



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0508265-0 B1

(22) Data do Depósito: 08/02/2005

(45) Data de Concessão: 31/05/2016



* B R F I 0 5 0 8 2 6 5 B 1 *

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE GRÂNULOS CONTENDO FUNGOS FILAMENTOSOS.

(51) Int.Cl.: A01N 63/04; C12R 1/645

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2004 EP 04006142.6

(73) Titular(es): UREA CASALE S.A.

(72) Inventor(es): PANCHAUD-MIRABEL, ELISABETH

**"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE GRÂNULOS CONTENDO FUNGOS
FILAMENTOSOS"**

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se inclui no campo técnico dos agentes fitossanitários.

[0002] Em particular, a presente invenção concerne um processo para produção em escala industrial de grânulos contendo fungos filamentosos, mais especificamente, fungos nematófagos.

Estado da Técnica

[0003] O uso de microorganismos e, em particular, de fungos como agentes fitossanitários constitui uma prática comum crescente.

[0004] Os produtos baseados em fungos já são comercializados para o combate a insetos, fungos fitopatogênicos e outros parasitas da lavoura.

[0005] Por exemplo, na Patente U.S. No. 5.811.092, os agentes nematófagos são descritos para o combate de nematóides dos gêneros *Meloidogyne*, *Hetherodera* e *Ditylenchus*, consistindo de linhagens particulares de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler, um fungo filamentoso.

[0006] Os nematódios acima mencionados são responsáveis por graves doenças de vegetais e de fungos, podendo provocar enormes prejuízos econômicos, na medida em que podem comprometer de 50-70% da colheita.

[0007] O uso de fungos nematófagos, como alternativa aos produtos químicos anti-parasíticos usuais (por exemplo, brometo de metila, tricloronitrometano, dicloropropeno, etc.), para aplicação no solo antes do cultivo, ou como alternativa aos produtos à base de carbamatos que são aplicados às culturas, permite que sejam evitados graves inconvenientes, tais como, a esterilização do solo, destruição do balanço ecológico e potencial toxicidade para o homem e animais.

[0008] Portanto, os fungos nematófagos são particularmente adequados para uso na exploração agrícola orgânica, porém, existe atualmente, uma substancial dificuldade na produção de tais fungos industrialmente com altos rendimentos e em formas adequadas, de modo a garantir um satisfatório estado de conservação antes do uso.

[0009] De fato, se observa no estado da técnica que os fungos nematófagos são produzidos em um apropriado meio de cultura. Em seguida, os fungos nematófagos juntamente com o seu meio de cultura, são diretamente dispersos no solo a ser tratado ou mantidos no meio de cultura antes do uso. Entretanto, nessas condições de conservação, os fungos nematófagos continuam a se reproduzir de forma bastante rápida, diminuindo após um curto período de tempo (1-2 semanas), na medida em que as fontes de nutrientes são exauridas.

[00010] O problema essencial da presente invenção foi solucionado mediante a provisão de um processo para produção em escala industrial de fungos filamentosos, apresentando características de alto rendimento, baixo custo e uma forma adequada de garantir sua estabilidade e viabilidade durante longos períodos de armazenamento, antes do uso no solo a ser tratado.

Resumo da Invenção

[00011] A ideia de solucionar esse problema técnico foi a de incorporar os fungos filamentosos em fórmulas sólidas apropriadas que pudessem garantir sua estabilidade e viabilidade durante longos períodos de tempo. Nesse contexto, fórmulas de grânulos contendo fungos filamentosos têm demonstrado serem adequadas para o propósito da presente invenção.

[00012] A palavra "grânulos" é na verdade uma tradução da língua inglesa que abrange tanto os grânulos como os péletes (grânulos que se formam após o processo de

gelificação e secagem). Ou seja, os grânulos aqui descritos referem-se tanto a grânulos como aos péletes.

[00013] Diante da exposição da idéia acima mencionada, o problema técnico que fundamenta a presente invenção é solucionado, através de um processo para produção de grânulos contendo fungos filamentosos, cujo processo compreende as etapas de:

- selecionar e cultivar fungos filamentosos em um apropriado meio de cultura, por um predeterminado período de tempo;

- misturar o dito meio de cultura, após o dito predeterminado período de tempo, com um agente gelificante e pelo menos um carreador, de modo a obter uma mistura;

- submeter a dita mistura a uma etapa de gelificação mediante contato, gota a gota, com uma solução contendo um sal de cálcio, obtendo, dessa forma, grânulos gelificados que contêm os ditos fungos filamentosos;

- secar os ditos grânulos gelificados para um teor de umidade de 13-18%.

Descrição Detalhada da Invenção

[00014] A presente invenção deverá ser ainda descrita com relação a um certo número de modalidades exemplificativas, providas para fins ilustrativos, porém, não-limitativos.

[00015] Antes de prosseguir com a ilustração dos exemplos, deve ser conveniente definir os materiais usados para implementação das diversas etapas do processo de produção, de acordo com a invenção.

[00016] Os fungos filamentosos usados no processo de acordo com a invenção pertencem à família *Moniliales*, preferencialmente, os fungos filamentosos de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

[00017] O meio de cultura indicado para os fungos filamentosos compreende pelo menos uma fonte de

carbono escolhida do grupo que consiste de melaço, extrato de malte e sacarose e pelo menos uma fonte de nitrogênio orgânico, escolhida dentre extrato de levedura e "licor de infusão de milho".

[00018] Preferencialmente, a acima mencionada, pelo menos uma fonte de carbono constitui entre 70 e 85% em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura, e a acima mencionada, pelo menos uma fonte de nitrogênio orgânico constitui entre 15 e 30% em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura.

[00019] O meio de cultura pode também incluir uma fonte de nitrogênio mineral, consistindo de nitratos ou sais de amônio. A fonte de nitrogênio mineral acima mencionada, normalmente, é adicionada de forma gradual ao meio de cultura, durante a cultura do fungo, numa quantidade que é maior que 10% em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura e, de forma usual, entre 5 e 8% em peso.

[00020] Uma composição preferida do meio de cultura consiste de 75-85% de extrato de malte e de 15-25% de extrato de levedura, as percentagens sendo expressas em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura.

[00021] Outro meio de cultura preferido compreende 60-65% de melaço, 10-15% de sacarose, 10-15% de licor de infusão de milho e 10-15% de extrato de levedura. Vantajosamente, tal meio de cultura contém, além disso, entre 5 e 8% de uma fonte de nitrogênio mineral, em particular, fosfato de ácido de diamônio.

[00022] Um adicional meio de cultura preferido contém duas fontes de carbono, isto é, extrato de malte, numa quantidade de 25-30% e melaço, numa quantidade de 40-45%, assim como, licor de infusão de milho, numa quantidade de 25-30%.

[00023] O extrato de malte é obtido mediante

germinação de grãos de cereais (normalmente, cevada). Na época da germinação, são produzidas enzimas específicas (amilases), que permitem a conversão do amido em açúcares. O extrato de malte contém cerca de 60% de maltose, vitaminas e diversos micronutrientes.

[00024] O melaço constitui um subproduto da indústria do açúcar e se apresenta na forma de um líquido viscoso de cor marrom escuro, contendo 10% de água, 35% de sacarose, 20% de outros açúcares e 15% de cinzas.

[00025] O extrato de levedura é obtido mediante autólise de *Saccharomyces cerevisiae* e se apresenta na forma de um pó fino de cor amarelo claro, facilmente solúvel em água. O extrato de levedura contém peptídeos, aminoácidos livres, bases, tais como, purina e pirimidina, assim como, vitaminas solúveis em água do grupo B. O extrato de levedura apresenta um teor total de nitrogênio de 10% e um teor de nitrogênio α -amínico de 5%.

[00026] O licor de infusão de milho é obtido através da lixiviação de grãos de milho à temperatura de 50°C, durante o período de 24-48 horas, em dióxido de enxofre contendo água. Este reagente permite a desnaturação da rede protéica que envolve os grãos de amido e oferece a vantagem de evitar o crescimento de microorganismos indesejáveis durante a etapa de lixiviação. O licor de infusão de milho apresenta um teor total de nitrogênio de 7% e um teor de nitrogênio α -amínico de 1,7% e também contém 5% de açúcares, 4% de potássio, 3% de fósforo e 17% de outros minerais.

[00027] No processo de produção de acordo com a invenção, o crescimento dos fungos filamentosos no meio de cultura acima mencionado é preferencialmente realizado no curso de 5-10 dias, a uma temperatura constante de 23-30°C.

[00028] O agente gelificante,

preferencialmente, consiste de uma solução que contém alginato de sódio numa concentração de 1-2%, preferencialmente, 1,3% em peso, com relação ao peso da solução. Esta solução é preferencialmente adicionada ao meio de cultura dos fungos filamentosos, conforme uma proporção de volume de meio de cultura/solução de alginato, compreendida entre 40:60 e 60:40.

[00029] Conforme conhecido, o alginato de sódio pode promover a gelificação de uma mistura líquida na qual o mesmo é adicionado, através do contato da mistura com uma solução contendo sais de cálcio.

[00030] Um aspecto importante consiste na adição de carreadores ao meio de cultura. Na presente invenção, o termo "carreador" tem o significado de um produto que proporciona estabilidade e/ou nutrientes para os fungos dispersos nos grânulos, de modo que estes permaneçam viáveis durante o armazenamento até o uso e o termo "agente de carga", significa um produto que confere a desejada consistência e volume para os grânulos.

[00031] Preferencialmente, os carreadores acima mencionados são selecionados do grupo que compreende terra diatomácea, farinhas e açúcares.

[00032] Um carreador preferido é o Celaton FPM 0,08. Trata-se de um produto comercial baseado em conchas diatomáceas (algas siliciosas de célula única) e apresenta uma granulometria de cerca de 0,08 microns. Este produto pode absorver uma quantidade definida de água e, portanto, auxiliar a obtenção de um volume desejado de grânulos finais.

[00033] Entre as farinhas que podem ser usadas como carreadores na presente invenção, a farinha de milho é a mais preferida. A farinha de milho é um produto natural, capaz de absorver uma quantidade de água igual a diversas vezes o seu volume e, nesse caso específico, também,

auxiliar a obtenção de um desejado volume dos grânulos finais. Além disso, a farinha de milho constitui uma importante fonte de nutrientes para os fungos filamentosos dispersos nos grânulos durante o armazenamento e quando do espalhamento dos grânulos no solo a ser tratado.

[00034] Em particular, o uso de farinha de milho como fonte de nutrientes é particularmente vantajoso no caso do *Arthrobotrys conoides Dreschsler*, na medida em que, de forma surpreendente, pode se observar nesse caso que os fungos desenvolvem um maior número de meios de aprisionamento de nematódios, com um conseqüente aumento da eficácia no combate aos mesmos.

[00035] Os açúcares, vantajosamente, permitem aos fungos filamentosos permanecerem viáveis durante o armazenamento, mediante estabilização das membranas celulares. Dentre os açúcares que podem ser usados no processo de acordo com a invenção, a sacarose é especialmente preferida.

[00036] Preferencialmente, na presente invenção, os carreadores são adicionados ao meio de cultura através de um agente gelificante. Na prática, mediante uso de uma solução de alginato de sódio como agente gelificante, os carreadores são preferencialmente adicionados à dita solução de alginato de sódio em percentagens que variam entre 6% e 22% em peso, com relação ao peso da solução. Em um método particularmente preferido, os carreadores são adicionados à solução de alginato de sódio numa percentagem de 15% em peso, com relação ao peso da solução.

[00037] No processo de acordo com a invenção, a gelificação da mistura contendo os fungos filamentosos e o meio de cultura correlato, assim como, o promotor de gelificação e os carreadores, é preferencialmente implementada mediante adição da dita mistura, gota a gota,

a uma solução de sal de cálcio.

[00038] O sal de cálcio é preferencialmente escolhido entre cloreto de cálcio e gliconato de cálcio. A concentração do sal de cálcio na solução se situa entre 0,2M e 0,3M, sendo preferencialmente de 0,25M no caso do cloreto de cálcio. Usualmente, a gelificação prossegue mais rápida com o aumento da concentração do sal de cálcio.

[00039] Os grânulos gelificantes que são formados mediante contato das gotas da mistura acima mencionada com a predeterminada solução de sal de cálcio são deixados permanecer na solução acima mencionada por um predeterminado período de tempo, preferencialmente, 2-3 minutos, de modo a completar a gelificação. A remoção dos grânulos gelificados a partir da solução de sal de cálcio é realizada de uma maneira convencional, por exemplo, mediante filtração.

[00040] A secagem dos grânulos gelificados pode ser vantajosamente realizada através de fluxo de ar estéril, a uma temperatura de 25-30°C. Geralmente, os grânulos gelificados, obtidos a partir da gelificação das gotas de mistura adicionadas à predeterminada solução de sal de cálcio, apresentam um teor de umidade de 80-90%. Este teor de umidade é reduzido por meio de secagem para um valor de 13-18%. Desse modo, os grânulos alcançam a desejada consistência e volume, também, com a ajuda dos carreadores anteriormente adicionados ao meio de cultura.

[00041] Preferencialmente, através do processo de acordo com a invenção, são obtidos grânulos apresentando um diâmetro de 1-3 mm, o que proporciona um aperfeiçoado espalhamento dos fungos filamentosos no solo a ser tratado.

[00042] O processo de acordo com a invenção, vantajosamente, pode ser implementado em uma escala industrial através de um dispositivo que é de baixo custo e fácil de projetar. Um adequado dispositivo, resumidamente

adiante descrito como um exemplo não-limitativo, compreende um reator para a cultura dos desejados fungos filamentosos em um apropriado meio de cultura, um misturador no qual o agente gelificante e os carreadores são misturados com o meio de cultura de modo a formar uma mistura, meios adequados para alimentação de quantidades medidas da mistura a apropriados elementos perfurados, de modo a formar gotas da mistura tendo um predeterminado volume, um vaso contendo uma solução aquosa de sal de cálcio para coletar as gotas acima mencionadas e permitir a sua gelificação e um secador para secar os grânulos gelificados recuperados no vaso que contém a solução aquosa de sal de cálcio.

[00043] Os meios para alimentação de quantidades medidas da mistura podem compreender, por exemplo, uma bomba peristáltica ou dispositivos similares, enquanto os elementos perfurados podem ser tubos, individualmente terminando na base com um furo de predeterminado diâmetro, por exemplo, 1-4 mm.

[00044] É importante que o dispositivo acima mencionado opere em condições estéreis, a fim de evitar a contaminação de microorganismos, em particular, aqueles antagonísticos ao desejado fungo filamentoso. Os produtos usados para realizar o processo de acordo com a invenção, em particular, os produtos adicionados ao meio de cultura na mistura, devem também ser adequadamente esterilizados antes do uso.

[00045] Os grânulos obtidos de acordo com o processo da invenção são de pronto uso, mas, vantajosamente, os fungos filamentosos contidos nos mesmos permanecem estáveis e viáveis por longos períodos de tempo. Os grânulos acima mencionados, assim, servem para ser conservados ou armazenados por um maior tempo antes de uso, após o que os fungos filamentosos mantêm uma viabilidade

totalmente satisfatória para as aplicações que os mesmos são idealizados.

[00046] A duração do tempo de conservação dos grânulos de acordo com a invenção antes do uso é vantajosamente maior que 8 semanas, sendo, geralmente, entre 4 e 6 meses.

[00047] Os exemplos seguintes de atuação do processo de acordo com a invenção foram realizados com fungos filamentosos da família Moniliales, preferencialmente, fungos filamentosos de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

Exemplo 1

[00048] A cultura de fungos filamentosos foi realizada em um reator de 2 litros, contendo 1,2 litros de um meio de cultura.

[00049] O reator consiste, preferencialmente, de um recipiente tendo uma base arredondada, provida com um agitador de lâmina, meios de aquecimento e resfriamento, meios de soprimento de ar, assim como, sondas de pH, O₂ e temperatura.

[00050] O meio consiste de 20 g/L de extrato de malte e 4 g/L de extrato de levedura e foi esterilizado antes de ser semeado com a conídio do fungo em questão.

[00051] A cultura foi incubada por 5 dias a partir da sementeira, a uma temperatura de cerca de 27°C.

[00052] Durante a incubação, as amostras foram tomadas do meio de cultura para determinar a massa seca (g/L) e o número de elementos propagados (CFU/L). Para determinar a massa seca, 20 mL do meio de cultura foram filtrados e depois secos em um forno à temperatura de 100C durante 24 horas. O número de elementos propagados foi determinado em 1 mL do meio de cultura.

[00053] Ao final do tempo de incubação, quase que 8 g/L de fungos foram assim obtidos com um número de

elementos propagados de 6×10^9 por litro.

[00054] O meio de cultura contendo o fungo é depois transferido para um misturador, onde se adicionam ao meio de cultura 1800 mL de uma solução aquosa a 1,3% em peso de alginato de sódio, em cuja solução 6,6% de Celaton FPM 0,08 (em peso, com relação ao peso da solução) foi adicionada.

[00055] A mistura resultante é depois homogeneizada no misturador e adicionada, gota a gota, através de um tubo perfurado (diâmetro do furo de 1,6 mm) em um vaso contendo uma solução de cloreto de cálcio 0,25M.

[00056] Os grânulos gelificados da mistura acima mencionada assim obtidos são deixados permanecer na solução de cloreto de cálcio por 3 minutos.

[00057] Ao final de tal tempo de permanência, os grânulos gelificados são separados mediante decantação e secos em uma correia transportadora para um teor de umidade de 17%. O diâmetro médio dos grânulos secos é de 2,2 mm.

[00058] O número médio de elementos propagados nos grânulos secos, determinado imediatamente após a sua formação, é substancialmente idêntico ao número determinado ao final da incubação do fungo filamentoso, provando que os elementos propagados acima mencionados sobreviveram inteiramente ao processo de granulação da presente invenção.

[00059] Os grânulos secos acima mencionados são mantidos por 3 meses à temperatura ambiente. Ao final do período de armazenamento, o número médio de elementos propagados sobreviventes é igual a 50% do número determinado após a formação do grânulo.

Exemplo 2

[00060] O teste do Exemplo 2 foi repetido usando as mesmas condições experimentais do Exemplo 1, exceto em que foi adicionada ao meio de cultura 1800 mL de

uma solução aquosa a 1,3% em peso de alginato de sódio, em cuja solução 6,6% de Celaton FPM 0,08 e 3,3% de farinha de milho (em peso, com relação ao peso da solução) foram adicionadas.

[00061] O diâmetro médio dos grânulos secos é de 2,5 mm e seu teor de umidade de 17%.

[00062] O número médio de elementos propagados nos grânulos secos, determinado imediatamente após a sua formação, é substancialmente idêntico ao número determinado ao final da incubação do fungo filamentosos, provando que os elementos propagados acima mencionados sobreviveram inteiramente ao processo de granulação da presente invenção.

[00063] Os grânulos secos acima mencionados são mantidos por 3 meses à temperatura ambiente. Ao final do período de armazenamento, o número médio de elementos propagados sobreviventes é igual a 90% do número determinado após a formação do grânulo, o que permite aos grânulos secos a possibilidade de serem efetivamente usados no solo como agentes fitossanitários.

Exemplo 3

[00064] O teste do Exemplo 3 foi repetido usando as mesmas condições experimentais do Exemplo 1, exceto em que foi adicionada ao meio de cultura 1800 mL de uma solução aquosa a 1,3% em peso de alginato de sódio, em cuja solução 6,6% de Celaton FPM 0,08, 3,3% de farinha de milho e 5% de sacarose (em peso, com relação ao peso da solução) foram adicionadas.

[00065] O diâmetro médio dos grânulos secos é de 2,9 mm e seu teor de umidade de 17%.

[00066] O número médio de elementos propagados nos grânulos secos, determinado imediatamente após a sua formação, é substancialmente idêntico ao número determinado ao final da incubação do fungo filamentosos, provando que os

elementos propagados acima mencionados sobreviveram inteiramente ao processo de granulação da presente invenção.

[00067] Os grânulos secos acima mencionados são mantidos por 3 meses à temperatura ambiente. Ao final do período de armazenamento, o número médio de elementos propagados sobreviventes é igual a 100% do número determinado após a formação do grânulo, o que permite aos grânulos secos a possibilidade de serem efetivamente usados no solo como agentes fitossanitários.

[00068] Além disso, no uso dos grânulos acima mencionados, existe uma maior eficácia do fungo no combate aos nematódios, devido ao fato do fungo desenvolver um maior número de características de aprisionamento contra os mesmos.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de grânulos contendo fungos filamentosos, **caracterizado** pelo fato de compreender:

- selecionar e cultivar fungos filamentosos em um apropriado meio de cultura, por um determinado período de tempo;
- misturar o dito meio de cultura, após o dito determinado período de tempo, com um agente gelificante e pelo menos um carreador, de modo a obter uma mistura;
- submeter a dita mistura a uma etapa de gelificação, mediante contato, gota a gota, com uma solução contendo um sal de cálcio, obtendo, dessa forma, grânulos gelificados que contêm os ditos fungos filamentosos; e
- secar os ditos grânulos gelificados para um teor de umidade de 13-18%.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito meio de cultura para fungos filamentosos compreende pelo menos uma fonte de carbono escolhida do grupo que consiste de melaço, extrato de malte e sacarose, e pelo menos uma fonte de nitrogênio orgânico, escolhida dentre extrato de levedura e "licor de infusão de milho".

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita pelo menos uma fonte de carbono constitui entre 70 e 85% em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura, e a dita pelo menos uma fonte de nitrogênio orgânico constitui entre 15 e 30% em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura.

4. Processo, de acordo com as reivindicações 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de que o dito meio de cultura compreende ainda uma fonte de nitrogênio mineral.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a dita fonte de nitrogênio

mineral está contida numa quantidade não maior que 10% em peso, com relação ao peso seco do meio de cultura, preferencialmente, entre 5 e 8% por peso.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o agente gelificante consiste de uma solução contendo entre 1% e 2% em peso de alginato de sódio.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a solução de alginato de sódio é adicionada ao meio de cultura do fungo filamentosos, preferencialmente, de acordo com uma proporção de volume de meio de cultura/solução de alginato compreendida entre 40:60 e 60:40.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que os ditos carreadores são escolhidos do grupo que compreende terra diatomácea e farinhas, preferencialmente, farinha de milho, e açúcares.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que os ditos fungos filamentosos são de *Arthrotrrys conoides Dreschsler* e os ditos carreadores compreendem pelo menos farinha de milho.

10. Processo, de acordo com as reivindicações 8 ou 9, **caracterizado** pelo fato de que os ditos carreadores são adicionados à solução de alginato de sódio em percentagens que variam entre 6% e 22% em peso, com relação ao peso da solução.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que a solução contendo um sal de cálcio é preferencialmente uma solução aquosa de cloreto de cálcio ou gliconato de cálcio, tendo uma concentração de 0,2-0,3M.

12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que os

grânulos secos apresentam um diâmetro médio entre 1 e 3 mm.

RESUMO

**"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE GRÂNULOS CONTENDO FUNGOS
FILAMENTOSOS"**

A presente invenção refere-se a um processo para produção de grânulos contendo fungos filamentosos, o processo compreendendo as etapas de:

- selecionar e cultivar fungos filamentosos em um apropriado meio de cultura, por um predeterminado período de tempo;
- adicionar um agente gelificante e pelo menos um carreador ao dito meio de cultura, de modo a obter uma mistura;
- submeter a dita mistura a uma etapa de gelificação, mediante contato, gota a gota, com uma solução contendo um sal de cálcio, obtendo, dessa forma, grânulos gelificados que contêm os ditos fungos filamentosos; e
- secar os ditos grânulos gelificados para um teor de umidade de 13-18%.