resíduos sólidos excederão 11 milhões de toneladas por dia, três vezes mais do que a taxa atual.

A disposição de resíduos no meio ambiente representa um custo considerável em termos de poluição e economia, existindo uma necessidade urgente de encontrar uma maneira sustentável de reutilizá-los ou eliminá-los (APRUZZESE, 2017). Quando se trata de resíduos orgânicos, todos os tipos têm grande potencial para serem reciclados de volta no sistema natural (PATCHAYE et al., 2019).

O cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. é um fungo saprófita, o qual degrada a matéria vegetal em decomposição como forma de alimento para o seu crescimento, desenvolvendo o corpo de frutificação, parte que é consumida pelos seres humanos e também, por outros animais. É cultivado convencionalmente através de *Brachiaria* spp., bagaço de cana ou serragem, podendo ser suplementados com farelos, como por exemplo, farelo de trigo, a fim de se obter um desenvolvimento satisfatório (BONONI et al., 1999). Ocupa o segundo lugar dos cogumelos mais cultivados no mundo, com aproximadamente 19% da produção mundial. O cogumelo *Lentinula edodes*, conhecido popularmente como Shiitake, ocupa o primeiro lugar com aproximadamente 22% (ROYSE, et al., 2017).

A serragem de eucalipto é considerada um resíduo agroindustrial altamente disponível em diversas regiões do Brasil, porém, é muito utilizada para produção de energia através da formação de briquetes (FELFLI, et al., 2011), a qual pode se tornar escassa aos produtores de cogumelos em virtude de sua grande procura por produtores de energia.

Tendo em vista que o fungo *P. ostreatus* é decompositor de matéria vegetal, muitos resíduos e descartes agrofloretais podem ser aproveitados para seu cultivo, a fim de se obter um destino ecologicamente correto e, além disso, produzir alimento. A adaptação do gênero *Pleurotus* spp. em diferentes resíduos e descartes

representa um dos principais métodos de bioconversão de resíduos agroindustriais em produtos comestíveis com um alto valor nutricional (FERNANDES et al., 2015).

Embora os princípios básicos para o cultivo de cogumelos em geral sejam semelhantes, as abordagens práticas devem ser ajustadas de acordo com a espécie a ser cultivada, as características climáticas locais e aos materiais disponíveis para produção de substrato (CHANG e WASSER, 2017), o que pode afetar o sistema de produção.

Na região de Botucatu/SP, encontram-se alguns resíduos orgânicos altamente disponíveis e abundantes, tais como: cascas de eucalipto, serragem de peroba do Norte e composto exaurido de *P. ostreatus*. Atualmente, o aproveitamento de resíduos é uma tarefa nobre, visto que, diversos materiais nocivos ao meio ambiente podem ser altamente tóxicos quando descartados de forma direta. O aproveitamento de resíduos para a produção de alimentos torna-se uma tarefa mais nobre ainda, principalmente quando se trata da produção de alimentos altamente nutritivos e benéficos a saúde: os cogumelos.

Assim, espera-se que o aproveitamento destes resíduos orgânicos, sejam eficazes e garantam, no mínimo, a equivalência na produção de cogumelos de uma matéria prima comumente utilizada no sistema axênico de produção de cogumelos: a serragem de eucalipto.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. Gerais

Verificar a viabilidade do aproveitamento de resíduos orgânicos: cascas de eucalipto, serragem de peroba e composto exaurido, como substrato base para a produção de *P. ostreatus* em cultivo axênico.

1.2.2. Específicos

- Avaliar o crescimento micelial do *P. ostreatus* em meios de cultura a base das formulações: 100%, 75%, 50% e 25% de cada resíduo orgânico (cascas de eucalipto, serragem de peroba e composto exaurido) combinados de forma complementar com a serragem de eucalipto, comparando-os com o substrato convencional (100% de serragem de eucalipto);

- Analisar a produtividade de cogumelos através da eficiência biológica dos tratamentos formulados à base de resíduos orgânicos (cascas de eucalipto, serragem de peroba e composto exaurido), nas mesmas proporções e combinações do item anterior, comparando-os com o substrato convencional (100% de serragem de eucalipto);
- Caracterizar quimicamente os substratos [teor de nitrogênio (N), carbono (C), a relação carbono/nitrogênio (C/N), o teor de umidade (%), de matéria orgânica (%) e o pH, antes e após o cultivo do *P. ostreatus*.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Formulação dos tratamentos e delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos (*in vitro* e em estufa climatizada) para a avaliação do desempenho de cultivo do *P. ostreatus*, em substratos a base de diferentes resíduos orgânicos não convencionais (serragem de casca de eucalipto, serragem de peroba e serragem de composto exaurido) nas proporções (100%, 75%, 50% e 25%), combinados de forma complementar com a serragem de eucalipto (Tabela 1). Os substratos foram formulados tendo como controle a serragem de eucalipto (100%), por ser uma matéria prima comumente utilizada na produção axênica de *P. ostreatus*. No total, foram produzidos treze tipos de substratos diferentes (Tabela 2). Todos os resíduos foram obtidos na cidade de Botucatu, SP, com alta disponibilidade e facilidade de captação.

Tabela 1 - Formulações dos tratamentos em base seca

Formulação (g), em base seca				
Tratamentos	Serragem de eucalipto	Casca de Eucalipto	Composto Exaurido de <i>P. ostreatus</i>	Serragem de peroba
1 - 100% Serragem de Eucalipto (Controle)	8640			
2 - 100% Composto Exaurido			9648	
3 - 100% Casca de Eucalipto		8136		
4 - 25% Casca de Eucalipto e 75% Serragem de Eucalipto	6480	2034		
5 - 50% Casca de Eucalipto e 50% Serragem de Eucalipto	4320	4068		
6 - 75% Casca de Eucalipto e 25% Serragem de Eucalipto	2160	6102		
7 - 25% Composto Exaurido e 75% Serragem de Eucalipto	6480		2412	
8 - 50% Composto Exaurido e 50% Serragem de Eucalipto	4320		4824	
9 - 75% Composto Exaurido e 25% Serragem de Eucalipto	2160		7236	
10 - 100% Serragem de Peroba do norte				8640
11 - 25% Serragem de Peroba do norte e 75% Serragem de Eucalipto	6480			2160
12 - 50% Serragem de Peroba do norte e 50% Serragem de Eucalipto	4320			4320
13 - 75% Serragem de Peroba do norte e 25% Serragem de Eucalipto	2160			6480

Para todos os tratamentos a umidade foi ajustada para 65%. Foram adicionados 2% de calcário calcítico (180 g) e 20% de farelo de trigo (1944 g) em todos os tratamentos.

No Experimento 1, *in vitro*, avaliou-se o crescimento micelial do *P. ostreatus* em meios de cultura preparados a base de extratos dos substratos formulados com resíduos orgânicos. No total foram 13 tratamentos (Meios de cultura preparados a base dos 13 substratos formulados), em um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Para cada tratamento foram preparadas 10 repetições (correspondendo a uma placa de Petri contendo o meio de cultura). Assim, no total, foram 130 unidades experimentais.

No Experimento 2, em estufa climatizada, foi avaliado a eficiência biológica destes substratos na produção de cogumelos *P. ostreatus*, bem como sua caracterização química. No total foram 13 tratamentos (tipos de substratos) em um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Para cada tratamento foram preparadas 10 repetições (correspondendo a pacotes de substrato de cultivo de 1kg). Assim, no total, foram 130 unidades experimentais.

1.3.2. Linhagem de *Pleurotus ostreatus*

A linhagem utilizada nesta pesquisa (Linhagem SB) foi doada pela empresa Funghi & Flora, localizada na cidade de Valinhos, SP. Para produção do meio de cultura e posterior inoculação, a linhagem utilizada foi mantida na forma micelial do fungo (Figura 1). A linhagem SB foi escolhida devido a facilidade de se adaptar às condições climáticas da cidade de Botucatu, SP, e obter boa produtividade.

Figura 1 - Micélio de *Pleurotus ostreatus*, linhagem SB, obtido da empresa Funghi & Flora – de Valinhos, SP



Foto: Viviany Viriato – 2019

Para a produção do *Spawn* (inóculo), a linhagem de *P. ostreatus* escolhida, SB, foi previamente preparada em um substrato a base de grãos de trigo, os quais foram colonizados pelo fungo, formando uma massa fúngica, conhecida como *Spawn* (Figura 2), sendo posteriormente utilizada para a inoculação dos substratos de cultivo.

Figura 2 - *Spawn* de *Pleurotus ostreatus*, linhagem SB, em meio de grãos de trigo, obtido da empresa Funghi & Flora - de Valinhos, SP



Foto: Viviany Viriato – 2019

1.3.3. Proveniência e preparo dos substratos

A empresa Eucatex, localizada na Rodovia Eduardo Zuccari, Km 12, considerada uma das maiores empresas da indústria moveleira do Brasil, forneceu toda a casca de eucalipto para a pesquisa. Na empresa, após a colheita do eucalipto, a casca bruta é retirada do tronco e picada, somando um total de 3 mil toneladas por mês¹, o que não é aproveitado ou processado para outros fins. Entretanto, diversas usinas de açúcar e álcool utilizam este resíduo para produção de energia, buscando-o no local. A empresa Eucatex cobra apenas uma taxa simbólica pelo material disponível para as usinas.

¹ Informação fornecida pela empresa Eucatex.

. Figura 3 - Cascas de eucalipto fornecidas pela empresa Eucatex – de Botucatu, SP



A empresa Fungibras Indústria e Comércio em Fungicultura Ltda., localizada na Rua Lourdes Tonelli Basseto, número 30, Distrito Industrial 3, Botucatu, SP, forneceu toda a serragem de eucalipto para a pesquisa (Figura 4). A empresa utiliza a serragem de eucalipto como substrato base para a produção do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*), a qual é coletada de outras empresas que processam a madeira do eucalipto na região.

Figura 4 - Serragem de eucalipto fornecida pela empresa Fungibras - de Botucatu, SP



A empresa Reino Fungi, localizada na Estrada Elias Alves, s/n, Botucatu, SP, produtora local de *P. ostreatus*, forneceu o composto exaurido (Figura 5) após três meses de produção de cogumelos. O composto exaurido não é aproveitado pela

empresa, sendo destinado a um produtor da vizinhança que o utiliza como fertilizante de solo.

Figura 5 - Composto exaurido do cultivo de *Pleurotus ostreatus* fornecido pela empresa Reino Fungi, Botucatu, SP



A empresa Murba Comércio Madeiras, localizada na cidade de Botucatu, SP, Avenida Camilo Mazzoni, número 1488, Vila Pinheiro Machado, contribuiu com a doação da serragem de peroba do norte (*Goupia glabra*), (Figura 6). A serragem não é aproveitada pela empresa, a qual conta com a busca semanal do material por produtores de curtume ou por pessoas da região que realizam compostagem caseira.

Figura 6 - Serragem de peroba do Norte, fornecida pela empresa Madeireira Murba - de Botucatu, SP



Os substratos foram preparados no sítio Estância Saad, localizado no município de Pardinho, SP, localização geográfica 23°01'31.8"S 48°28'59.1"W, próximo a cidade de Botucatu, SP. Os resíduos foram misturados manualmente nas proporções descritas em cada tratamento (Tabela 2) com auxílio de enxadas e a umidificação foi feita com água de poço artesiano, disponível na propriedade (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Figura 7 - Preparo do substrato a base de composto exaurido, com insumos antes (A) e após a mistura (B)



Figura 8 - Preparo do substrato a base de casca de eucalipto, com insumos antes (A) e após a mistura (B)

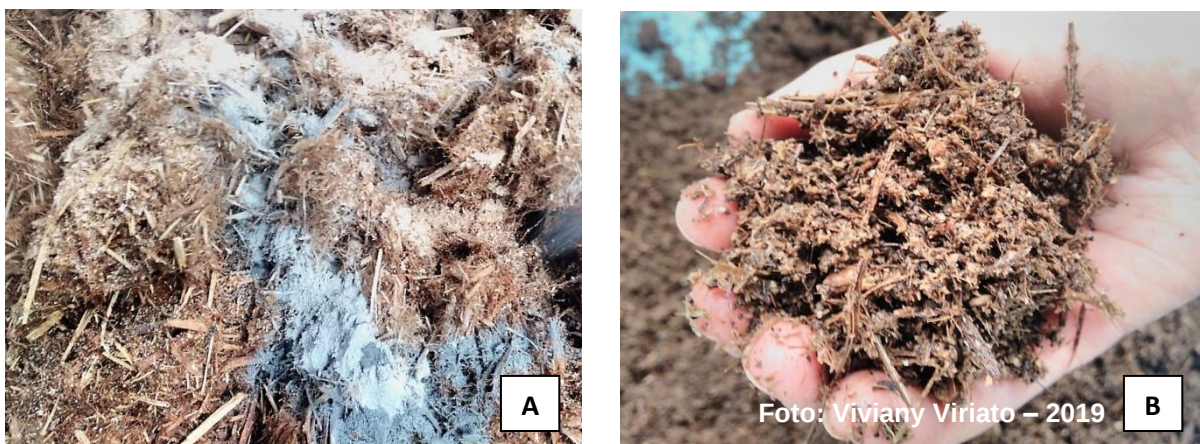


Figura 9 - Preparo do substrato a base de serragem de peroba do Norte, com insumos antes (A) e após a mistura (B)

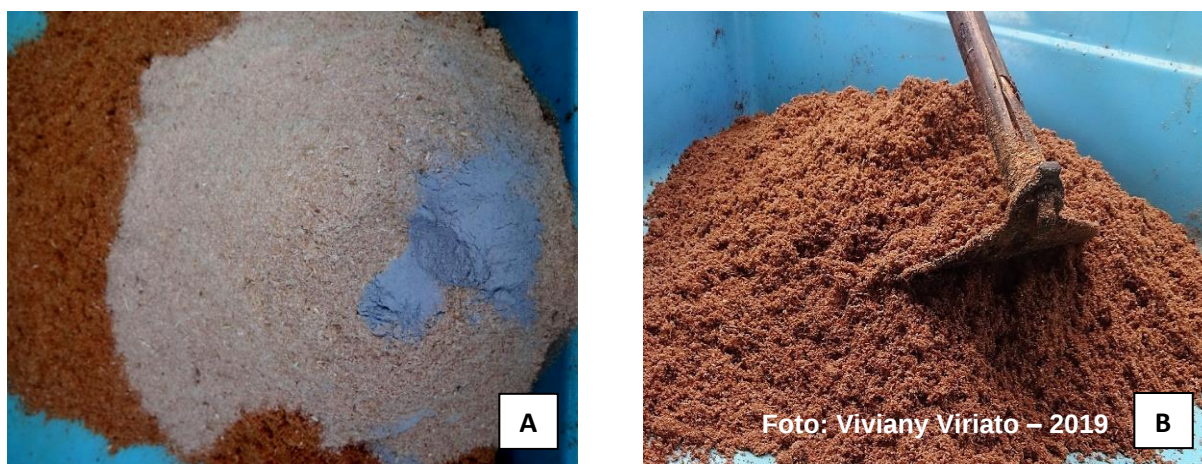
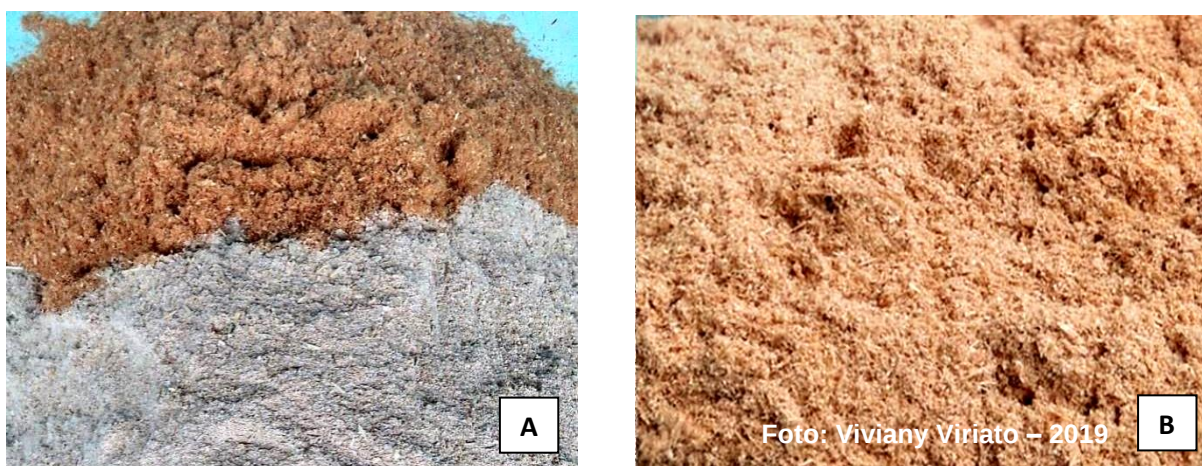


Figura 10 - Preparo do substrato a base de serragem de eucalipto, com insumos antes (A) e após a mistura (B)



Após o preparo dos substratos, estes foram acondicionados em sacos transparentes de polipropileno (resistentes ao processo de esterilização) previamente furados, para que na fase de produção, favorecessem a saída de cogumelos. Finalmente estes pacotes foram revestidos com mais um saco de polipropileno, sendo este sem furos, para que, ao final do processo de esterilização, os substratos não fossem contaminados. Os substratos foram colocados até atingir a massa de 1kg por pacote (Figura 11). Também foram preparados dois pacotes adicionais de cada tratamento, um para o preparo dos meios de cultura e outro para a análise química dos substratos.

Figura 11 - Pacote contendo substrato (A) e caixa treliçada utilizada para o transporte dos pacotes (B)



Em seguida, os pacotes foram levados para a autoclavagem, a qual durou 4 horas, a 121°C e 1 atmosfera de pressão, em duas etapas de 2 horas cada (LUZ et al., 2012), com intervalo de 24 horas entre as esterilizações (Figura 11).

Figura 12 - Disposição dos pacotes na autoclave



1.3.4. Análise química dos substratos

Foram colhidas amostras ao acaso em vários pontos diferentes (“pool”) após o preparo de cada substrato (recém preparado), onde, após a esterilização, foram analisadas duplicatas deste “pool” para cada tipo de substrato. Já para o substrato exaurido, foram escolhidos ao acaso três pacotes de cada tratamento ao final do

ciclo de cultivo, onde foram misturados manualmente (“pool”). Desta mistura, por tratamento, foram retiradas duas duplicatas. Assim, no total, foram analisadas duas amostras do substrato inicial (recém preparado) (Tabela 2) e duas amostras do substrato final (substrato exaurido) por tratamento (Tabela 3).

Para as amostras (tanto do substrato inicial quanto do substrato final) foram avaliados: teor de nitrogênio (N), carbono (C), a relação carbono/nitrogênio (C/N), a porcentagem de umidade e matéria orgânica, bem como, o pH. Estas análises foram feitas no Laboratório de Análise Química de Fertilizantes e Corretivos, pertencente ao Departamento de Recursos Naturais – Ciência do Solo – FCA/UNESP, Botucatu, SP, de acordo com a metodologia do MAPA (2014).

1.3.5. Experimento 1: Crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meios de cultura à base de resíduos orgânicos

1.3.5.1. Preparo dos meios de cultura e inoculação

Com os pacotes devidamente esterilizados, foram separadas as amostras de substratos de todos os tratamentos para a produção dos meios de cultura, os quais foram produzidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, SP. A metodologia baseia-se na produção do meio de cultura denominado substrato ágar (SA), adaptado de Carvalho et al. 2013. Previamente, 40g do substrato de cada tratamento foram fervidas durante quinze minutos em 250mL de água destilada (Figura 13).

Figura 13 - Fervura do substrato em água destilada para o preparo do meio de cultura



Após a fervura, os meios foram coados utilizando uma peneira de malha fina, juntamente com uma camada de algodão para que os resíduos maiores não ultrapassassem (Figura 14). Também foram adicionadas 5g de ágar em cada Erlenmeyer para endurecimento dos meios.

Figura 14 - Meio de cultura sendo vertido no frasco com peneira e algodão para coagem



Em seguida, os frascos foram dispostos na autoclave (Figura 15) e foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C.

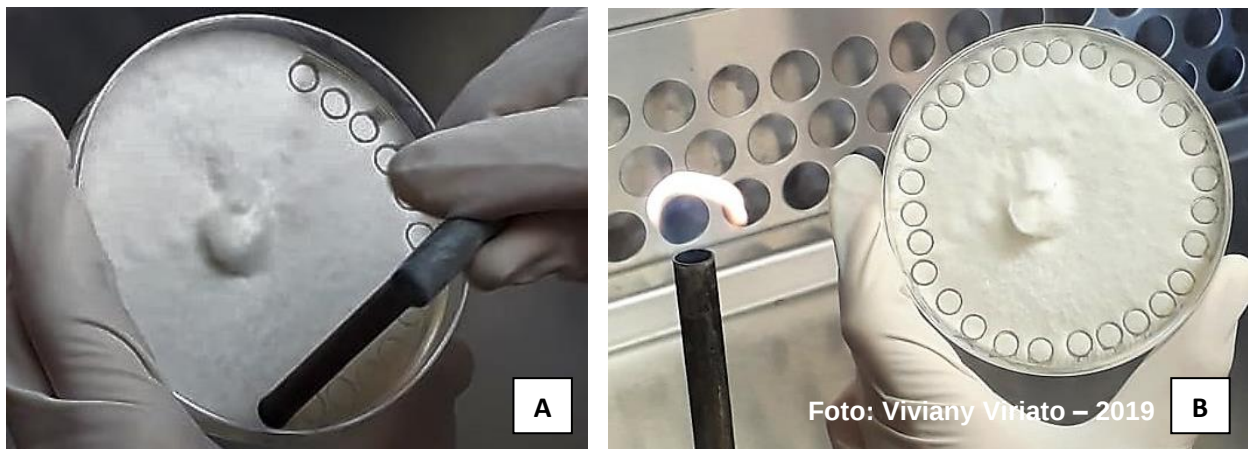
Figura 15 - Frascos contendo meios de cultura na autoclave



Quando retirados da autoclave, os meios foram resfriados em temperatura ambiente e vertidos em placas de Petri dentro de câmara de fluxo, a qual foi previamente esterilizada. Após endurecimento dos meios de cultura, as placas foram encaminhadas para estufa a 35°C como controle de esterilidade, onde permaneceram por 48 horas. Caso houvesse o crescimento de algum microrganismo nas placas o meio seria refeito, porém, não houve nenhum tipo de contaminação.

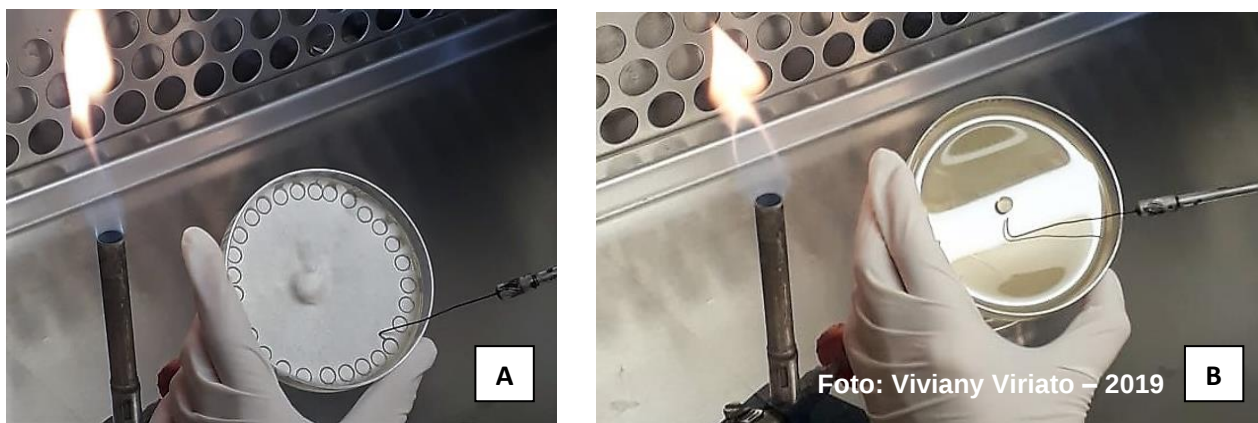
Para a inoculação nos meios de cultura, uma câmara de fluxo foi previamente esterilizada com álcool 70% e luz ultravioleta durante 20 minutos. A placa contendo a linhagem SB de *P. ostreatus* foi utilizada para inocular os tratamentos (Tabela 2), entretanto, utilizou-se um vazador para furar o meio de cultura solidificado e manter um tamanho de inóculo padronizado (Figura 16).

Figura 16 - Inóculos de *Pleurotus ostreatus* sendo padronizados (A) e prontos para serem transferidos (B)



Com os inóculos padronizados em tamanho, foram transferidos em contato direto com o novo meio de cultura das novas placas, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada (Figura 17).

Figura 17 - Transferência do inóculo, com o auxílio da alça de platina (A), para os novos meios experimentais (B)



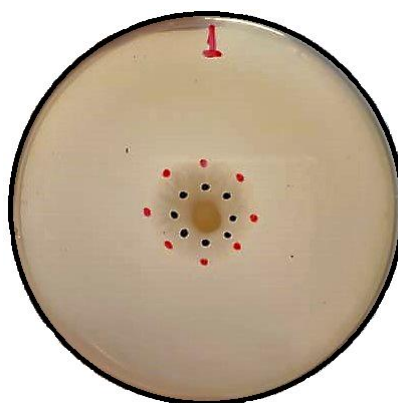
Após a inoculação as placas foram vedadas com papel filme e mantidas em estufa a 25°C.

1.3.5.2 Avaliação do crescimento micelial

A avaliação do crescimento micelial foi feita diariamente por um período de sete dias, período no qual, o *P. ostreatus* atingiu as extremidades da placa em pelo menos um dos tratamentos. Foram feitos dois pontos com caneta para retroprojetor

em quatro ângulos: horizontal, vertical e nas diagonais. Foi feita uma intercalação de cores diferentes para separar os dias e facilitar a medição (Figura 18).

Figura 18 - Marcação do crescimento de *Pleurotus ostreatus* em cores intercaladas, sendo o primeiro dia na cor preta e o segundo dia na cor vermelha



As medições das marcas foram feitas através de um paquímetro digital. O paquímetro foi posicionado em cima de cada placa de Petri para medir o diâmetro do micélio em milímetros.

1.3.5.3. Análise estatística do crescimento micelial

Para a análise estatística do crescimento micelial do fungo *P. ostreatus*, foi ajustado um modelo linear generalizado com a distribuição gama e função de ligação logarítmica (Nelder e Wedderburn, 1972), tendo como fatores os tratamentos (T1 a T13).

A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (*deviance*), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre os tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al. 1999) do procedimento *genmod* do programa estatístico SAS – *Free Statistical Software, SAS University Edition*.

1.3.6. Experimento 2: Produção de *Pleurotus ostreatus* em substratos à base de resíduos orgânicos

1.3.6.1. Produção de cogumelos

Os pacotes para a produção de cogumelos foram resfriados em temperatura ambiente e transferidos para o Laboratório de apoio do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, SP, para inoculação do *P. ostreatus*.

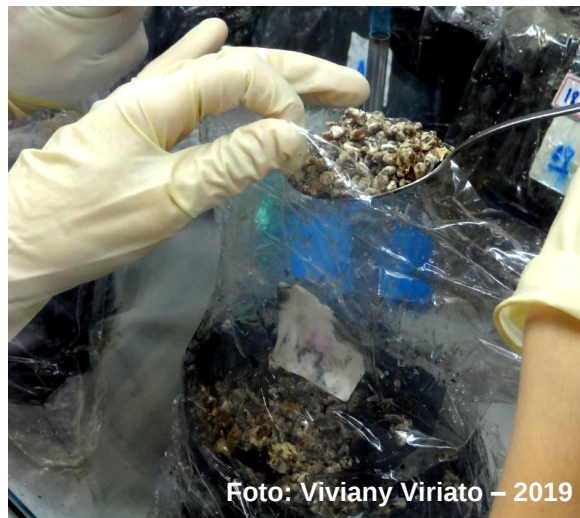
A inoculação foi feita dentro da câmara de fluxo previamente esterilizada durante vinte minutos, contendo os materiais necessários para a inoculação: luvas, colheres, grampeadores e pacotes de substratos (Figura 19).

Figura 19 - Câmara de fluxo laminar com materiais sob luz ultravioleta



A inoculação, a qual consiste na transferência do *Spawn* de *P. ostreatus* para os pacotes de substratos. Para isto, os pacotes foram abertos e o *Spawn* foi colocado com o auxílio de uma colher esterilizada. Para padronização da quantidade de *Spawn*, utilizou-se 20 gramas por pacote (Figura 20). No total, foram inoculados 130 pacotes de substrato, sendo 10 pacotes por tratamento (Tabela 2).

Figura 20 - Inoculação do substrato com *Spawn*, linhagem SB, de *Pleurotus ostreatus*



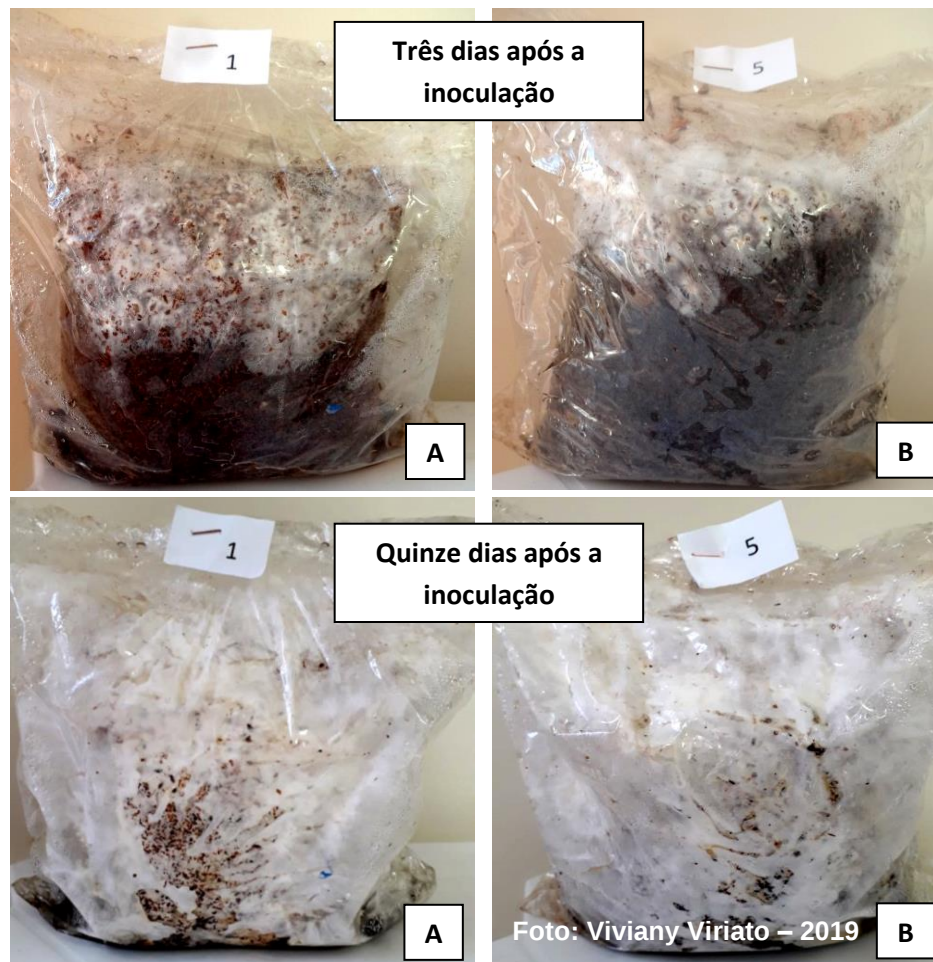
Após a inoculação, os pacotes de dentro foram fechados e grampeados dentro da câmara de fluxo, bem como os pacotes de fora (Figura 21).

Figura 21 - Fechamento dos pacotes (A) e grampeamento (B)



Em seguida, os pacotes foram transferidos para uma sala de incubação com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) para colonização do substrato, aonde permaneceram por um período de quinze dias (até a completa colonização do substrato pelo *P. ostreatus*), sendo observados e fotografados diariamente (Figura 22).

Figura 22 - Aspecto visual dos pacotes durante a incubação: Tratamento 1 - 100% serragem de eucalipto (A); Tratamento 5 - 50% casca de eucalipto + 50% serragem de eucalipto (B)



Após quinze dias na sala de incubação, os pacotes já estavam totalmente colonizados pelo *P. ostreatus* e foram levados para a estufa de produção, na qual permaneceram por um total de setenta e cinco dias (Figura 23). Neste momento, o pacote externo de polipropileno foi retirado, ficando apenas a embalagem interna, a qual havia sido previamente furada para facilitar a saída dos cogumelos.

Figura 23 - Distribuição dos pacotes de cultivo de *Pleurotus ostreatus* na estufa de produção



Foto: Viviany Viriato – 2019

A estufa de produção localiza-se no Sítio do Vale, na cidade de Botucatu, SP, Estrada Elias Alves, Km 2,5, localização geográfica 22°52'52.7"S 48°24'31.0"W. A estufa acomodou os pacotes, os quais foram dispostos aleatoriamente, com temperatura a 25°C e aspersão de água a cada 15 minutos.

1.3.6.2 Avaliação da produção de cogumelos

A produtividade de cogumelos foi expressa através da eficiência biológica (EB), a qual representa o percentual de conversão de substrato em biomassa fúngica (cogumelos), de acordo com a seguinte fórmula:

$$EB = \frac{\text{Massa fresca total de cogumelos}}{\text{Massa seca do substrato inicial}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.6.3. Análise estatística da produção de cogumelos

Para comparar a eficiência biológica entre os tratamentos, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey (5%) (SNEDECOR e COCHRAN, 1972). Para isto, foi utilizado o Software R 3.6.2.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Análise química do substrato

Os resultados das análises químicas dos treze substratos antes e após o cultivo de cogumelos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Análise química inicial dos substratos antes da produção de cogumelos. Erro padrão entre parênteses

Tratamentos	N	M.O.	C.O.	Umidade	Rel. C/N	pH ao natural
		----- * %	-----			
1 - 100% SerEu	0,23 (0,02)	25 (0,41)	50 (0)	71 (0,5)	60/1 (3/1)	5,3 (0,24)
2 - 100% CompEx	0,59 (0,01)	23 (2,15)	34 (0)	62 (1,7)	22/1 (0)	6,6 (0,07)
3 - 100% CascaEu	0,28 (0)	31 (0,36)	49 (0)	64 (0,6)	60/1 (3,5/1)	4,8 (0,02)
4 - 25% CascaEu	0,36 (0,04)	30 (1,41)	50 (0)	66 (1,5)	46/1 (3,5/1)	5,2 (0,03)
5 - 50% CascaEu	0,37 (0,03)	31 (0,99)	49 (0)	65 (1,32)	46/1 (3/1)	5,4 (0,05)
6 - 75% CascaEu	0,42 (0,03)	29 (1,17)	49 (0,3)	67 (1,49)	39/1 (1/1)	5,2 (0,28)
7 - 25% CompEx	0,33 (0)	26 (1,30)	46 (0)	68 (1,58)	43/1 (2,5/1)	5,8 (0,26)
8 - 50% CompEx	0,42 (0,02)	25 (1,16)	42 (0,6)	67 (1,09)	33/1 (3/1)	6,0 (0,04)
9 - 75% CompEx	0,56 (0,01)	27 (0,07)	39 (0,8)	61 (0,71)	27/1 (1/1)	7,4 (1,07)
10 - 100% Peroba	0,31 (0,05)	37 (1,17)	51 (0)	59 (1,28)	67/1 (13/1)	6,0 (0,13)
11 - 25% Peroba	0,33 (0,01)	33 (1,17)	51 (0)	63 (1,17)	56/1 (0)	6,1 (0,17)
12 - 50% Peroba	0,23 (0)	32 (1,44)	51 (0)	64 (1,45)	76/1 (4/1)	6,0 (0,17)
13 - 75% Peroba	0,28 (0)	36 (2)	50 (0,2)	59 (2,44)	70/1 (2,5/1)	5,7 (0,01)

N= porcentagem de nitrogênio; MO= porcentagem de matéria orgânica; C= porcentagem de carbono; C/N= relação entre carbono e nitrogênio. Média de duas repetições. **100% SerEu**: 100% de serragem de eucalipto; **100% CompEx**: 100% de composto exaurido; **100% CascaEu**: 100% de casca de eucalipto; **25% CascaEu**: 25% de casca de eucalipto + 75% de serragem de eucalipto; **50% CascaEu**: 50% de casca de eucalipto + 50% de serragem de eucalipto; **75% CascaEu**: 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **25% CompEx**: 25% de composto exaurido + 75% de casca de eucalipto; **50% CompEx**: 50% de composto exaurido + 50% de serragem de eucalipto; **75% CompEx**: 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **100% Peroba**: 100% de serragem de peroba; **25% Peroba**: 25% de serragem de peroba + 75% de serragem de eucalipto; **50Peroba**: 50% de serragem de peroba + 50% de serragem de eucalipto; **75% Peroba**: 75% de serragem de peroba + 25% de serragem de eucalipto.

Tabela 3 - Análise química final dos substratos após a produção de cogumelos

Tratamentos	N	M.O.	C	Umidade	Rel. C/N	pH ao natural
		-----	* %	-----		
1 - 100% SerEu	0,27 (0)	20 (0,31)	47 (0,27)	77 (0,23)	40/1 (0,5/1)	6,8 (1,04)
2 - 100% CompEx	0,71 (0,01)	23 (2,16)	31 (3,33)	59 (0,49)	18/1 (1)	8,6 (0,03)
3 - 100% CascaEu	0,38 (0,01)	39 (1,70)	44 (1,38)	50 (0,59)	57/1 (1)	5,7 (0,04)
4 - 25% CascaEu	0,29 (0,02)	29 (3,08)	45 (0,55)	64 (3,32)	56/1 (10,5/1)	6,7 (0,54)
5 - 50% CascaEu	0,33 (0,02)	27 (0,96)	47 (2,22)	68 (0,36)	45/1 (5/1)	6,5 (0,44)
6 - 75% CascaEu	0,30 (0,01)	34 (1,26)	52 (6,66)	63 (3,37)	63/1 (0)	6,6 (0,17)
7 - 25% CompEx	0,39 (0,02)	24 (0,95)	41 (0,27)	68 (1,07)	34/1 (3,5/1)	7,2 (0,66)
8 - 50% CompEx	0,50 (0,03)	15 (0,10)	32 (0,55)	75 (0,24)	16/1 (1,5/1)	7,9 (0,14)
9 - 75% CompEx	0,66 (0,04)	24 (1,84)	35 (0,55)	62 (3,53)	20/1 (0)	8,6 (0,19)
10 - 100% Peroba	0,30 (0,01)	52 (1,5)	52 (1)	62 (0,73)	66/1 (5,5/1)	6,9 (0,27)
11 - 25% Peroba	0,36 (0)	48 (1)	48 (0,5)	65 (0,89)	46/1 (0,5/1)	6,4 (0,02)
12 - 50% Peroba	0,34 (0,08)	49 (0,5)	49 (1)	66 (0,09)	50/1 (13,5/1)	6,4 (0,19)
13 - 75% Peroba	0,30 (0,01)	48 (0,39)	48 (0)	71 (0,62)	46/1 (2/1)	7,2 (0,01)

N= porcentagem de nitrogênio; MO= porcentagem de matéria orgânica; C= porcentagem de carbono; C/N= relação entre carbono e nitrogênio. Média de duas repetições. **100% SerEu**: 100% de serragem de eucalipto; **100% CompEx**: 100% de composto exaurido; **100% CascaEu**: 100% de casca de eucalipto; **25% CascaEu**: 25% de casca de eucalipto + 75% de serragem de eucalipto; **50% CascaEu**: 50% de casca de eucalipto + 50% de serragem de eucalipto; **75% CascaEu**: 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **25% CompEx**: 25% de composto exaurido + 75% de casca de eucalipto; **50% CompEx**: 50% de composto exaurido + 50% de serragem de eucalipto; **75% CompEx**: 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **100% Peroba**: 100% de serragem de peroba; **25% Peroba**: 25% de serragem de peroba + 75% de serragem de eucalipto; **50Peroba**: 50% de serragem de peroba + 50% de serragem de eucalipto; **75% Peroba**: 75% de serragem de peroba + 25% de serragem de eucalipto.

De acordo com os resultados da análise química inicial do substrato antes do cultivo de cogumelos (Tabela 2), o teor de nitrogênio nos substratos a base de composto exaurido aumenta conforme a concentração do composto aumenta. Nas concentrações do composto exaurido em 25, 50, 75 e 100%, obtiveram a porcentagem de nitrogênio equivalente a 0,33, 0,42, 0,56 e 0,59, respectivamente. Isto pode ser devido ao fato de que o composto exaurido apresenta resíduos do micélio do cogumelo *P. ostreatus* em sua composição. Isto pode ser confirmado por

Grimm e Wösten (2018), no qual apontam que após o cultivo de cogumelos, é gerado, por via de regra, o composto exaurido seco (o qual inclui o micélio vegetativo residual do cogumelo) e cogumelos frescos, na proporção de 2:1, respectivamente.

A composição do composto exaurido está relacionada com a composição do primeiro substrato de cultivo, além de, mudar durante o processo de cultivo de cogumelos (ZHU et al., 2013). Isso também pode ser observado em relação ao teor de nitrogênio, os quais eram nos tratamentos de composto exaurido nas concentrações (25, 50, 75 e 100%), 0,33, 0,42, 0,56 e 0,59%, respectivamente (Tabela 2), antes da produção de cogumelos e 0,39, 0,50, 0,66 e 0,71%, respectivamente, ao final da produção de cogumelos (Tabela 3).

Os cogumelos requerem fontes de carbono, nitrogênio e outros compostos inorgânicos como fonte nutricional, entretanto, o cogumelo *P. ostreatus* requer menos nitrogênio e mais fontes de carbono (SHARMA et al., 2013). Isto também pode explicar o fato de que os tratamentos à base de composto exaurido nas concentrações (25, 50, 75 e 100% do composto) obtiveram as menores relações C/N em relação aos demais tratamentos, sendo, 43/1, 33/1, 27/1 e 22/1, respectivamente (Tabela 3). Em contrapartida, Martins et al. (2018) avaliaram a eficiência biológica de *P. ostreatus* em substratos com suplementação a base de farelo de soja (convencional) e farelo de sobras de alimentos como possível suplemento biológico em substituição ao tradicional. Concluíram que quanto maior for a concentração de sobras de alimentos, neste caso, 20%, maior é a relação C/N, chegando na proporção de 95/1, o que torna um composto com teor de nitrogênio extremamente baixo para o cultivo de *P. ostreatus*, não sendo eficientes na produção do cogumelo.

De acordo com Chang e Miles (2004), a taxa de umidade do substrato antes da esterilização para um desenvolvimento satisfatório de *Pleurotus* spp. varia em torno de 50 a 75%. A taxa de umidade dos substratos antes do cultivo de cogumelos variou de 59 a 71% (Tabela 2), o que pode ser considerado adequado ao cultivo de *P. ostreatus*.

O pH ao natural variou de 4,8 (encontrado no tratamento 3 - 100% de casca de eucalipto) a 7,4 (encontrado no tratamento 9 - 75% composto exaurido + 25% de

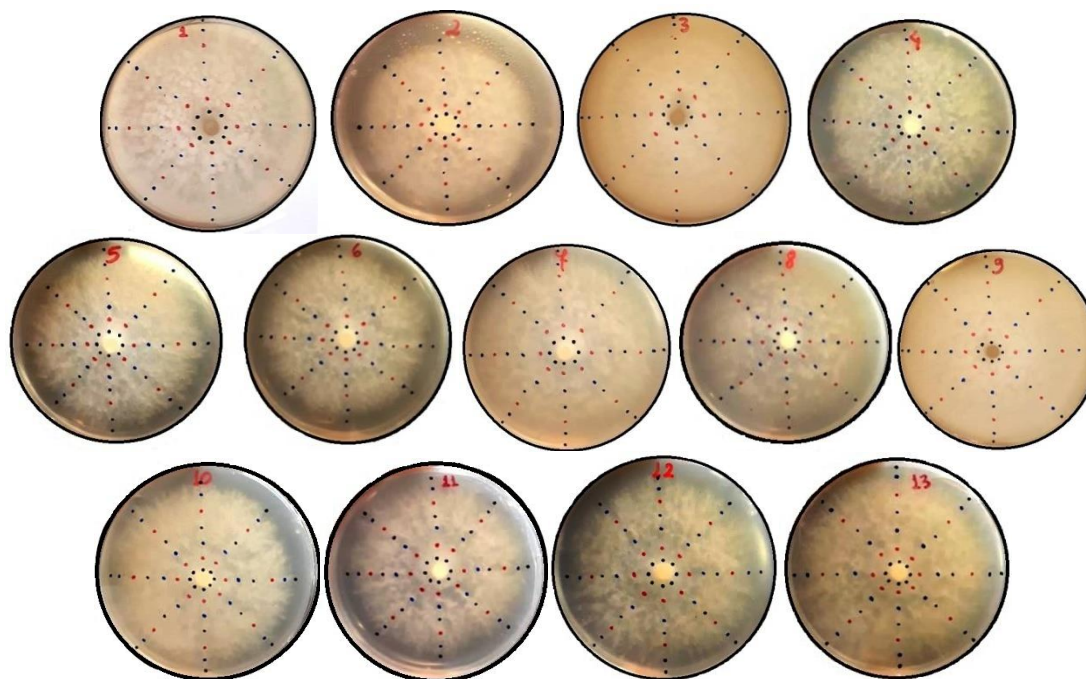
serragem de eucalipto) (Tabela 2), está próximo aos encontrados por Chang e Milles (2004), os quais propõe que o pH ideal para o crescimento micelial de *Pleurotus* spp. varia entre 5,5 a 6,5.

A relação C/N dos tratamentos diminuíram ao final do cultivo de cogumelos possivelmente devido ao teor de nitrogênio ter aumentado (Tabelas 2 e 3), com exceção dos tratamentos T4 e T6. O aumento do teor de nitrogênio após o cultivo de cogumelos também pode ser confirmado por Chang e Milles (2004), os quais pontuam que o teor de nitrogênio durante a formação dos corpos de frutificação é um pouco maior em relação ao teor de nitrogênio durante a colonização do substrato.

1.4.2. Crescimento micelial

Para efeito de visualização do crescimento micelial do fungo nas placas de Petri, foram tiradas fotos no sétimo e último dia de avaliação (Figura 24).

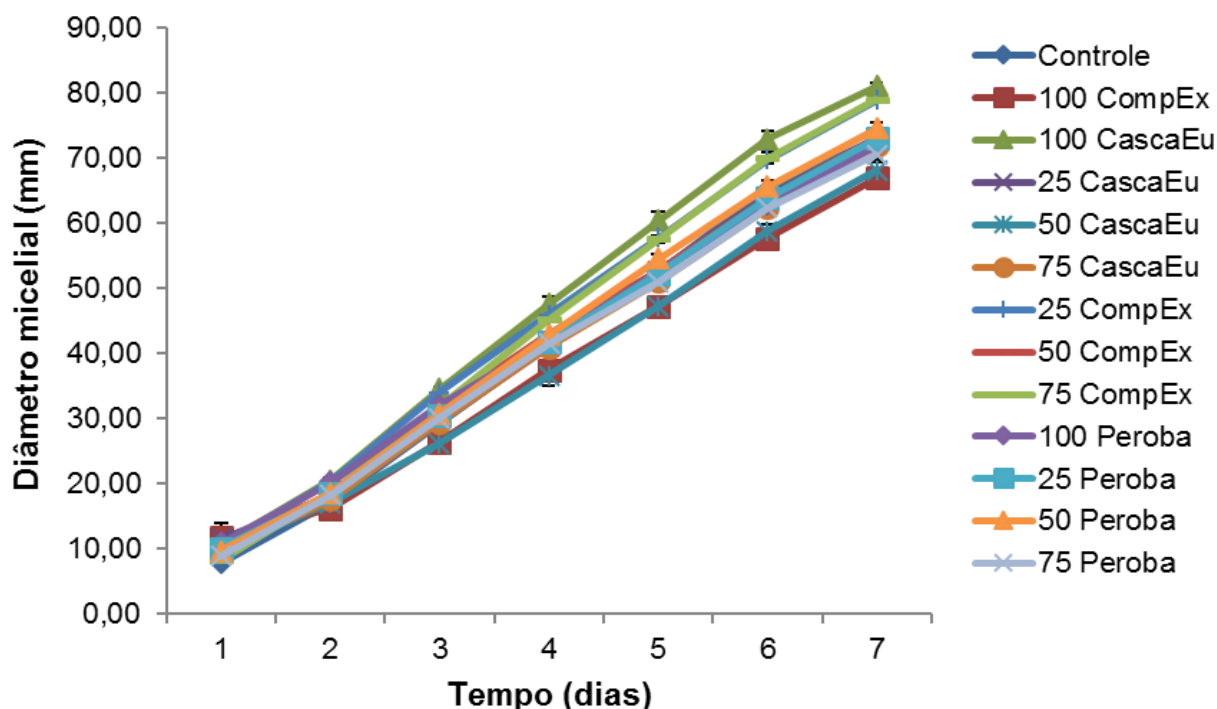
Figura 24 - Crescimento micelial da linhagem SB de *Pleurotus ostreatus* em treze tipos de meio de cultura, após sete dias de incubação a 25°C



Fonte: elaborado pela autora. Os tratamentos correspondem aos número: **1-** 100% serragem de eucalipto; **2-** 100% de composto exaurido; **3-** 100% de casca de eucalipto; **4-** 25% de casca de eucalipto + 75% de serragem de eucalipto; **5-** 50% de casca de eucalipto + 50% de serragem de eucalipto; **6-** 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **7-** 25% de composto exaurido + 75% de casca de eucalipto; **8-** 50% de composto exaurido + 50% de serragem de eucalipto; **9-** 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **10-** 100% de serragem de peroba; **11-** 25% de serragem de peroba + 75% de serragem de eucalipto; **12-** 50% de serragem de peroba + 50% de serragem de eucalipto; **13-** 75% de serragem de peroba + 25% de serragem de eucalipto.

O diâmetro médio em milímetros do crescimento micelial ao longo dos sete dias de incubação (Figura 25) foi obtido através das dez repetições contidas em cada tratamento, sendo necessária a mostra do erro padrão para visualização da variação entre as repetições.

Figura 25 - Crescimento micelial da linhagem SB de *Pleurotus ostreatus* nos treze tratamentos, em meio de cultura, durante sete dias de incubação a 25°C



Fonte: elaborado pela autora. O **controle** corresponde a 100% serragem de eucalipto; **100 CompEx**: 100% de composto exaurido; **100CascaEu**: 100% de casca de eucalipto; **25CascaEu**: 25% de casca de eucalipto + 75% de serragem de eucalipto; **50CascaEu**: 50% de casca de eucalipto + 50% de serragem de eucalipto; **75CascaEu**: 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **25CompEx**: 25% de composto exaurido + 75% de casca de eucalipto; **50CompEx**: 50% de composto exaurido + 50% de serragem de eucalipto; **75CompEx**: 75% de casca de eucalipto + 25% de serragem de eucalipto; **100Peroba**: 100% de serragem de peroba; **25Peroba**: 25% de serragem de peroba + 75% de serragem de eucalipto; **50Peroba**: 50% de serragem de peroba + 50% de serragem de eucalipto; **75Peroba**: 75% de serragem de peroba + 25% de serragem de eucalipto.

Todos os tratamentos obtiveram crescimento progressivo ao longo do período de sete dias, podendo ser observado um espaçamento maior entre os pontos do quinto ao sétimo dia, em relação aos dias iniciais. Isto também é observado no trabalho de Carvalho et al. (2013), o qual avaliaram a produção *in vitro* de *P. ostreatus* em meios de cultura a base de resíduos de bananeira, e observaram crescimento progressivo ao longo de seis dias de avaliação e espaçamento maior entre os pontos referentes ao quinto e sexto dia.

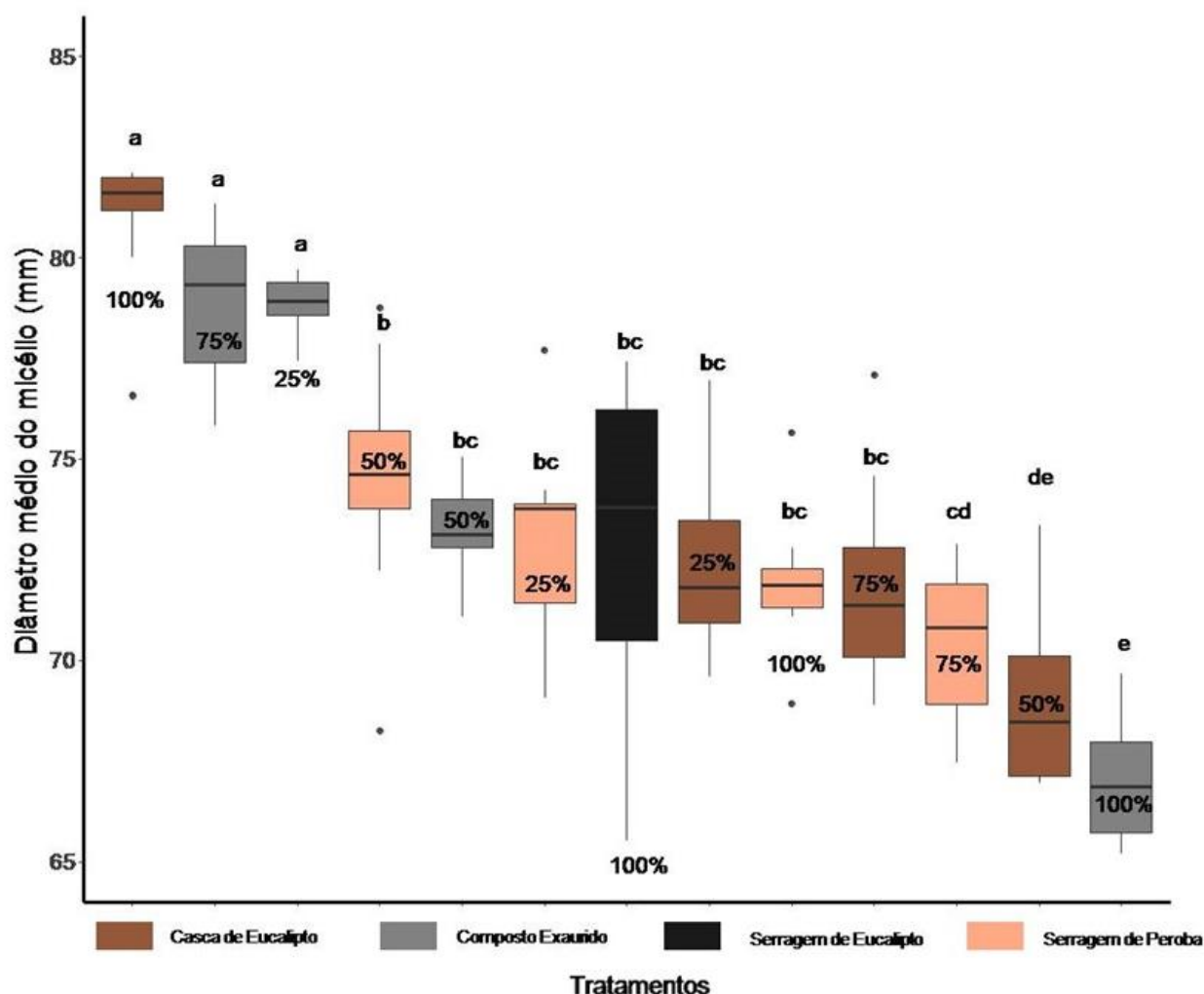
O crescimento progressivo ao longo do período de incubação e um maior espaçamento entre os pontos referentes aos últimos dias de incubação também podem ser observado no trabalho de Donini et al. (2005), o qual avaliou linhagens de

Pleurotus sp. em substratos a base de resíduos lignocelulósicos (capim elefante, palha de soja, cana de açúcar e sabugo de milho).

O teste de Tukey-Kramer (5%), com ajuste para comparações múltiplas, foi realizado para as médias do último dia de avaliação de crescimento, cujo resultado é apresentado em boxplot (Figura 26). Os tratamentos estão dispostos por ordem decrescente, sendo representados através das médias e suas variações referentes às dez repetições em cada tratamento.

Como todos os tratamentos têm concentrações balanceadas com a serragem de eucalipto, exceto aqueles que representam 100% do substrato, pode-se visualizar através da Figura 26, que o tipo de substrato foi agrupado por cores, variando somente a concentração.

Figura 26 - Diferença do crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* entre os treze tratamentos no sétimo dia de incubação, representada pelo teste de Tukey-Kramer (5%) para comparações múltiplas



Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância. As porcentagens descritas na figura foram acrescentadas de forma complementar com a serragem de eucalipto.

Os tratamentos com 100% de casca de eucalipto, 75% de composto exaurido e 25% de composto exaurido obtiveram as médias mais altas, não diferindo entre si estatisticamente, o que pode ter sido influenciado pelo tipo de substrato e sua respectiva concentração. Sobre isso, Carvalho et al. (2013), avaliaram o crescimento micelial de *P. ostreatus* em quatro cultivares de bananeira no meio de cultura substrato ágar, e sugerem que, a velocidade de crescimento micelial é influenciada pelas distintas composições estruturais, nutricionais e minerais dos substratos, os

quais podem variar entre si no teor de nitrogênio, carbono, relação C/N e valor de pH.

Eira (2004) pontua que uma boa relação C/N em cultivo axênico de *P. ostreatus* varia entre 15/1 a 25/1. Entretanto, o substrato a base de 100% de composto exaurido, o qual obteve relação C/N a 22/1, obteve o menor crescimento micelial (Figura 26), possivelmente devido à alta composição de nitrogênio no substrato (0,59%) (Tabela 2).

Por fim, os resíduos orgânicos testados para a produção *in vitro* de *P. ostreatus*, (serragem de peroba, composto exaurido de cogumelos e casca de eucalipto), nas diferentes concentrações (100, 75, 50 e 25%), combinados de forma complementar com a serragem de eucalipto, mostraram-se eficientes no cultivo de *P. ostreatus*, com exceção de dois tratamentos: T5 (50% casca de eucalipto + 50% serragem de eucalipto) e T2 (100% de composto exaurido), os quais possuem crescimento micelial médio menor que o grupo controle (100% serragem de eucalipto) (Figura 26).

1.4.3. Produção de cogumelos

Ao longo dos setenta e cinco dias de produção de cogumelos em estufa climatizada, foram tiradas algumas fotos dos cogumelos (Figura 27).

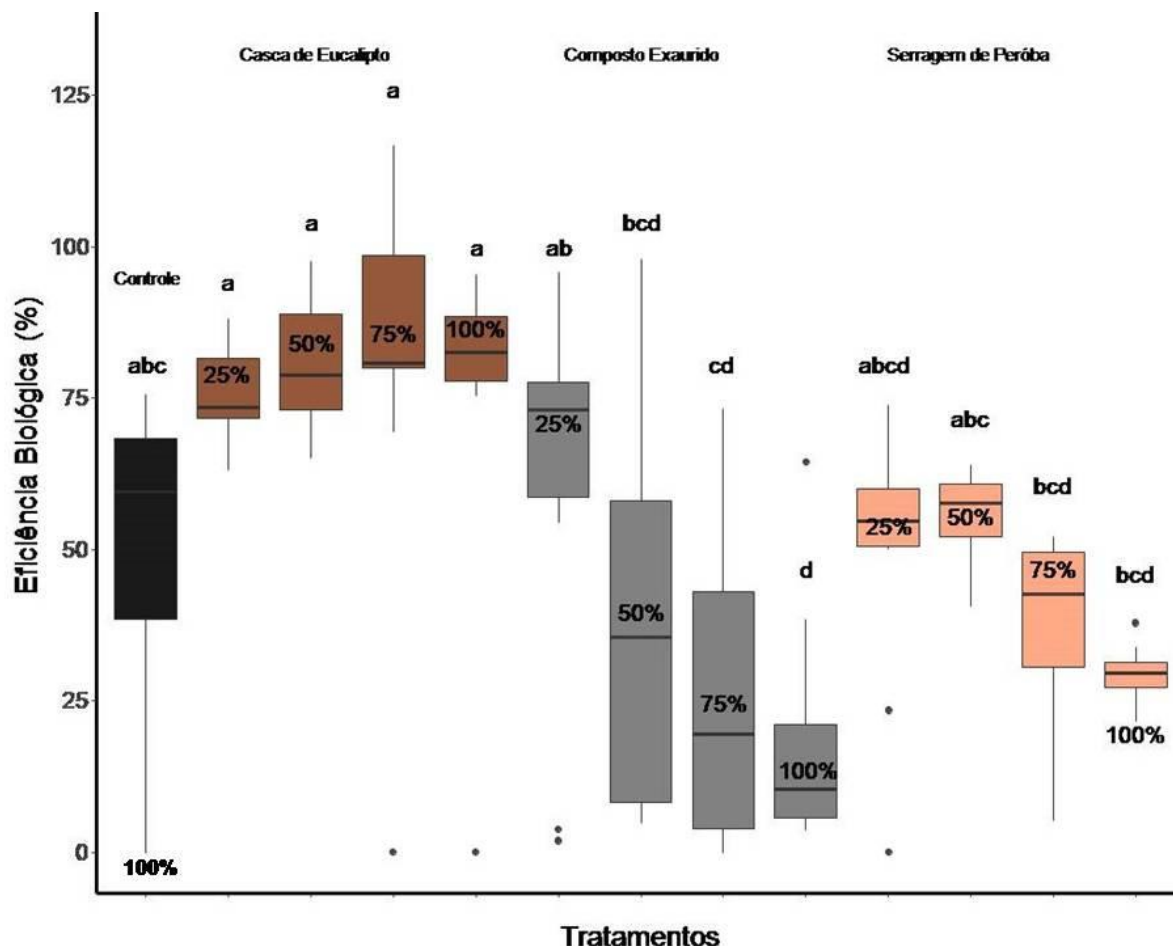
Figura 27 - Produção de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* ao longo dos setenta e cinco dias de incubação em estufa climatizada.



O teste de Tukey (5%), com ajuste para comparações múltiplas, foi realizado para diferenciação ou não da eficiência biológica entre os treze tratamentos (Figura 28), os quais estão dispostos na figura por tipo de substrato, sendo representados através das médias da eficiência biológica e suas variações referentes às dez repetições em cada tratamento.

Como todos os tratamentos têm concentrações balanceadas com a serragem de eucalipto, exceto aqueles que representam 100% do substrato, pode-se visualizar através da Figura 28, que o tipo de substrato foi agrupado por cores, variando somente a concentração.

Figura 28 - Diferença da eficiência biológica entre os treze tratamentos, representada pelo teste de Tukey (5%).



Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância. As porcentagens descritas na figura foram acrescidas de forma complementar com a serragem de eucalipto.

No grupo dos tratamentos com casca de eucalipto, representado pela cor marrom, pode-se observar que os substratos nas quatro concentrações (100, 75, 50 e 25%) do resíduo não diferem entre si e nem do grupo controle (Figura 28), possuindo as médias marginais mais altas dentre os demais tratamentos, de aproximadamente 75% de eficiência biológica (Figura 28). Um resultado similar foi encontrado no trabalho de Luz et al. (2012), no qual avaliaram a linhagem de *P. ostreatus* (PLO 2) na formulação de 80% de casca de eucalipto e 20% de farelo de arroz como suplemento, e verificaram a eficiência biológica em torno de 75%, sendo esta, a média marginal mais alta dentre os demais tratamentos testados (casca de café e serragem).

Os tratamentos com concentrações de composto exaurido, o qual é representado pela cor cinza, demonstram que quanto maior for a concentração do composto menor é a média marginal da eficiência biológica (Figura 28). A maior média marginal dos substratos a base de composto exaurido é na concentração de 25% do composto complementado com 75% de serragem de eucalipto, com eficiência biológica em torno de 75%. Este resultado é similar no trabalho de Ashrafi et al. (2014), apresentando que nas concentrações de 20% de composto exaurido de cogumelos, 60% de serragem e 20% de farelo de trigo, obteve-se a maior eficiência biológica (107,5%), em relação às demais formulações testadas. Outra semelhança verificada entre as duas pesquisas foi na relação C/N destes dois tratamentos, a qual representa 35,7/1 para os autores e 34/1 neste trabalho (Tabela 3).

A cor rosa representa o grupo dos substratos a base de serragem de peroba do Norte, o qual demonstra que quanto maior for a concentração do resíduo, menor é a média marginal da eficiência biológica. Entretanto, a concentração de peroba do Norte nos substratos não influenciou no aumento da eficiência biológica, não havendo diferença estatística entre estes tratamentos, bem como, com o grupo controle (Figura 28). Não foram encontrados na literatura trabalhos de cultivo de cogumelos em peroba do Norte (*Goupia glabra*), no entanto, os resultados indicam que este resíduo pode ser utilizado como substrato alternativo à serragem de eucalipto.

Figueiró e Graciolli (2011) avaliaram a produção de *Pleurotus florida* em cultivo axênico em diversos resíduos agrícolas (palhas de arroz, feijão, trigo e sorgo, folha de bananeira e sabugo de milho) e concluíram que as maiores produtividades foram encontradas nos substratos com relação C/N em torno de 45/1. Isso pode ser observado no presente trabalho, no qual as melhores produtividades de cogumelos foram encontradas nos tratamentos à base de casca de eucalipto nas concentrações 25, 50, 75 e 100% (Figura 28), os quais obtiveram relação C/N de 46/1, 46/1, 39/1 e 60/1, respectivamente (Tabela 2).

Por fim, os resíduos orgânicos testados (serragem de peroba do Norte, composto exaurido de cogumelos e casca de eucalipto) para a produção de *P. ostreatus* em estufa climatizada, nas diferentes concentrações (100, 75, 50 e 25%), mostraram-se eficientes no cultivo de *P. ostreatus*, com exceção do tratamento 2

(100% de composto exaurido), o qual possui eficiência biológica menor que o grupo controle (100% serragem de eucalipto).

1.5 CONCLUSÃO

Os resíduos orgânicos testados (serragem de peroba do Norte, composto exaurido e casca de eucalipto) nas diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100%), sendo combinados ou não com a serragem de eucalipto, podem ser aproveitados para o crescimento micelial de *P. ostreatus*, em substituição ao substrato convencional (a base de 100% serragem de eucalipto), com exceção do composto exaurido na sua forma integral (100%) e ao tratamento correspondente a 50% serragem de eucalipto com 50% casca de eucalipto.

Para a produção de cogumelos, os resíduos testados também podem ser utilizados nas diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100%), sendo combinados ou não com a serragem de eucalipto em substituição ao substrato convencional (a base de 100% serragem de eucalipto), as quais obtiveram eficiência biológica iguais ao grupo controle, com exceção do composto exaurido na sua forma integral (100%).

A análise química dos substratos permitiu caracterizar a disponibilidade de nitrogênio, matéria orgânica e carbono antes e depois do cultivo de cogumelos, bem como, a taxa umidade, relação C/N e pH. Conclui-se com esta análise que quanto maior for o teor de nitrogênio no substrato, consequentemente, menor a relação C/N e menor eficiência biológica.

REFERÊNCIAS

- APRUZZESE, I. et al. Biogas Production From Organic Wastes Of Paper and Leather Industries. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, n. 4, p. 8-14, 2017.
- ASHRAFI, R. et al. Recycling of Spent Mushroom Substrate for the Production of Oyster Mushroom. **Research in Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 13-21, 2014.
- ATILA, F. Biodegradation of different agro-industrial wastes through the cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr) Kumm. **Journal of Biological and Environmental Science**, v. 11 n. 31, p. 1-9, out. 2017.
- BINKLEY, D. et al. The interactions of climate, spacing and genetics on clonal Eucalyptus plantations across Brazil and Uruguay. **Forest Ecology and Management**, v. 405, p. 271-283, dez. 2017.
- BONONI, V. L. et al. **Cultivo de Cogumelos Comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1999.
- CARVALHO, C. S. M. et al. Applicability of the use of waste from diferente banana cultivars for the cultivation of the oyster mushroom. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n.2, p. 819-826, 2012.
- CARVALHO, C. S. M. et al. Cultivo in vitro de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de bananeira. **Ambiência**, Guarapuava, v.9, n.3, p. 651-660, set./dez. 2013.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value Medicinal Effect and Environmental Impact**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The Cultivation and Environmental Impact of Mushrooms. **Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science**, Oxford, p.1-38, mar. 2017. Disponível em: <https://oxfordre.com/environmentalscience/view/10.1093/acrefore/9780199389414.01.0001/acrefore-9780199389414-e-231>. Acesso em: 21 jan. 2020.
- CORREIA, D. S. et al. Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 34, 2011. ISSN: 1517-8498.

DA LUZ, J. M. R. et al. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 575-580, 2013.

DEGREEF, J. et al. Wild edible mushrooms, a valuable resource for food security and rural development in Burundi and Rwanda. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 20, n. 4, p. 441-452, 2016.

EASIN, M. N. et al. Mushroom Cultivation as a Small-Scale Family Enterprise for the Alternative Income Generation in Rural Bangladesh. **International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries**, v. 5, n. 1, p. 1-8, fev. 2017.

EDAE, T.; ALEMU, M. Selection and optimization of lignocellulosic substrate for laccase production from *Pleurotus* species. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 8, n. 4, p. 38-48, 2017.

Eira A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). In: III REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 2000, Mogi das Cruzes. **Anais [...]** São Paulo: Instituto Biológico, 2000. p.71-81.

ELLI, E. F. et al. Assessing the growth gaps of Eucalyptus plantations in Brazil – Magnitudes, causes and possible mitigation strategies. **Forest Ecology and Management**, v. 451, n. 117464, set. 2019.

FAVARA, G. M. Use of spent compost in the cultivation of *Agaricus blazei*. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n. 31, p.3473-3480, ago. 2014.

FELFLI, F. F. et al. Biomass briquetting and its perspectives in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 236-242, 2011.

FERNANDES, A. et al. Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. **Food Chemistry**, v. 169, p. 396-400, 2015.

FIGUEIRÓ, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 924-930, set./out. 2011.

GANESAN, K. e XU, B. Anti-Obesity Effects of Medicinal and Edible Mushrooms. **Molecules**, v. 23, n. 11, p.1-26, nov. 2018.

GOMES, D. et al. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2016.

GIMÉNEZ, P.; GONZÁLES, J. E. Elaboración de nuevos sustratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. basados en sustratos degradados por el

cultivo de hongos. **Información Técnica Económica Agraria**, v. 105, n. 2, p.89-98, 2009.

GRIMM, D.; WÖSTEN, H. A. B. Mushroom cultivation in the circular economy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 7795–7803, jul. 2018.

GURGEL, E. S. et al. Conhecendo Espécie de Plantas da Amazônia: Cupiúba: (*Goupia glabra* Aubl. – Goupiaceae). **Comunicado Técnico**, Belém, v. 262, mar. 2015, 1. ed. Embrapa Amazônia Oriental.

HOORNWEG, D.; BHADA-TATA, P.; KENNEDY, C. Environment: Waste production must peak this century. **Nature**, v. 502, n. 7473, p.615-617, 2013.

HILDÉN, K.; MÄKELÄ, M. R. **Role of Fungi in Wood Decay**. In: Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2018.

JUIZO, F. et al. Qualidade da casca e da madeira de nove espécies de Eucalipto para produção de carvão vegetal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Pernambuco, v. 12, n. 3, p. 386-390, 2017.

KAMITSUJI, H.; HONDA, Y.; WATANABE, T. et al. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 287-294, 2004.

KAPAH, M. Recent Advances in Cultivation of Edible Mushrooms. In: SINGH B. P.; LALLAWMSANGA, C.; PASSARI, A. K. **Biology of Macrofungi, Fungal Biology**. 1. ed. Springer, 2018. cap. 13, p. 265-286.

KHAN, N. A. et al. Role of various supplementary materials with cotton waste substrate for production of *Pleurotus ostreatus* an oyster mushroom. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 5, p. 1911-1915, 2017.

KLEIN, D. R. et al. Aspectos gerais e silviculturais de *Cordia americana*, *Aspidosperma polyneuron*, *Toona ciliata* e *Khaya* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.15, n.2, p.155-164, 2016.

LUZ, J. M. R. et al. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1508-1515, 2012.

MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K. S. e DE VRIES, R. P. Degradation and Modification of Plant Biomass by Fungi. In: NOWROUSIAN, M. **Fungal Genomics**. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), Berlin: Springer, 2014, cap. 8, p. 175-208.

MASEVHE, M. R.; SOUNDY, P & TAYLOR, N. J. Alternative substrates for cultivating oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*), **South African Journal of Plant and Soil**, v. 33, n. 2, p. 97-103, 2016.

MARLINA, L.; SUKOTJO, S.; MARSUDI, S. Potential of Oil Palm Empty Fruit Bunch (EFB) as Media for Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* Cultivation. **Procedia Chemistry**, v.16, pp. 427-431, 2015.

MARTINS, O. G. et al. Sobra de alimentos como alternativa para a formulação de novos substratos para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycota, Fungi). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 11, n. 2, p. 505-518, 2018.

MARTINS, Thales G. V. et al. Nutrient accumulation in Eucalyptus bark at different population densities. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 23, n. 1, p. 40-46, 2019.

MASRI, H. J. et al. The Edible Mushroom *Pleurotus* spp.: II. Medicinal Values. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**. vol. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

MENG, X. et al. Effect of pig manure on the chemical composition and microbial diversity during co-composting with spent mushroom substrate and rice husks. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 22-30, 2018.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, v. 135 n. 3, p. 370–384, 1972.

NESLEK, J. B; FORESTELL, C. A. Vegetarianism as a social identity. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, p. 45-51, 2020.

NUMAZAWA, S. Características do carvão vegetal de cupiúba (*Goupia glabra*, AUBL). **FCAP: Informe Técnico**, Belém, v. 15, 1990. Disponível em: repositorio.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/598.

PATCHAYE, M. et al. Microbial Management of Organic Waste in Agroecosystem. *In*: PANPATTE, D. G. et al. **Microorganisms for Green Revolution**. Springer, 2018. cap. 3, p. 45-73.

PISKA, K.; SUŁKOWSKA-ZIAJA, K.; MUSZYŃSKA, B. Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) – its dietary significance and biological activity. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 16 n. 1, p. 151–161, 2017.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.

RIZKI, M.; TAMAI, Y. Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 1695–1702, 2011.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. *In*: ZIED, D. C.; PARDO-GIMÉNEZ, A. **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**, John Wiley & Sons Ltd, 2017. cap. 2, p. 5-13.

SALES, A.; CANDIAN, M.; CARDIN, V. S. Evaluation of the mechanical properties of Brazilian lumber (*Goupia glabra*) by nondestructive techniques. **Construction and Building Materials**, v. 25, p. 1450-1454, 2011.

SALES-CAMPOS, C.; MINHONI, M. A. M.; ANDRADE, M. C. N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da amazônia. **Interciencia**, Caracas, v. 35, n. 3, p. 198-201, mar. 2010.

SANTAROSA, E. et al. **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Brasília, DF: Embrapa, p. 138, 2014.

SHARMA, S.; YADAV, R. K. P.; POKHREL, C. P. Growth and Yield of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates. **Journal on New Biological Reports**, v. 2, n. 1, p. 3-5, fev. 2013.

SILVA, G. C. P. A. et al. Substratos suplementados com pós-colheita de Shiitake como alternativa na produção de *Pleurotus ostreatus*. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 447-454, 2019.

SIQUEIRA, O. A. P. A. et al. New substrates for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* using exhausted compost. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n. 26, p. 2295-2301, jun. 2016.

SNEDECOR, G. W. E.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1972.

VALENCIA DE ITA, Ma. Angeles et al. Evaluation of Substrates in the Elaboration of Secondary Inoculum for the Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. **Journal of pure and Applied Microbiology**, v.12, n. 2, p. 679-686, 2018.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, vol. 2015. p. 14, 2015.

VIEIRA, F. R.; DE ANDRADE, M. C. N. Optimization of substrate preparation for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation by studying different raw materials and substrate preparation conditions (composting: phases I and II). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 190, 2016.

WESTFALL, P. H. et al. **Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System**, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1999.

YAMAUCHI, M. et al., Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on fermented moso bamboo sawdust. **Journal of King Saud University**, v. 31, n. 4, p. 490-494, 2019.

ZHU, H. et al. Combined alkali and acid pretreatment of spent mushroom substrate for reducing sugar and biofertilizer production. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 257-266, 2013.

ZIOBER, B. R.; ZANIRATO, H. S. Ações para a salvaguarda da biodiversidade na construção da usina hidrelétrica Itaipu binacional. **Ambiente e Sociedade**. v.17, n. 1, p. 59-78, 2014.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DE *Pleurotus ostreatus* CULTIVADO NA PRESENÇA DE SUBSTRATOS PREPARADOS A PARTIR DE DIFERENTES RESÍDUOS ORGÂNICOS

2.1 INTRODUÇÃO

Há muitos anos a degradação de polissacarídeos vegetais por fungos é tema de estudo devido à sua relevância em muitas aplicações industriais, tais como, papel e celulose, rações, bebidas, têxteis e detergentes e a produção de alimentos (BENOIT et al., 2015).

Tendo em vista que na natureza os fungos degradadores de biomassa vivem em conjunto com diversos outros micro-organismos, presume-se que espécies diferentes de fungos tenham como alvo componentes distintos do substrato e os degradem usando combinações enzimáticas diferentes (BENOIT et al., 2015).

Sabe-se que os fungos de podridão branca, como é o caso do *Pleurotus ostreatus*, secretam enzimas que são capazes de degradar lignina, pois secretam oxidoredutases, tais como: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (SINGH, 2013).

Neste contexto, este capítulo teve como objetivo caracterizar o perfil enzimático do fungo *P. ostreatus* quanto a sua capacidade de produzir Lacase, Manganês Peroxidase e Versátil Peroxidase quando cultivados na presença de diferentes substratos preparados a partir de resíduos orgânicos, como, serragem de eucalipto, serragem de peroba, cascas de eucalipto e composto exaurido de *P. ostreatus*.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Gerais

Caracterizar o perfil enzimático de *Pleurotus ostreatus* quanto a Lacase, Manganês Peroxidase e Versátil Peroxidase, em meios de cultivo a base de resíduos orgânicos, sendo estes, cascas de eucalipto, serragem de peroba e composto exaurido

2.2.2 Específicos

- Avaliar a concentração de proteínas em cada substrato para calcular a atividade enzimática específica, através do coeficiente de extinção molar.
- Avaliar a produção de Lacase, Manganês Peroxidase e Versátil Peroxidase através dos substratos ABTS, Sulfato de Manganês e *Reactive Black 5*, respectivamente, para verificação em qual dos dias de incubação (3, 6, 10, 13, 17 e 20 dias) houve a maior produção das enzimas.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Produção enzimática por *Pleurotus ostreatus*

Foram utilizados para a avaliação da produção enzimática produzidos treze tipos de meios de cultivo diferentes, com dez repetições cada um, utilizando como matéria prima os resíduos: casca de eucalipto, serragem de peroba, serragem de eucalipto e composto exaurido de cogumelos, previamente produzidos.

Os tratamentos foram formulados a partir de serragem de eucalipto, substrato convencional na produção axênica de *P. ostreatus*, intercalando-o com os resíduos agrícolas nas seguintes proporções (Representadas na tabela 5):

Todos os tratamentos foram autoclavados a 121°C por um período de 4 horas.

Tabela 4 - Formulações dos tratamentos em base seca.

Formulação (g), em base seca				
Tratamentos	Serragem de eucalipto	Casca de Eucalipto	Composto Exaurido de <i>P. ostreatus</i>	Serragem de peroba
1 - 100% Serragem de Eucalipto (Controle)	8640			
2 - 100% Composto Exaurido			9648	
3 - 100% Casca de Eucalipto		8136		
4 - 25% Casca de Eucalipto e 75% Serragem de Eucalipto	6480	2034		
5 - 50% Casca de Eucalipto e 50% Serragem de Eucalipto	4320	4068		
6 - 75% Casca de Eucalipto e 25% Serragem de Eucalipto	2160	6102		
7 - 25% Composto Exaurido e 75% Serragem de Eucalipto	6480		2412	
8 - 50% Composto Exaurido e 50% Serragem de Eucalipto	4320		4824	
9 - 75% Composto Exaurido e 25% Serragem de Eucalipto	2160		7236	
10 - 100% Serragem de Peroba do norte				8640
11 - 25% Serragem de Peroba do norte e 75% Serragem de Eucalipto	6480			2160
12 - 50% Serragem de Peroba do norte e 50% Serragem de Eucalipto	4320			4320
13 - 75% Serragem de Peroba do norte e 25% Serragem de Eucalipto	2160			6480

Para todos os tratamentos a umidade foi ajustada para 65%. Foram adicionados 2% de calcário calcítico (180 g) e 20% de farelo de trigo (1944 g) em todos os tratamentos.

2.3.2. Preparação dos meios de cultivo

Os treze substratos de cultivo de cogumelos foram utilizados para o crescimento do fungo *P. ostreatus in vitro* e avaliação da atividade enzimática de Lacase, Manganês Peroxidase e Versátil Peroxidase no *Department of Microbiology, University of Helsinki, Finland*.

Para isto, 2g de cada um dos substratos foram vertidos em Erlenmeyers (250mL) e misturados a 100mL do meio de cultura LN-AS (*low-nitrogen asparagine-succinate*), conhecido como meio mínimo. Foram autoclavados e posteriormente, adicionados assepticamente 0,05 mL da solução de vitaminas do complexo B, que pertence ao meio de cultura LN-AS.

Além disso, utilizou-se ainda um grupo controle baseado em 100ml do meio LN-AS e 0,25mL de glicerol. Os frascos foram tampados e mantidos a temperatura ambiente. Em paralelo, a linhagem SB, mesma linhagem utilizada para a produção de cogumelos, foi cultivada em placa de Petri no meio de cultura Agar Extrato de Malte, a partir da qual foi padronizado o inóculo fúngico, com auxílio de um vazador, tendo sido inoculados 4 discos em cada um dos Erlenmeyers com os diferentes tratamentos. Depois de inoculados, os frascos foram incubados a 28°C e mantidos estaticamente em estufa microbiológica.

A primeira coleta do extrato bruto para a quantificação das atividades enzimáticas foi realizada após 3 dias de incubação, seguida por coletas subsequentes após 6, 10, 13, 17 e 20 dias, totalizando 6 amostragens para cada substrato.

Esta coleta foi realizada assepticamente, retirando-se 1,5 mL de cada extrato bruto através de pipetas e transferindo-se para tubos eppendorf, para centrifugação durante 30 segundos, em temperatura ambiente, velocidade máxima (16 000 rpm).

Depois de centrifugadas, as amostras foram aliquotadas em cinco tubos eppendorf, contendo 300 uL cada. Estas, por sua vez, foram identificadas e armazenadas a -20°C. Todas as atividades enzimáticas foram medidas no equipamento laboratorial Tecan Infinite M200, após o vigésimo dia de incubação.

2.3.3. Determinação da atividade de Lacase

A atividade da enzima Lacase foi avaliada através da oxidação de 8uL do substrato 2,2-azino-bis-etilbentiazoline (31.25 mM ABTS) a 420nm, diluído em 192 uL de tampão 50mM de malonato de sódio, pH 4,5. Os extratos brutos foram descongelados a baixa temperatura e foram pipetados 50 uL de cada em triplicatas em placas de 96 orifícios. As placas não foram incubadas antes da reação ser medida.

A atividade foi calculada através da fórmula:

$$Activity = \frac{\Delta A_{\lambda} * V_{tot}}{\epsilon_{product} * V_n * \Delta t * l * k} \quad (2)$$

De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de lacase correspondeu à quantidade de enzimas necessárias para oxidar 1 µmol de substrato por minuto.

2.3.4. Determinação da atividade de Manganês Peroxidase

A atividade enzimática de Manganês Peroxidase foi avaliada através de 50 uL do substrato 0,5mM de Sulfato de Manganês (MnSO₄) em 270nm, 145 uL do tampão 50 mM de malonato de sódio, pH 4.5. O reagente utilizado foi 5uL de 5mM de Peróxido de Hidrogênio (30%). Os extratos brutos foram descongelados em baixa temperatura e foram pipetados 50 uL de cada em triplicatas, em placas de 96 orifícios.

A atividade foi calculada através da fórmula:

$$Activity = \frac{\Delta A_{\lambda} * V_{tot}}{\epsilon_{product} * V_n * \Delta t * l * k} \quad (3)$$

De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de manganês peroxidase correspondeu à quantidade de enzimas necessárias para oxidar 1 µmol de substrato por minuto.

2.3.5. Determinação da atividade de Versátil Peroxidase

A atividade enzimática de Versátil Peroxidase foi avaliada através de 50 uL do substrato *Reactive Black 5* (solução Rb5+Mn), em 598nm, 5 uL de 2.5 mM de peróxido de hidrogênio (30%), 140 uL do tampão 100mM de ácido tartárico, pH 3.0. Os extratos brutos foram descongelados em baixa temperatura e foram pipetados 50 uL de cada em triplicatas nas placas de 96 orifícios.

A atividade foi calculada através da fórmula:

$$Activity = \frac{\Delta A_{\lambda} * V_{tot}}{\epsilon_{product} * V_n * \Delta t * l * k} \quad (4)$$

De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de versátil peroxidase correspondeu à quantidade de enzimas necessárias para oxidar 1 µmol de substrato por minuto.

2.3.6. Concentração de proteína

Para a determinação da concentração de proteínas foi utilizado o kit *BCA Protein Assay* (ácido bicinconínico), de acordo com as orientações do fabricante: em triplicatas nas placas de 96 orifícios foram pipetados 25 uL de cada extrato bruto e 200 uL de BCA, as reações foram homogeneizadas por 30 segundos manualmente, incubadas a 37°C, durante 30 minutos em estufa, resfriadas a temperatura ambiente e medidas em 562nm.

Para avaliar a concentração de proteínas realizou-se a determinação do coeficiente de extinção molar que foi baseada em uma curva padrão, a qual foi confeccionada com uma solução de albumina de soro bovino, diluída em concentrações entre 500 e 2500 ug/mL, respeitando a lei de Lambert-Beer, onde o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra (µmols/mL) foi traçado, determinando o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ε) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que A= Absorbância, ε= absortividade, b= caminho óptico (1 cm) e c= concentração. Como b= 1, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ε é dado por µmols. µL-1. cm-1.

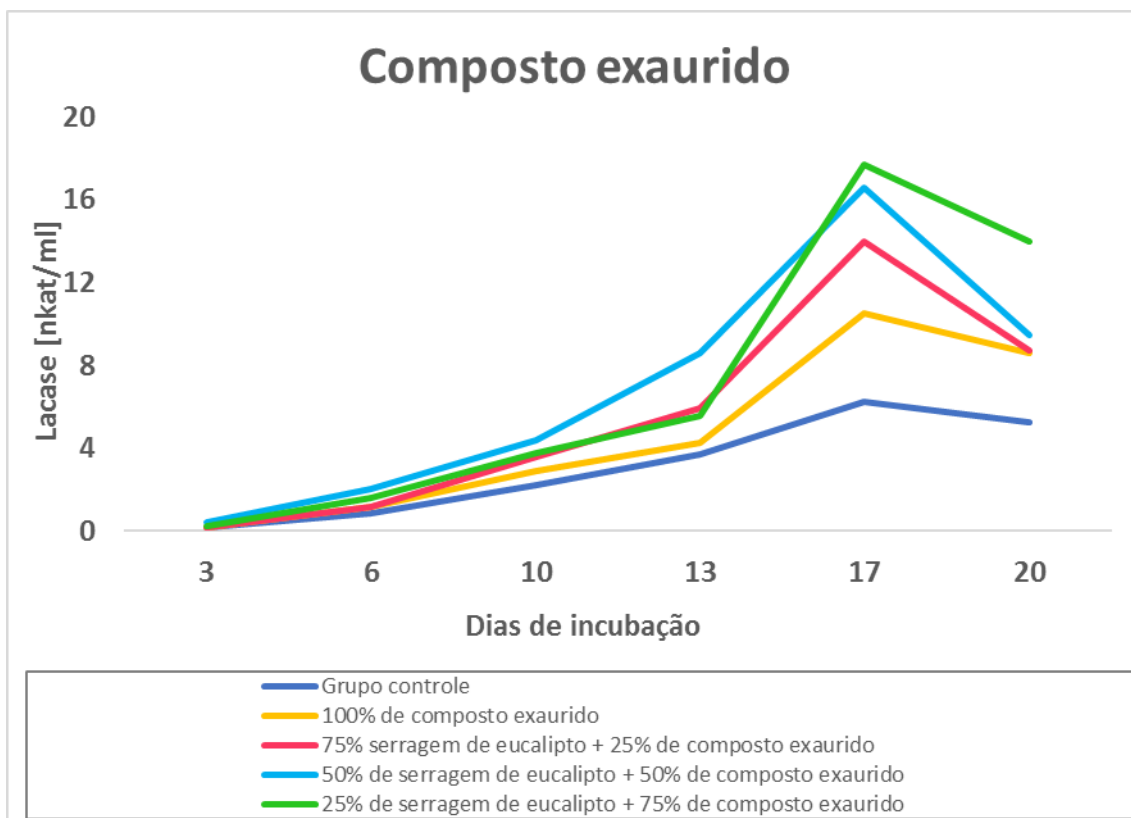
Após a determinação da concentração de proteínas foi possível calcular a atividade específica das enzimas: lacase, manganês peroxidase e versátil peroxidase, correlacionando-se a concentração de proteínas com a atividade enzimática.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Lacase

Os gráficos abaixo representam a atividade enzimática de Lacase produzida pelo *P. ostreatus* na presença do composto exaurido (Figura 29), da casca de eucalipto (Figura 30) e da serragem de peroba (Figura 31), no período no qual foi realizada a amostragem, sendo este, 3, 6, 10, 13, 17 e 20 dias.

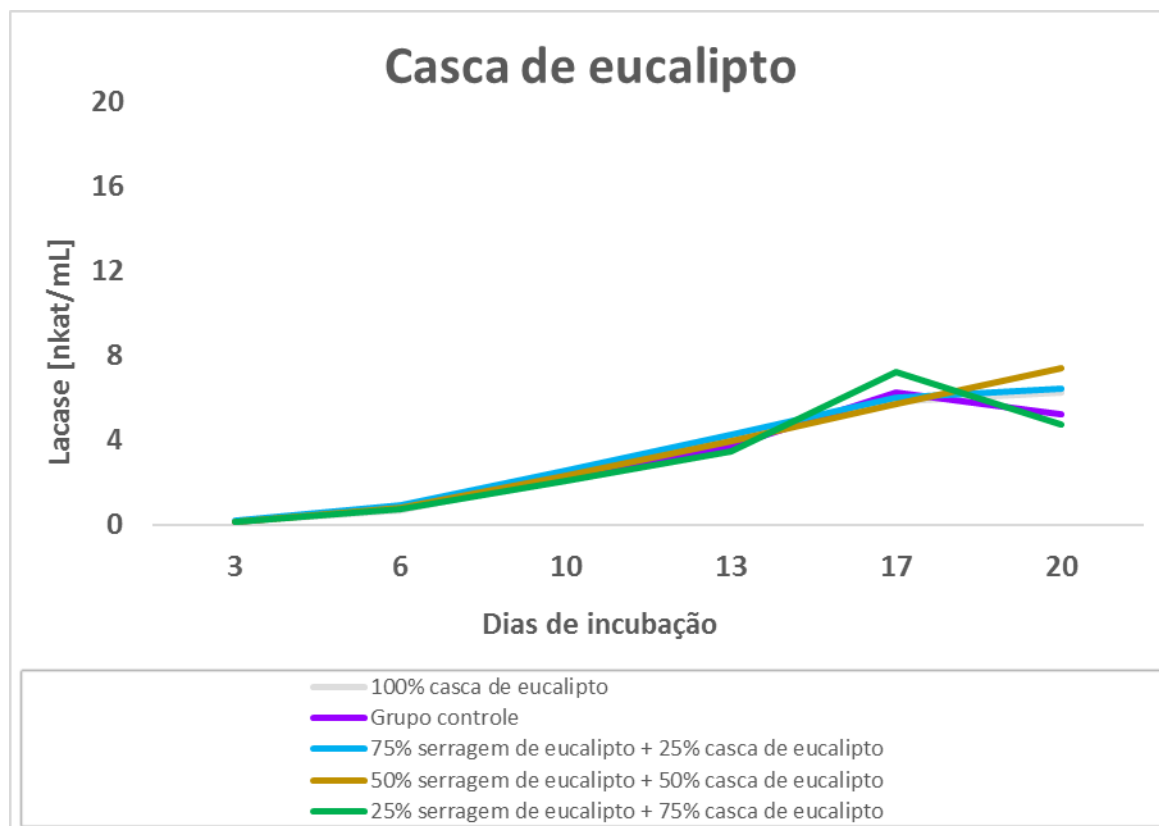
Figura 29 - Atividade de Lacase (nkat/mL) produzida pelo *Pleurotus ostreatus* na presença de composto exaurido



Fonte: elaborado pela autora. O controle corresponde a 100% serragem de eucalipto;

Com relação aos tratamentos testados com extratos brutos a partir de composto exaurido, todos tiveram a maior atividade enzimática no décimo sétimo dia, sendo, o tratamento correspondente a 75% de composto exaurido, no qual a lacase apresentou atividade igual a 17,71 nkat/mL, seguido pelos tratamentos de 50% do composto, 25%, 100% e 0%, com atividades iguais a 16,62 nkat/mL, 13,98 nkat/mL, 10,49 nkat/mL e 6,25 nkat/mL, respectivamente.

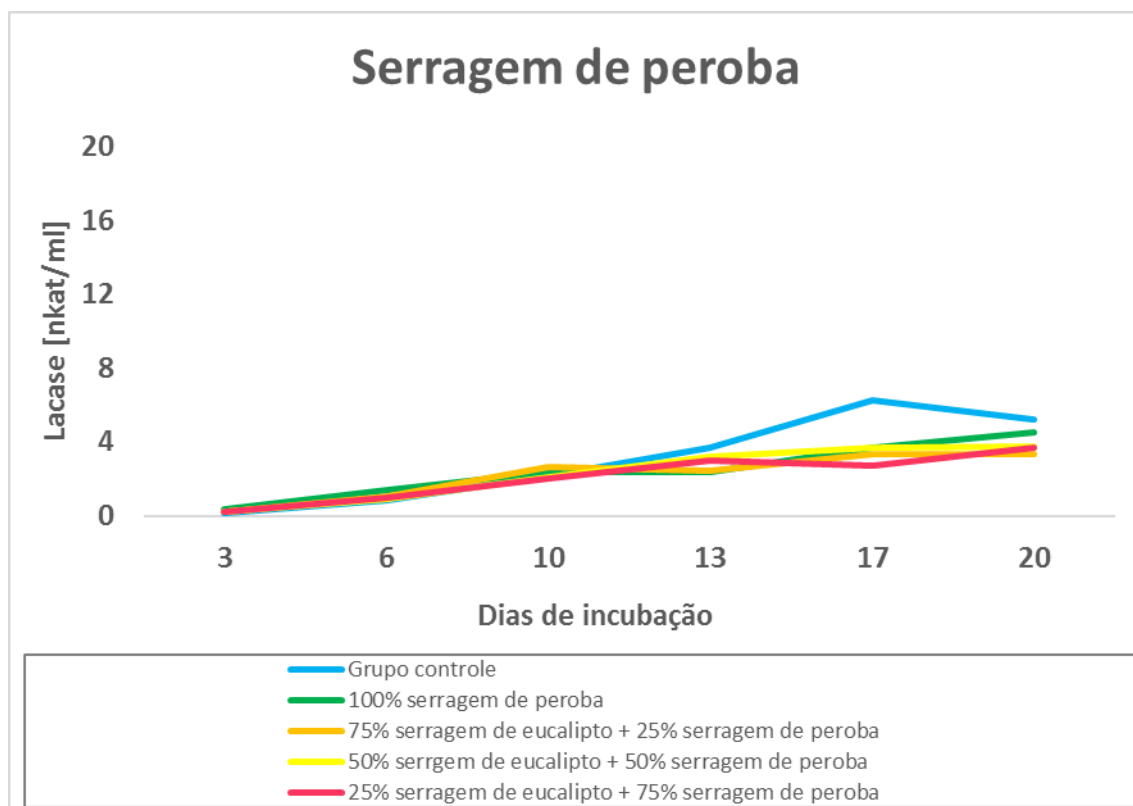
Figura 30 - Atividade de Lacase (nkat/mL) produzida pelo *Pleurotus ostreatus* na presença da casca de eucalipto



Fonte: elaborado pela autora. O controle corresponde a 100% serragem de eucalipto;

Para os tratamentos a base de casca de eucalipto, a maior média de atividade enzimática foi igual a 7,42 nkat/mL no tratamento com 50% da casca de eucalipto, no 20º dia de incubação. Este tratamento manteve linha crescente até o último dia da incubação, diferentemente dos demais tratamentos, os quais atingiram atividade máxima no décimo sétimo dia e diminuíram no último dia de incubação.

Figura 31 - Atividade de Lacase (nkat/mL) produzida pelo *Pleurotus ostreatus* na presença da serragem de peroba



Fonte: elaborado pela autora. O controle corresponde a 100% serragem de eucalipto;

O gráfico que representa a atividade da lacase nos substratos a partir de serragem de peroba (Figura 31), sugere que os tratamentos tiveram atividades similares ao longo do período de incubação. O grupo controle atingiu a média mais alta no décimo sétimo dia de incubação, sendo este, igual a 6,26 nkat/mL.

A análise de dados permitiu verificar que a maior atividade enzimática para todos os tratamentos foi no décimo sétimo dia de produção, com posterior diminuição da mesma para a maioria dos tratamentos. Diferentemente do estudo de Singh et al. (2013), que verificou atividade máxima de lacase produzida por *P. ostreatus* igual a 436,6 U/mL no nono dia de produção. Edae e Alemu (2017) avaliam a produção de lacase por *P. ostreatus* e concluíram que o período mais produtivo para esta enzima foi no décimo dia, no qual a atividade atingiu 0,142 U/mL. Luz et al. (2012) também avaliaram a produção de lacase para duas linhagens de *P. ostreatus* e concluíram que o período de maior atividade enzimática para as duas linhagens foi no décimo dia.

De acordo com Edae e Alemu (2017), após o período de crescimento total do *P. ostreatus* em meios de cultura lignocelulósicos para lacase, a atividade registrada mostrou que aqueles que continham asparagina e alanina induziram maior produção desta enzima, com uma atividade igual a 0,292 e 0,264 U/mL, respectivamente. Assim, os autores concluíram que a asparagina e a alanina são potentes indutores, sendo a asparagina, o melhor para o organismo de estudo. O meio mínimo utilizado neste estudo (LN-AS) é constituído por asparagina, podendo este, ser um fator que possa ter contribuído para a alta produção de lacase observada em todos os tratamentos.

Os mesmos autores indicam através dos resultados de sua pesquisa que uma temperatura de incubação de 25, 28 e 30°C foi boa para a produção de lacase, sendo que, com 28°C observaram maior atividade (0,142 U/ml). Na presente pesquisa, a temperatura utilizada na produção foi 28°C, sendo este, um fator que também pode ter contribuído para a alta produção da enzima. Em contrapartida, Othman et al. (2014) avaliaram que a lacase produzida por *P. ostreatus* apresentou atividade máxima em temperatura igual a 50°C.

Como dito anteriormente, o fator pH do meio de cultivo também influencia na produção de lacase. Neste trabalho, o pH foi ajustado para 4.5 no momento em que o meio de cultivo foi preparado, não sendo avaliado posteriormente. Edae e Alemu (2017) avaliaram o efeito do pH na produção de lacase por *P. ostreatus*, concluindo que a maior produção (0,159 U/mL) foi encontrada no pH 5.5. Em contrapartida, Othman et al. (2014) avaliaram a produção de lacase por *P. ostreatus* e concluíram que o pH ótimo para produção da enzima foi igual a 3.0.

Com relação ao fator relação C/N, observou-se no presente estudo que os tratamentos à base de composto exaurido, nos quais ocorreu maior produção de lacase, também apresentaram as menores relações C/N, com alta concentração de nitrogênio. Kurt e Buyukalaca (2010) avaliaram a produção enzimática de lacase por *P. ostreatus* em resíduos agrícolas e concluíram que as maiores atividades ocorreram nos tratamentos suplementados com farelo de trigo, os quais continham as menores relações C/N, bem como, as maiores concentrações de nitrogênio. A mesma observação ocorreu no trabalho de Luz et al. (2012), sugerindo que os

tratamentos suplementados com farelo de arroz como fonte de nitrogênio, aumentam a produção enzimática de lacase no cultivo de *P. ostreatus*.

2.4.2. Manganês Peroxidase

Não foi observada atividade enzimática para manganês peroxidase em nenhum dos tratamentos avaliados.

De acordo com Giardina et al. (2000), uma composição de lignina diferente, bem como, teores de nitrogênio diferentes, podem estimular a produção de MnP de maneiras diferentes no cultivo de *P. ostreatus* em serragem de madeira. Também concluem que o aumento de Mn^{2+} no meio de cultura aumenta fortemente a produção de MnP durante a fermentação do estado sólido.

Luz et al. (2012) observaram que a atividade enzimática de manganês peroxidase foi menor em relação a atividade enzimática de lacase para *P. ostreatus* em substratos a base de resíduos agroindustriais, sendo estes, serragem, cascas de café e cascas de eucalipto, suplementados com farelo de arroz. Entretanto, estes autores comparam a atividade enzimática de MnP entre duas linhagens de *P. ostreatus* e concluíram que, independentemente do substrato, uma linhagem produziu mais do que a outra, sugerindo que a variabilidade genética também é um fator que pode influenciar na expressão de enzimas lignocelulolíticas.

De acordo com Kamitsuji et al. (2004), a atividade máxima de MnP para *P. ostreatus* em meios de cultura a base de glucose e extrato de levedura foi observada no 30º dia de incubação. Além disso, a adição de peptona em um dos meios de cultura avaliados pelo autor promoveu a produção de MnP, bem como, o crescimento micelial.

Entretanto, os meios de cultura avaliados neste estudo a base de diferentes substratos orgânicos (composto exaurido, serragem de peroba e casca de eucalipto) podem não ter estimulado a produção de MnP devido às condições a que foram avaliados, sendo estas, pH, teor de nitrogênio, temperatura e tempo de incubação.

2.4.3. Versátil Peroxidase

Assim como para a manganês peroxidase, também não houve produção de versátil peroxidase em nenhum dos tratamentos avaliados, podendo este fato ocorrer devido a esta ser uma enzima dependente de MnP.

2.5 CONCLUSÃO

Os meios de cultura a base de composto exaurido atingiram as médias mais altas de atividade enzimática, estimulando, especialmente, a produção de lacase por *P. ostreatus*.

A Manganês Peroxidase, bem como Versátil Peroxidase não foram produzidas nos meios de cultura utilizados e nas condições descritas, havendo a necessidade de estudos futuros para avaliar a produção destas duas enzimas, bem como, de outras enzimas que também são importantes no crescimento de *P. ostreatus*.

REFERÊNCIAS

- BENOIT, I. et al. Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. **Biotechnology and Biofuels**, v. 8, n. 107, 2015.
- CORREIA, D. S. et al. Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 34, 2011. ISSN: 1517-8498.
- EDAE, T.; ALEMU, M. Selection and optimization of lignocellulosic substrate for laccase production from *Pleurotus* species. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 8, n. 4, p. 38-48, 2017.
- GIARDINA, P. et al. Manganese Peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 376, n. 1, p. 171-179, 2000.
- KAMITSUJI, H.; HONDA, Y.; WATANABE, T. et al. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 287-294, 2004.
- KURT, S.; BUYUKALACA, S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3164–3169, 2010.
- LUZ, J. M. R. et al. Lignocellulolytic enzyme production of *pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1508-1515, 2012.
- MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K. S. e DE VRIES, R. P. Degradation and Modification of Plant Biomass by Fungi. *In*: NOWROUSIAN, M. **Fungal Genomics**. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), Berlin: Springer, 2014, cap. 8, p. 175-208.
- HILDÉN, K.; MÄKELÄ, M. R. **Role of Fungi in Wood Decay**. *In*: Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2018.
- OTHMAN, A. M. et al. Purification, Biochemical Characterization and Applications of *Pleurotus ostreatus* ARC280 Laccase. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 12, p. 1418-1439, 2014.

SALAME, T. M. et al. Redundancy among Manganese Peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2405-2415, 2013.

SINGH, M. P.; VISHWAKARMA, S. K.; SRIVASTAVA, A. K. Bioremediation of Direct Blue 14 and Extracellular Ligninolytic Enzyme Production by White Rot Fungi: *Pleurotus* Spp. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 180156, p.1-4, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo de cogumelos em resíduos orgânicos representa uma alternativa muito promissora devido a produção de um alimento que atua, tanto em seus aspectos nutricionais, quanto medicinais, refletindo na saúde humana de forma intrínseca. Reflete também no âmbito socioeconômico, gerando possibilidade de empregos e desenvolvimento do setor rural, podendo rejuvenescer economias locais. A produção de cogumelos atua de forma positiva no meio ambiente devido a capacidade de degradação da estrutura da parede celular vegetal através das atividades enzimáticas. Com essa degradação, os resíduos orgânicos, os quais podem ser um grande problema quando descartados de forma incorreta no meio ambiente, se tornam menores e possíveis de serem assimilados por outros seres vivos e introduzidos novamente no meio ambiente como forma de nutrientes.

Os fungicultores já possuem diversas opções de substratos para o cultivo de *P. ostreatus*, entretanto, os resíduos utilizados nesta pesquisa se encontram altamente disponíveis em diversas regiões do país, podendo ser aproveitados em seu cultivo em diversos locais e a um baixo custo de obtenção, sendo estes, possíveis fatores que afetam o Sistema de produção e que podem interferir em diversos aspectos, tais como a diminuição do custo de produção e a praticidade de obtenção do substrato.

REFERÊNCIAS

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The Cultivation and Environmental Impact of Mushrooms. **Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science**, Oxford, p.1-38, mar. 2017. Disponível em: <https://oxfordre.com/environmentalscience/view/10.1093/acrefore/9780199389414.01.0001/acrefore-9780199389414-e-231>. Acesso em: 21 jan. 2020.

KAPAH, M. Recent Advances in Cultivation of Edible Mushrooms. *In*: SINGH B. P.; LALLAWMSANGA, C.; PASSARI, A. K. **Biology of Macrofungi, Fungal Biology**. 1. ed. Springer, 2018. cap. 13, p. 265-286.

MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K. S. e DE VRIES, R. P. Degradation and Modification of Plant Biomass by Fungi. *In*: NOWROUSIAN, M. **Fungal Genomics**. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), Berlin: Springer, 2014, cap. 8, p. 175-208.