

Conference Paper

Construction of Bioreactors for Obtaining Mycelium from *Agaricus Brunnescens* and *Pleurotus Ostreatus* Mushrooms Using the Honey Tek Technique

Construcción de biorreactores para la obtención de micelio de los hongos *Agaricus Brunnescens* y *Pleurotus Ostreatus* mediante la técnica Honey Tek

IX CONGRESO
INTERNACIONAL DE
INVESTIGACIÓN DE LA RED
ECUATORIANA DE
UNIVERSIDADES Y
ESCUELAS POLITÉCNICAS Y
IX CONGRESO
INTERNACIONAL DE
CIENCIA TECNOLOGÍA
EMPRENDIMIENTO E
INNOVACIÓN
SECTEI-ESPOCH 2022

Corresponding Author:
Angela Ortiz-Bastidas; email:
angela.ortiz@epoch.edu.ec;
angesofia99@gmail.com

Published: 9 November 2023

Production and Hosting by
Knowledge E

© Angela Ortiz-Bastidas
et al. This article is distributed
under the terms of the
Creative Commons
Attribution License, which
permits unrestricted use and
redistribution provided that
the original author and
source are credited.

 OPEN ACCESS

Angela Ortiz-Bastidas*, Kevin Altamirano-Cabay, and Alfonso Suárez-Tapia

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO (ESPOCH), Riobamba, Ecuador

ORCID

Angela Ortiz-Bastidas: <https://orcid.org/0000-0001-5797-0233>

Abstract

Mycelium cultivation plays an important role in mushroom production and in various biotechnological studies. Submerged fermentation has received much attention as a promising alternative for the efficient production of mushroom biomass and active metabolites. For the following research, bioreactors were constructed to obtain pure mycelium from *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus brunnescens* mushrooms using the Honey technique. This method is based on using honey as the main nutrient for the growth of microorganisms on an industrial scale. In the beginning, spore impressions were extracted by the dry chamber method and inoculated into the honey broth. The bioreactors were dimensioned with a 2.5 L culture chamber, 2 L production, controlled temperature of 28°C, pH = 4, and agitation of 120 revolutions per minute. Conidia/milliliter was quantified every three days with a Neubauer chamber, and the Kjeldahl method was used to identify protein as the main bioactive metabolite of the mycelium. Finally, the mycelium obtained was evaluated on three types of substrates comparing their colonization time. The use of bioreactors in mycelium cultivation is efficient as better mycelium quality, higher biomass yield, and more dispersion on substrates are obtained. It also has the benefits of much better oxygen mass transfer and culture homogeneity. With this technique, physical, chemical, and biological factors can be controlled to produce mushrooms in a much shorter time.

Keywords: *bioreactor, honey technic, mycelial biomass, Agaricus brunnescens, Pleurotus ostreatus.*

Resumen

El cultivo de micelio juega un papel importante en la producción de hongos y en diversos estudios biotecnológicos, el usar la fermentación sumergida ha recibido mucha atención como alternativa prometedora para la producción eficiente de la biomasa de hongos y metabolitos activos. Para la siguiente investigación se construyeron biorreactores con el objetivo de obtener micelio puro de hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* usando la técnica Honey. El método Honey se basa en aprovechar la miel como nutriente principal para el crecimiento de microorganismos a escala industrial. En principio se extraen impresiones de esporas mediante el método de cámara seca y se inoculan en caldo honey. Los biorreactores se dimensionaron con una cámara de cultivo de 2,5 litros, producción de dos litros,



temperatura controlada de 28 grados Celsius, pH igual a cuatro y agitación de 120 revoluciones por minuto. Se cuantificaron los conidios/mililitro cada tres días con una cámara de Neubauer y se usó el método Kjeldahl para identificar la proteína como principal metabolito bioactivo del micelio. Finalmente, el micelio obtenido fue evaluado sobre tres tipos de sustratos comparando su tiempo de colonización. El uso de biorreactores en el cultivo de micelio es eficiente debido a que se obtiene mejor calidad de micelio, mayor rendimiento de biomasa y más dispersión sobre sustratos. Así mismo, posee los beneficios de una transferencia de masa de oxígeno y una homogeneidad de cultivo mucho mejores. Con esta técnica se pueden controlar factores físicos, químicos y biológicos para producir setas en tiempos mucho más cortos.

Palabras Clave: *biorreactor, honey tek, biomasa micelial, Agaricus brunnescens, Pleurotus ostreatus.*

1. Introducción

En la actualidad la producción de hongos comestibles ha ido creciendo constantemente, es así que la especie *Agaricus* es el más cultivado en el mundo, seguido del *Pleurotus* debido a sus propiedades nutricionales, medicinales, valores económicos, sociales y ecológicos [4, 20, 22]. Además, son capaces de transformar toda la biomasa lignocelulósica en alimento nutritivo y orgánico, en comparación con otros cultivos, su ciclo de producción es corto, la inversión es baja, y el sustrato después de la producción puede reutilizarse como fertilizante orgánico y alimento para animales [6,2].

Sin embargo, hoy en día, los productores de hongos emplean el método de fermentación sólida, la cual es muy lenta, con un alto costo de producción y un bajo rendimiento de biomasa, lo que constituye una de las principales dificultades para su producción a gran escala [1, 16]. El desarrollo de procesos de adquisición de micelio en estado sólido está dictado por las propiedades inherentes de estos sistemas heterogéneos, y no es posible tomar muestras durante el desarrollo para determinar las concentraciones correspondientes de biomasa, sustrato y producto [9, 15]. Este hecho se refleja de manera particularmente aguda cuando se requieren estudios cinéticos del proceso. Sin embargo, surgen serios problemas en los sistemas sólidos con la mezcla, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor y el control de la humedad y el pH [28, 3].

La fermentación sumergida micelial de hongos ha recibido mucha atención como una alternativa prometedora para la producción eficiente de la biomasa de hongos comestibles, medicinales y sus metabolitos activos [14, 5, 18]. Por esta razón el objetivo de la siguiente investigación se enfoca en encontrar una alternativa para la obtención de “micelio” mediante la utilización de biorreactores que permitan producir mayor cantidad de biomasa, mejor calidad de micelio en menor tiempo, favoreciendo la adaptación y dispersión del hongo y facilitando su manipulación durante la siembra



[7, 21]. Sin embargo, para que la producción sea exitosa a escala industrial, se deben resolver varios problemas técnicos, incluida la caracterización de las variaciones que ocurren durante el cultivo sumergido de hongos en biorreactores y sus efectos sobre el crecimiento y la formación de productos [13, 24,19].

2. Materiales y métodos

2.1. Aislamiento e identificación de cepas

Se obtuvieron impresiones de esporas de hongos comerciales *Agaricus brunnescens* y *Pleurotus ostreatus* mediante el método de cámara seca a 25°C [25], transcurridos cinco días se hidrataron las esporas con agua estéril en el Laboratorio de Biología Molecular, Celular y Microbiología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para la obtención del micelio primario. Consiguientemente, se tomó 1,0 mL de las esporas hidratadas y se colocó en un portaobjetos para identificar sus estructuras miceliales sobre el microscopio (LEICA-DM300-alemán) con Objetivo 10X. A continuación, se sembró en agar PDA para la purificación del micelio.

2.2. Construcción de los biorreactores

Se dimensionó una cámara de cultivo de 2,5 L, con una producción de dos litros, diámetro interno de 0,06 m y altura 0,24 m. Para controlar la temperatura externa, se construyó un baño maría de vidrio cuadrangular con dimensiones largo 38 cm*ancho 21 cm*base 24,5 cm, acompañado de un termómetro automático con capacidad 80 L a 28°C. Dentro de los biorreactores se agregó un agitador magnético con diámetro de 0,05 m y con 120 rpm. Se dotó dos tapas succionadoras herméticas de 2,5 L cada tapa tuvo dos orificios de un cuarto, uno para succión y otro para facilitar el intercambio de oxígeno.

2.3. Preparación de los caldos

En cada biorreactor se agregó dos litros de agua destilada y 30 mL de miel, se esterilizó por un lapso de 45 minutos a 115°C con una psi. Una vez estéril y con una temperatura de 28°C se procedió a inocular 10 g de micelio puro en cada uno. Estos caldos fueron sometidos a cinco horas de agitación con 120 rpm y 19 horas de incubación a 28°C durante 15 días.



2.4. Determinación curva de crecimiento

Se tomó en tubos un mililitro de cada biorreactor cada tres días, y se incubaron por 24 horas. A continuación, se tomó una muestra con la micropipeta y se colocó en la cámara de Neubauer (ZEIGEN-chino) con 0,100 mm de profundidad y área de 0,0025 mm², se observó en microscopio óptico en Objetivo 10X. Se determinó el cuadrante central de la cuadrícula, y se realizó el conteo de los conidios en cinco cuadrantes. Finalmente se calculó el total de conidios mediante la siguiente ecuación y se realizó la curva de crecimiento entre concentración de conidios/mL vs tiempo (donde: Ci= concentración conidios por mililitro[con/mL]; Co = total número de conidios en los cinco cuadrantes; 50.000 = valor constante de la cámara de Neubauer; FD = factor de dilución) [11]:

$$Ci = Co * 50.000 * FD \quad (1)$$

2.5. Determinación proteínas

La determinación de las proteínas de los medios líquidos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* transcurridos los 20 días se realizó mediante el método de Kjeldahl [26]. El método implicó la digestión con ácido sulfúrico concentrado y una mezcla catalítica para acelerar la reacción, seguida de una destilación térmica con hidróxido de sodio para liberar los iones de amonio retenidos en el ácido bórico.

2.6. Determinación biomasa peso húmedo

Se tomó muestras de cinco mililitros de solución inicial de cada cultivo *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunneceus*, las mismas que fueron colocadas en tubos cada tres días hasta completar los 15 días de incubación. Se centrifugó los tubos a 4000 rpm por un tiempo de 15 minutos. Se filtró cada muestra de cultivo micelial con agua destilada. Por último, se pesó la muestra de biomasa retenida del papel filtro y finalmente se calculó el peso húmedo de la biomasa de ambos hongos *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunneceus* mediante la ecuación (donde: Xhf Hi= biomasa peso húmedo del hongo [g/mL]; p1= papel con biomasa húmeda [g]; p2 = peso papel filtro [g]; v = volumen de la muestra [mL]) [12]:

$$Xhf_{Hi} = \left(\frac{P1 - p2}{v} \right) \quad (2)$$



2.7. Tiempo de propagación sobre sustratos

Se hidrató 100 gramos de pulpa de café, bagazo de caña y cascarilla de arroz por 24 horas, se realizó la prueba del puño y se colocó en frascos de cristal. Se esterilizaron y posterior se inoculó cinco mililitros de cultivo micelial. Finalmente, fueron incubados por 72 horas a 28°C.

2.8. Análisis estadístico descriptivo

Para el análisis estadístico descriptivo se usó Microsoft Office Excel utilizando muestreo estadístico aleatorio simple, del cual se emplearon tablas dinámicas, histogramas y correlación de pH, rendimiento de biomasa micelial, número de conidios formados, tiempo de generación, velocidad específica de crecimiento y tiempo de colonización sobre sustratos.

3. Resultados y discusión

3.1. Dimensionamiento

El biorreactor consistía en un recipiente de borosilicato de 2,5 litros con una salida para el muestreo, la entrada superior principal estaba equipada con una tapa de succión hermética rodante YX 930D [23]. Los tubos de succión un cuarto 360 tipo cánula Yankauer tuvieron puertos de inyección de 5cm de largo, en base a estos puertos se dotó de jeringas estériles de 60 mL para favorecer la extracción de muestras de micelio. Para su sistema de agitación se empleó dos barras agitadoras cilíndricas FISHERBRAND autoclavables a 120 rpm en un agitador magnético THERMO SCIENTIFIC S88857100 para evitar cualquier tipo de contaminación. A continuación, se muestra la tabla del dimensionamiento de los biorreactores.

Así mismo, se observó en la figura 1A los biorreactores en baño maría, 1B los gránulos miceliales de *Pleurotus ostreatus* y 1C los pellets miceliales de *Agaricus brunnescens*, ambos en agitación constante de 120 rpm durante quince días a 28° C.

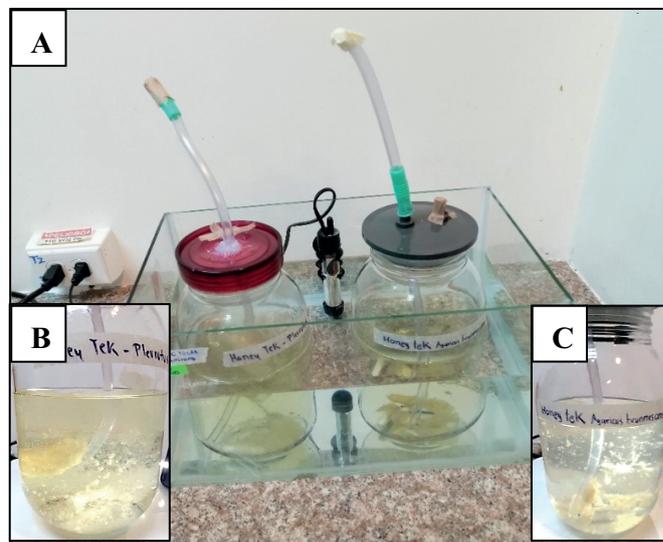
3.2. Cinética de crecimiento

En la figura 2 se muestra las fases de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* en honey por 15 días, la fase de adaptación del hongo *Pleurotus ostreatus* tuvo lugar desde el día cero hasta el segundo día, la fase exponencial se

Tabla 1

Dimensionamiento de los biorreactores.

Descripción	Simbología	Cantidad	Indicador
Volumen de la cámara de cultivo	Vp	2	L
Volumen Total	VT	2,5	L
Diámetro	DT	0,06	m
Altura	hT	0,24	m
SISTEMA DE AGITACIÓN			
Diámetro impulsor barra agitadora	Di	0,05	m
Velocidad de agitación	N	120	rpm
Potencia <i>Pleurotus ostreatus</i>	Po	0,004201	W
Potencia <i>Agaricus brunnescens</i>	Po	0,00476	W

**Figura 1**

Biorreactores en caldo honey (A), siendo micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* (B) y micelio del hongo *Agaricus brunnescens*(C).

dio en el tercer día hasta el día 14, la formación de micelio inició en el segundo día, al octavo día se presenciaron gránulos y al doceavo día se observó pellets. Por otro lado, *Agaricus brunnescens* tuvo su fase de adaptación desde el día cero hasta el segundo día, la fase exponencial se dio en el tercer día hasta el día trece, la formación de micelio inició en el tercer día, al octavo día se presenciaron gránulos y al treceavo día se observó pellets. De acuerdo con los datos encontrados en literatura la cinética de crecimiento en biorreactores depende en gran medida del consumo de glucosa y nitrógeno, acompañada de una ligera caída en el pH del cultivo [17]. De acuerdo



con Khumar [20], el pH óptimo en medio líquido para crecimiento de micelio *Pleurotus ostreatus* oscila entre cuatro y 6,5. Mientras que para el desarrollo del micelio *Agaricus brunnescens*, según Bakratsas et al. [2], el pH óptimo oscila entre 4-6. Por lo tanto, el pH= 4,12 obtenida de esta investigación se encontró dentro de los rangos establecidos por dichos autores. En la cinética de crecimiento con respecto al trabajo de investigación de Sánchez [27], el uso de biorreactores aceleró en un crecimiento exponencial al micelio de *Pleurotus ostreatus* correlacionado con un valor de $R^2=0,5932$ y *Agaricus brunnescens* con una correlación de $R^2= 0,6946$, estos resultados se obtuvieron al día 21, es importante mencionar que usaron como nutriente para los caldos de los biorreactores malta y glucosa lo que produjo un aumento activo en el micelio, dando resultados aproximados en comparación a esta investigación.

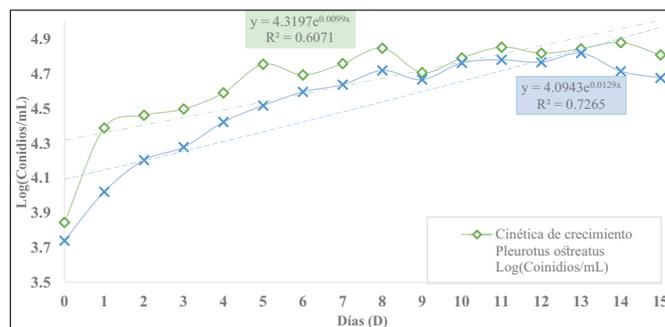


Figura 2

Cinética de crecimiento micelial Log(Conidios/mL) Pleurotus ostreatus y Agaricus brunnescens en Honey.

3.3. Biomasa en peso seco

La figura 3 muestra los valores obtenidos de la biomasa por peso seco de los biorreactores, *Pleurotus ostreatus* analizada cada tres días con cinco horas de agitación a 120 rpm y 19 horas de incubación a 28°C con un tiempo teórico de 15 días, obteniendo una biomasa final de 9,86 g/L con una velocidad específica de crecimiento de $0,0054 h^{-1}$, la biomasa final está dentro del rango mencionado [8], que alcanzó oscilaciones de biomasa $61,071 \pm 4.314$ g/L y $\mu = 0,233 \pm 0.054 h^{-1}$, los valores de la velocidad específica de crecimiento están indirectamente relacionados, ofrecen un marco inicial de referencia. Además, en este cultivo sumergido el desarrollo de hifas y micelio crece más rápidamente que el *Agaricus brunnescens*.

Así mismo, para *Agaricus brunnescens* se obtuvo una biomasa final de 8,52 g/L con una velocidad específica de crecimiento de $0,0029 h^{-1}$, la biomasa final está cercano del rango mencionado por Dissasa [10], que alcanzó una biomasa final seca de 10 g/L,

sin embargo, se observó del día tres al seis que hubo una recaída de biomasa, se debió a un daño mecánico del agitador magnético, ya que se había alterado su velocidad de agitación.

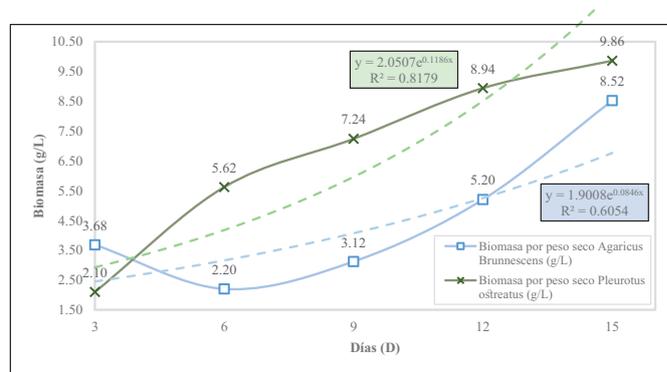


Figura 3

Biomasa(g/L) en peso seco *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* mediante filtración.

3.4. Verificación de crecimiento

El micelio de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* fueron inoculados en medio PDA, se observó en cada caja Petri el crecimiento de ambos hongos de color blanco uniforme y de apariencia tipo algodón, no hubo presencia de contaminación por bacterias u hongos. En la figura A y C se observa la completa colonización de ambos hongos en las cajas. Al quinceavo día posterior de la inoculación en los biorreactores, los resultados microscópicos extraídos del biorreactor que contiene *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus brunnescens* a objetivo 10X, se observó la presencia de estructuras miceliales como hifas.

3.5. Metabolito activo

Los resultados de proteínas en el micelio *Pleurotus ostreatus* fueron de 23,50 %, valor que está dentro del rango mencionado por Bakratsas et al. [2], reportando oscilaciones entre 10,20 a 25,70 % de proteínas. Por otro lado, *Agaricus brunnescens* obtuvo un 41,06 %, valor que está cercano al mencionado por Bakratsas et al. [2], que alcanzó 47,10 % de proteínas presentes durante el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en cultivos sumergidos.

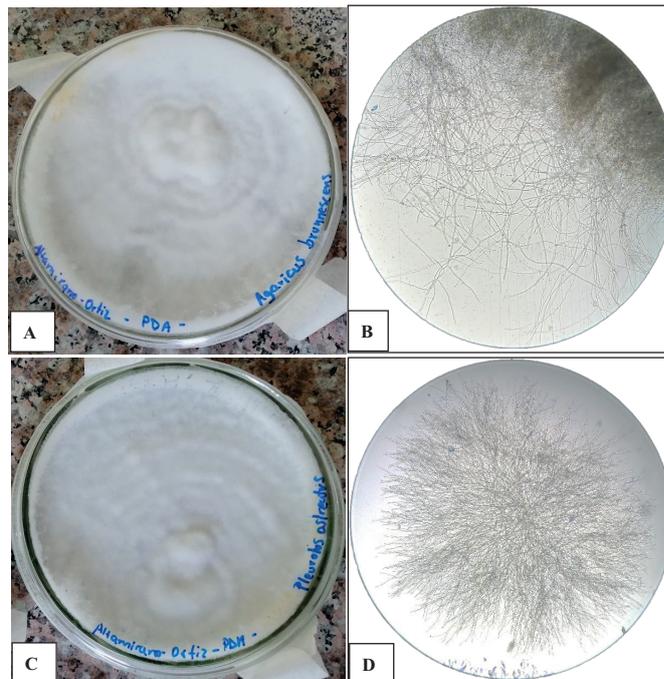


Figura 4

Micelio en agar PDA *Agaricus brunnescens* (A), *Pleurotus ostreatus* (B) y estructuras miceliales *Agaricus brunnescens* (C), *Pleurotus ostreatus* (D).

3.6. Colonización sobre sustratos

En la figura 5B, el micelio extraído de *Pleurotus ostreatus* colonizó en tres días los 100 g de pulpa de café, en cuatro días el bagazo de caña y en cinco días la cascarilla de arroz. Así mismo, en la figura 5A, el micelio de *Agaricus brunnescens* se propagó en tres días los 100 g de pulpa de café, en cinco días el bagazo de caña y en seis días la cascarilla de arroz. De acuerdo con Sánchez [27] la colonización de 250 g de bagazo de caña duró 20 días y la cascarilla de arroz 28 días, cabe recalcar que usaron micelio en fermentación sólida, por lo tanto, esta técnica presentada es mucho más eficiente que las convencionales a pesar que sólo se usó 100 g de sustrato. Es importante mencionar que la pulpa de café fue el mejor sustrato de colonización debido a su capacidad de retener humedad, su pH ácido y su mayor cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina. por esta razón la propagación del micelio es más acelerada que los otros [10].

4. Conclusiones

Los modelos de biorreactores batch empleados en la investigación han demostrado ser aplicables para la producción eficiente de micelio de hongos, adaptándose sin problemas durante todo su desarrollo, con condiciones controladas de temperatura,



Figura 5

Registro de colonización en sustratos *Agaricus brunnescens* (A) y *Pleurotus ostreatus* (B).

pH, homogeneidad y agitación. La aplicación de este nuevo método proporcionó mayor cantidad de biomasa y proteína cruda, abaratando costos de producción en comparación a la fermentación sólida y el tiempo de obtención de micelio es mucho más activo. Así mismo, el período de colonización sobre los sustratos es acelerado por su estado líquido-sólido. La investigación supone un importante aporte al conocimiento científico de la biotecnología en hongos y microbiología.

References

- [1] Argyropoulos D, Psallida C, Sitareniou P, Flemetakis E, Diamantopoulou P. Biochemical evaluation of *Agaricus* and *Pleurotus* strains in batch cultures for production optimization of valuable metabolites. *Microorganisms*. 2022;(10 Suppl):964.
- [2] Bakratsas G, Colidera A, Katapodis P, Stamatis H. Tendencias recientes en el cultivo sumergido de hongos y su aplicación como fuente de nutraceuticos y aditivos alimentarios. *Alimentos del futuro*. 2021;(4 Suppl):100086.
- [3] Bonatti M, Karnopp P, Soares HM, Furlan SA. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*. 2004;88(Suppl 3):425–428.
- [4] Campestrini LH, Salles-Campos C. Aspectos del cultivo de hongos para la obtención de polisacáridos en cultivo sumergido. *Diario Africano de Biotecnología*. 2021;20(Suppl 2):100–107.
- [5] Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002 Apr;58(5):582–594.
- [6] Chmelová D, Legerská B, Kunstová J, Ondrejovič M, Miertuš S. La producción de lacasas por hongos de pudrición blanca en condiciones de fermentación en estado sólido. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*. 2022;38(Suppl 2):1-20.



- [7] Chitra K, Venkatesh R, Dhanalakshmi K, Sharavanan PT, Sasikumar CB, Vijayakumari KK. Producción y análisis económico del hongo ostra (*Pleurotus florida*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2018;7:379–383.
- [8] Correa RC, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira IC. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science and Technology*. 2016;50:103–117.
- [9] Deepalakshmi K, Sankaran M. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*. 2014;5(Suppl 2):718–726.
- [10] Dissasa G. Cultivation of different oyster mushroom (*Pleurotus* species) on coffee waste and determination of their relative biological efficiency and pectinase enzyme production, Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, [Internet]. 2022 [cited 08 October 2021];3. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2022/5219939/>
- [11] García A, García O, Velázquez M, García C, García A, Cortez H. Miniaturization of f1 adults from female *Aedes aegypti* exposed to *Beauveria bassiana*-contaminated males in a two-factor design. *Southwest Entomologist*. 2022;47(Suppl 2):299–302.
- [12] Guiao, KS, Tzoganakis, C, Mekonnen, TH. Procesamiento mecanoquímico verde de biomasa lignocelulósica para recuperación de lignina. *Quimiosfera*. 293. 2022.
- [13] Grimm D, Wösten HA. Mushroom cultivation in the circular economy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018 Sep;102(18):7795–7803.
- [14] Hölker U, Lenz J. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 2005 Jun;8(3):301–306.
- [15] Hussain S, Al-Kharousi M, Al-Muharabi MA, Al-Maqbali D, Al-Shabibi Z, Al-Balushi AH, et al. Phylogeny of *Agaricus* subgenus *Pseudochitonina* with the description of a new section and a new species from Oman. *Mycological Progress*. 2022;21(Suppl 8):1–13.
- [16] Israili ZH. Antimicrobial properties of honey. *American Journal of Therapeutics*. 2014;21(4):304–323.
- [17] Iwanicki NS, Mascarin GM, Moreno SG, Eilenberg J, Delalibera Júnior I. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020 Apr;36(5):71.
- [18] Kalac P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 2009;113(1):9–16.



- [19] Kuhad RC, Singh A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Critical Reviews in Bio-technology*. 1993;13(Suppl 2):151–172.
- [20] Kumar K, Mehra R, Guiné RP, Lima MJ, Kumar N, Kaushik R, et al. Edible mushrooms: A comprehensive review on bioactive compounds with health benefits and processing aspects. *Foods*. 2021 Dec;10(12):2996.
- [21] Lavelli V, Proserpio C, Gallotti F, Laureati M, Pagliarini E. Circular reuse of bio-resources: The role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. *Food & Function*. 2018 Mar;9(3):1353–1372.
- [22] Wan Mahari WA, Peng W, Nam WL, Yang H, Lee XY, Lee YK, et al. A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. *Journal of Hazardous Materials*. 2020 Dec;400:123156.
- [23] Mattila P, Salo-Väänänen P, Könkö K, Aro H, Jalava T. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002 Oct;50 22:6419–6422.
- [24] Nasser AT, Rasoul-Amini S, Morowvat MH, Ghasemi Y. Single cell protein: production and process. *American Journal of Food Technology*. 2011;6(Suppl 2):103–116.
- [25] Raman J, Jang KY, Oh YL, Oh M, Im JH, Lakshmanan H, et al. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview. *Mycobiology*. 2020 Nov;49(1):1–14.
- [26] Rizvi NB, Aleem S, Khan MR, Ashraf S, Busquets R. Quantitative estimation of protein in sprouts of *Vigna radiata* (Mung Beans), *Lens culinaris* (Lentils), and *Cicer arietinum* (Chickpeas) by Kjeldahl and Lowry Methods. *Molecules*. 2022 Jan;27(3):814.
- [27] Sánchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Bio-technology*. 2010 Feb;85(5):1321–1337.
- [28] Selim AS, Hasan MN, Rahman MA, Rahman MM, Islam MR, Bostami AB, et al. Nutrient content and in vitro degradation study of some unconventional feed resources of Bangladesh. *Heliyon*. 2022 May;8(5):e09496.