



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti

Risorse naturali e Ambiente

Corso di laurea Triennale in Scienze e Cultura della Gastronomia
e della Ristorazione

PLEUROTUS OSTREATUS: EFFETTI DELL'ILLUMINAZIONE A
LED SU PRODUZIONE E QUALITÀ

Relatore: Prof. Carlo Nicoletto

Correlatrice: Dott.ssa Marina De Bonis

Laureanda: *Elisa Zanusso*
Matricola n. 1228776

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

| | |
|---|-----------|
| RIASSUNTO..... | 5 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1. INTRODUZIONE | 9 |
| 1.1 PLEUROTUS OSTREATUS: DESCRIZIONE BOTANICA | 9 |
| 1.2 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE | 11 |
| 1.3 CONTENUTO NUTRIZIONALE | 12 |
| 1.4 COLTIVAZIONE | 16 |
| 1.4.1 SUBSTRATO | 17 |
| 1.5 BIOFORTIFICAZIONE..... | 18 |
| 1.5.1 LUCE..... | 19 |
| 1.6 VITAMINA D..... | 19 |
| 1.6.1 CARATTERISTICHE GENERALI E CONTENUTO NEI FUNGHI | 20 |
| 2. SCOPO DEL LAVORO | 23 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 25 |
| 3.1 SCHEMA SPERIMENTALE | 25 |
| 3.2 RILIEVI ILLUMINOTECNICI | 28 |
| 3.3 CONTA PRIMORDI | 29 |
| 3.4 RACCOLTA E RILIEVI DIMENSIONALI..... | 30 |
| 3.5 ANALISI QUALITATIVE | 31 |
| 3.6 DETERMINAZIONE ANTIOSSIDANTI E POLIFENOLI TOTALI..... | 32 |
| 3.7 CONTENUTO AZOTO, FOSFORO E POTASSIO | 33 |
| 3.8 ANALISI ANIONI E CATIONI..... | 33 |
| 3.9 ANALISI STATISTICA..... | 33 |
| 4. RISULTATI..... | 35 |
| 4.1 RISULTATI PRODUTTIVI | 35 |
| 4.1.1 PRIMORDI..... | 35 |
| 4.1.2 PRODUZIONE | 37 |
| 4.1.3 NUMERO DI FAMIGLIE PER SACCO | 37 |
| 4.1.4 NUMERO CORPI FRUTTIFERI PER FAMIGLIA | 38 |
| 4.1.5 LARGHEZZA CORPI FRUTTIFERI | 38 |
| 4.1.6 SPESSORE CORPI FRUTTIFERI | 39 |
| 4.1.7 VALORI L* | 39 |
| 4.1.8 VALORI a* | 40 |
| 4.1.9 VALORI b* | 40 |
| 4.2 RISULTATI QUALITATIVI..... | 41 |
| 4.2.1 PARAMETRI QUALITATIVI | 41 |
| 4.2.2 ANTIOSSIDANTI E FENOLI TOTALI..... | 42 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 45 |
| 5.1 ANALISI PRODUTTIVE | 45 |
| 5.2 ANALISI QUALITATIVE | 47 |
| 6. CONCLUSIONI | 49 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 51 |
| SITOGRAFIA..... | 54 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 55 |

Riassunto

I funghi sono alimenti che occupano un ruolo importante nelle diete, date le loro proprietà nutritive e benefiche nell'organismo umano. Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di definire le caratteristiche qualitative del *Pleurotus ostreatus* e di valutare come queste possano essere influenzate dalle tecniche colturali di biofortificazione. Molti studi dimostrano come l'illuminazione LED a diverse lunghezze d'onda, utilizzate durante il ciclo di produzione, induca dei cambiamenti morfologici e qualitativi sul prodotto. In questa sperimentazione è stato analizzato l'effetto di 3 diversi trattamenti luminosi e del controllo con luce naturale sullo sviluppo, sulla resa e sulla qualità del *P. ostreatus*.

È stato valutato che i diversi trattamenti luminosi influenzano la comparsa dei primordi, il numero dei corpi fruttiferi per famiglia, la larghezza del pileo e il colore dei basidiocarpi. I differenti miceli non hanno dimostrato delle differenze significative sulla produzione e sulla qualità dei corpi fruttiferi mentre i diversi substrati, in particolare quelli provenienti da una gestione biologica, hanno influenzato la produzione di primordi e i principali caratteri colorimetrici. Dal punto di vista qualitativo i differenti trattamenti luminosi non hanno influenzato la quantità di antiossidanti e di polifenoli nei basidiocarpi, ma invece hanno determinato delle differenze negli altri parametri qualitativi come il livello di solidi solubili, di pH e di conducibilità elettrica ma anche dell'acidità titolabile, di sostanza secca e il quantitativo di vitamina D₂. Anche i miceli e i substrati hanno influito nella differenziazione dei parametri qualitativi determinando non solo l'aumento dei parametri citati ma anche della quantità di antiossidanti. Dati i numerosi risultati positivi ottenuti in questa tesi e i pochi articoli scientifici presenti in bibliografia, è opportuno sviluppare ulteriori prove sperimentali per comprendere i reali effetti dei trattamenti luminosi sulle caratteristiche produttive e qualitative del *P. ostreatus*.

Abstract

Mushrooms are foods that play an important role in international diets, given their nutritional and beneficial properties in the human organism. The aim of this thesis was to define the qualitative characteristics of *Pleurotus ostreatus* and to evaluate how these can be influenced by biofortification cultivation techniques. Many studies show how LED lighting at different wavelengths, used during the production cycle, induces morphological and qualitative changes in the product. In this experiment, the effect of 3 different light treatments and the control with natural light on the development, yield and quality of *P. ostreatus* was analysed.

It has been estimated that the different light treatments influence the appearance of the primordial, the number of fruit bodies per family, the width of the cap and the colour of the fruit bodies. The different mycelia did not show significant differences in the production and quality of the fruit bodies while the different substrates, in particular those coming from a biological management, have influenced the production of primordial and major colorimetric characters. From a qualitative point of view, the different light treatments did not influence the amount of antioxidants and polyphenols in the fruit bodies but instead determined differences in other qualitative parameters such as the level of soluble solids, pH and electrical conductivity but also the titratable acidity, dry matter and the amount of vitamin D₂. Mycelium and substrates have also influenced the differentiation of qualitative parameters, determining not only the increase of the mentioned parameters but also the amount of antioxidants. Given the numerous positive results obtained in this thesis and the few scientific articles in the bibliography, further experimental tests should be developed to understand the real effects of light treatments on the productive and qualitative characteristics of *P. ostreatus*.

Introduzione

I funghi eduli sono organismi appartenenti all'omonimo regno che la popolazione mondiale consuma da migliaia di anni. Facili da coltivare e con una crescita rapida, negli ultimi anni la loro produzione ha raggiunto i 7 milioni di tonnellate (Muswati et al. 2021).

Sono stati introdotti nella lista degli “alimenti funzionali” (Zawadzka et al. 2022) grazie all'elevato contenuto di proteine, sali minerali e vitamine ma anche di composti fenolici come terpeni e steroli. È stato inoltre dimostrato che i funghi comportano dei benefici alla salute umana per le loro proprietà antiossidanti, antitumorali e immunostimolanti (Bellettini et al. 2019; Zawadzka et al. 2022).

Tra le specie di funghi edibili che vengono coltivate, il 27% della produzione mondiale è rappresentata dal genere *Pleurotus spp* (Raman et al. 2021). Sono coltivati in India, Europa, Stati Uniti e Africa ma grazie alla Cina, il continente asiatico produce circa l'85% dei funghi ostrica in tutto il mondo (E. G et al. 2018). Il *Pleurotus spp.* quindi si posiziona, dopo l'*Agaricus bisporus* comunemente chiamato “Champignon”, al secondo posto tra i funghi commestibili più coltivati al mondo (Sánchez 2010). Tra le diverse specie che appartengono a questo genere, la più conosciuta è il *Pleurotus ostreatus*.

1.1 *Pleurotus ostreatus*: descrizione botanica

Il *P. ostreatus* appartiene alla classe degli Agaricomycetes nell'ordine degli Agaricales, meglio conosciuti come lamellati (Wan Mahari et al. 2020). Nel loro ciclo vitale subiscono diverse fasi vegetative e riproduttive. Durante la fase vegetativa i miceli, crescendo al di sotto e all'interno del substrato, svolgono un ruolo fondamentale nel processo di assorbimento dei nutrienti dal substrato di crescita. Rilasciano infatti enzimi extracellulari che degradano i composti organici complessi in molecole più semplici che verranno successivamente assorbite come nutrienti (Wan Mahari et al. 2020). Quando sono disponibili condizioni ottimali adatte alla fruttificazione, come una temperatura pari a 20–25 °C, un'umidità relativa elevata (65–70 %) (Wan Mahari et al. 2020), una concentrazione di anidride carbonica pari a 2000-2500 ppm (Bellettini et al. 2019) e un'intensità luminosa adeguata (200-640 lux per 8-12 ore al giorno), i funghi iniziano la fase riproduttiva (Wan Mahari et al. 2020). I basidiomiceti, di cui il genere *Pleurotus spp* fa parte, si riproducono soprattutto in maniera sessuata dove il basidio disperde nel terreno le basidiospore aploidi (n) che germinano e formano un micelio aploide (n) il quale, incontrandone un altro, si fonde insieme creando un'ifa dicarion (n+n)

(Wan Mahari et al. 2020). A questo punto dall'ifa si forma un micelio binucleato che, in condizioni ambientali adeguate, forma il corpo fruttifero (Regione del Veneto 2021).

Nelle prime fasi di formazione del corpo fruttifero si svilupperà il primordio che grazie a un gruppo di ife parallele produrranno a maturazione conclusa il gambo del fungo e successivamente, dal tessuto prosenchimatico apicale, un cappello convesso e sferoidale (Kuè and Liu 2000). Nella parte inferiore del cappello, denominato pileo, è presente il tessuto imeniale costituito da una serie di branchie primarie (in alternativa definite lamelle) che seguono un andamento dal bordo più vicino al gambo verso il pileo e dal margine inferiore del pileo al suo apice (Kuè and Liu 2000). Con lo sviluppo delle dimensioni del primordio aumenta anche lo spazio per altre branchie; la trama delle lamelle primarie quindi viene divisa radialmente verso l'esterno completando così l'estensione del primordio che viene denominata "pinning" (Kuè and Liu 2000).

Nelle lamelle del corpo fruttifero, i 2 nuclei della cellula dicarion si fondono per creare una cellula diploide ($2n$) la quale subendo la meiosi, un processo di divisione cellulare che permette variabilità genetica, produce le basidiospore aploidi (n) che verranno espulse nell'ambiente e inizieranno nuovi cicli di riproduzione (Figura 1) (Wan Mahari et al. 2020).

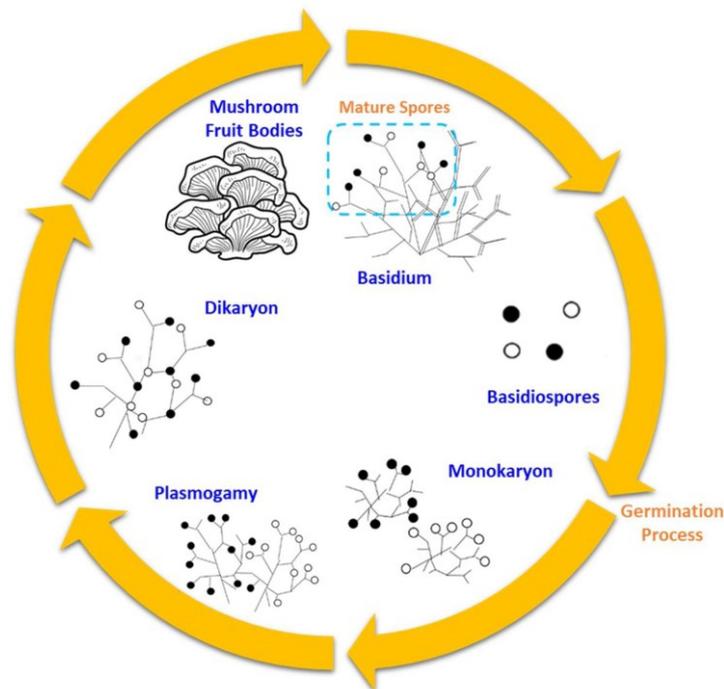


Figura 1: Rappresentazione del ciclo vegetativo del *Pleurotus ostreatus* (Wan Mahari et al. 2020).

1.2 Caratteristiche morfologiche

Il nome scientifico e quello comune si riferiscono alla forma dei corpi fruttiferi: infatti il termine latino *Pleurotus* è imputato alla crescita obliqua del gambo rispetto al cappello mentre *ostreatus*, e il nome inglese *oyster*, si riferiscono all'ostrica di cui il corpo fruttifero ricorda la forma (Deepalakshmi e Sankaran 2014).

I basidiocarpi crescono a gruppi da una base comune oppure disposti in uno schema piastrellato (Zawadzka et al. 2022) (Figura 2), con un gambo spesso e un cappello di forma asimmetrica. Quest'ultimo possiede delle dimensioni, dai 5 ai 25 cm circa, che si modificano in base alla specie e allo stato di maturazione e assume una colorazione che varia dal grigio chiaro al marrone scuro (Deepalakshmi e Mirunalini 2014) in base alle condizioni ambientali (Raman et al. 2021) e all'esposizione della luce (Siwulski et al. 2012; Zawadzka et al. 2022).



Figura 2: Famiglia di corpi fruttiferi di *Pleurotus ostreatus* disposti in uno schema piastrellato

L'habitat naturale del *P. ostreatus* sono le foreste tropicali e subtropicali (MC, UR, and JN 2017; Zawadzka et al. 2022) soprattutto quelle nel sud-est asiatico, in India e in Africa mentre nell'Europa centrale si trovano in natura nel sottobosco prevalentemente sui tronchi morti e sui ceppi di alberi a foglie caduche, data la loro crescita favorita in condizioni ambientali umide (Majesty et al. 2018).

Il *Pleurotus* è saprofita, decompositore primario del legno e della lignocellulosa, materiale costituito da cellulosa, emicellulosa e lignina (Bellettini et al. 2019). Grazie alla secrezione di enzimi extracellulari ossidativi chiamati *laccasi* (Bellettini et al. 2019; Raman et al. 2021; Sánchez 2010), vengono idrolizzati i legami tra i diversi composti e si liberano monomeri saccaridici come glucosio, galattosio, xilosio e fruttosio (Okal et al. 2020) che il fungo assimila come nutrimento e per

colonizzare il substrato con il micelio (Melanouri et al. 2022). Per questo il substrato per la coltivazione commerciale, a differenza di quelli utilizzati per gli altri funghi commestibili, non necessita di compostaggio (Maffi 2007).

1.3 Contenuto nutrizionale

La composizione chimica del *P. ostreatus* dipende dal ceppo, dall'origine (Deepalakshmi e Mirunalini 2014) e dal substrato su cui viene coltivato (Josiane et al. 2018), ma in generale le molecole il cui contenuto è elevato sono acqua, carboidrati, fibre e proteine (*Tabella 1*). I valori di umidità, pari a circa l'85-87% del peso del fungo (Krishnamoorthy Deepalakshmi and Sankaran Mirunalini 2014), favoriscono la crescita dei corpi fruttiferi (Bellettini et al. 2019), influenzano la qualità e il valore di mercato del prodotto (Wu e Ahn 2014) e, assieme ad altri fattori come fibre e proteine, determinano la sua caratteristica consistenza al morso (Bellettini et al. 2019). Grazie al notevole contenuto di acqua e al basso potere calorifico (Deepalakshmi e Sankaran 2014) di 156 kilojoule (<https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>), può essere quindi considerato un alimento dietetico (Deepalakshmi and Sankaran 2014). I carboidrati invece costituiscono circa il 50-60% della sostanza secca e sono principalmente presenti sotto forma di polimeri del glicogeno, da composti insolubili, che caratterizzano la maggior parte delle fibre presenti come fibre alimentari, cellulosa, chitina, α e β -glucani, e da emicellulose come mannani, xilani e galattani (Deepalakshmi and Sankaran 2014). Tra i β -glucani, glucani con legami glicosidici ramificati, è presente il pleurano che svolge un'azione antitumorale oltre ad essere fonte di polisaccaridi (Deepalakshmi and Sankaran 2014).

Il *P. ostreatus* contiene lipidi come ad esempio steroli, esteri di steroli, fosfolipidi (Raman et al. 2021) ma il loro contributo nutrizionale è limitato a causa del basso contenuto totale (Deepalakshmi and Sankaran 2014) che è pari a circa 0.3 g per 100 grammi di fungo (<https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>).

I lipidi sono costituiti da acidi grassi la cui struttura è formata da un gruppo carbossilico (-COOH) e da una catena con un numero pari di atomi di carbonio che può presentare legami singoli, nel caso di acidi grassi saturi, e legami doppi, (come acidi grassi insaturi) (<https://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/acidi-grassi/>). La diversa composizione e lunghezza

della catena degli acidi grassi presenti nel *P. ostreatus* varia in base ai diversi substrati utilizzati nel processo di coltivazione (Raman et al. 2021); infatti possono essere presenti acidi grassi monoinsaturi come l'acido oleico (il cui contenuto è pari a 533 $\mu\text{g/g}$ di fungo essiccato (<https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>)) ma anche acidi grassi più complessi

come quelli polinsaturi tra cui l'acido linoleico, precursore dell'odore attraente dei funghi secchi (circa 533 µg/g di fungo essiccato) (Deepalakshmi e Sankaran 2014). L'acido linoleico è uno tra gli acidi grassi Omega 6 che è stato dimostrato avere un ruolo importante nello sviluppo dei bambini (Majesty et al. 2018) e che determina un minor rischio di formazione di placche nei vasi sanguigni (Raman et al. 2021). Quindi il consumo di questa specie di fungo favorisce l'attività antinfiammatoria e inibisce l'accumulo di lipoproteine a bassa densità, riducendo così i valori di colesterolo totale (Raman et al. 2021).

Le proteine di origine fungina hanno un elevato valore nutrizionale (González et al. 2021) poiché possiedono un profilo completo di aminoacidi essenziali che permette di coprire i fabbisogni degli organismi umani adulti (González et al. 2020). Il loro contenuto però varia molto in base alle specie, ai ceppi, al substrato di coltivazione e ad altri fattori ambientali e quindi il loro quantitativo è variabile e si aggira tra il 19 e il 37% del peso secco (González et al. 2020).

È stato studiato che la digeribilità delle proteine varia dal 60 al 70% (González et al. 2021); questo perché sono presenti alcune sostanze, come ad esempio i composti fenolici e una tipologia di lectina chiamata emoagglutinina, che interferiscono sull'assorbimento dei composti proteici inibendo l'azione degli enzimi digestivi (González et al. 2020).

Tabella 1: Valori dei macronutrienti presenti nel *Pleurotus ostreatus* (Riferimenti: <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>)

| Descrizione nutriente | Valore per 100 g. | Valore per porzione (200 g.) |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Acqua (g) | 90.4 | 180.8 |
| Energia (kcal) | 37 | 75 |
| Energia (kJ) | 156 | 312 |
| Proteine (g) | 2.2 | 4.4 |
| Lipidi (g) | 0.3 | 0.6 |
| Colesterolo (mg) | 0 | 0 |
| Carboidrati disponibili (g) | 5.6 | 11.2 |
| Amido (g) | 0 | 0 |
| Zuccheri solubili (g) | 5.6 | 11.2 |
| Alcool (g) | 0 | 0 |
| Fibra totale (g) | 2.4 | 4.8 |
| Fibra solubile (g) | 0.25 | 0.50 |
| Fibra insolubile (g) | 2.15 | 4.30 |

Anche gli aminoacidi, unità costituenti delle proteine, variano in base alla struttura genetica della specie e delle differenze fisiche e chimiche del substrato (Majesty et al. 2018). Gli aminoacidi neutri e quelli a catena ramificata, cioè leucina, isoleucina e valina, modificano l'assorbimento nel cervello del triptofano e della tirosina e quindi anche la loro conversione rispettivamente in serotonina e

catecolamine (Majesty et al. 2018). Affinché le proteine possano essere utilizzate dall'organismo umano, si deve valutare la loro qualità cioè la capacità delle proteine di fornire azoto e aminoacidi per le funzioni corporee (González et al. 2020). Esistono delle proteine complete che contengono tutti gli aminoacidi essenziali e nelle quantità necessarie per soddisfare i fabbisogni. Alcuni aminoacidi, come lisina, metionina, cisteina, treonina e triptofano, invece limitano questa qualità perché vengono sintetizzati da precursori strutturalmente molto simili che l'organismo deve introdurre con la dieta (González et al. 2020). Perciò, le diverse proteine, vengono valutate attraverso un punteggio chimico che indica la proporzione di ciascun aminoacido essenziale presente nella proteina rispetto ad uno standard di riferimento che contenga le quantità adeguate degli aminoacidi essenziali (González et al. 2020). Per il *P. ostreatus* questo punteggio è pari a 107 (Tabella 2).

Tabella 2: Valori degli aminoacidi presenti nel *Pleurotus ostreatus* (Riferimenti: <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>)

| AMINOACIDI (% di proteine) | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Descrizione nutriente | Valore per 100 g. |
| Acido aspartico | 9.14 |
| Acido glutammico | 16.50 |
| Alanina | 8.82 |
| Arginina | 7.05 |
| Cistina | 0.91 |
| Fenilalanina | 4.00 |
| Glicina | 4.86 |
| Isoleucina | 4.05 |
| Istidina | 2.27 |
| Leucina | 7.82 |
| Lisina | 6.00 |
| Metionina | 1.45 |
| Prolina | 3.95 |
| Tirosina | 3.91 |
| Treonina | 5.27 |
| Triptofano | 2.32 |
| Serina | 4.50 |
| Valina | 5.23 |
| Indice chimico | 107 |
| Aminoacido limitante | Solf. |

I corpi fruttiferi del fungo sono caratterizzati da un elevato livello di costituenti minerali assimilabili il cui contenuto dipende dalla specie e dalla maturazione dei funghi ma anche dal diametro dei pilei e dal substrato (Deepalakshmi e Sankaran 2014). Sono stati riportati circa 287 mg di potassio su 100 gr di funghi e 97 mg di fosforo (<https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>).

Il potassio è un micronutriente essenziale utile per l'equilibrio acido-base (Majesty et al. 2018) ma anche per le sue diverse reazioni enzimatiche negli alimenti. Queste caratteristiche rendono quindi il *P. ostreatus* un buon alimento per chi soffre di ipertensione e malattie cardiache (E. G et al. 2018). Invece, l'80% di fosforo si associa con il calcio per formare le ossa e i denti mentre la restante percentuale è nel sangue e nei tessuti molli; perciò essendo abbondante nei basidiocarpi con l'assunzione di funghi può, una volta assorbito, essere utilizzato dall'organismo umano (Josiane et al. 2018). Tra i minerali, ma in quantità minori (*Tabella 3*), sono presenti anche il ferro, che possiede un ruolo nelle ferredoxine e nell'emoglobina, magnesio (17 mg), che opera assieme al fosforo per l'AMP ciclico (Majesty et al. 2018), calcio (3 mg) e sodio (7.4 mg). Quest'ultimo permette la trasmissione degli impulsi nervosi (Majesty et al. 2018) e assieme a composti carbonilici, tra cui 1-ottanolo, 3-ottanolo e 1-otten-3-olo, conferisce il caratteristico sapore ed aroma del fungo (Deepalakshmi e Sankaran 2014). Il rapporto di questo elemento assieme al potassio ha valori al di sotto del livello critico, pari a uno, che determina quindi una minor probabilità di insorgenza dell'ipertensione (Majesty et al. 2018).

Tabella 3: Valori dei minerali presenti nel Pleurotus ostreatus (Riferimenti: <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>)

| MINERALI | | |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Descrizione nutriente | Valore per 100 g. | Valore per porzione (200 g.) |
| Sodio (mg) | 7.4 | 15 |
| Potassio (mg) | 287 | 574 |
| Calcio (mg) | 3 | 6 |
| Magnesio (mg) | 17 | 34 |
| Fosforo (mg) | 97 | 194 |
| Ferro (mg) | 0.9 | 1.8 |

Le vitamine sono sostanze chimiche che gli organismi umani non sono in grado di sintetizzare ma, dato che sono necessarie alla crescita e al funzionamento del corpo umano, devono essere assunte in modo regolare attraverso la dieta (Majesty et al. 2018). Una carenza di tali oligoelementi quindi è associata a uno stato di malnutrizione e ha un ruolo importante nel quadro clinico degli organismi umani (Majesty et al. 2018).

È stato notato (*Tabella 4*) che i funghi sono una buona fonte di vitamine soprattutto del gruppo C e B tra cui tiamina, niacina, riboflavina, piridossina, acido pantotenico, cobalamina, ergosterolo, biotina, tocoferoli e acido folico (Deepalakshmi e Sankaran 2014). L'acido folico, forma ossidata del folato, secondo le linee guida dell'OMS e della FAO è un integratore essenziale durante l'ovulazione e limita il rischio di difetti del tubo neurale nelle gravidanze precoci (Raman et al. 2021).

Tra le altre vitamine, i funghi sono ricchi di vitamina D₂ e perciò vengono considerati l'unica fonte di cibo non animale che la contengono, diventando quindi una possibile soluzione alla carenza di vitamina D nei vegani (Majesty et al. 2018).

Tabella 4: Valori di vitamine presenti nel *Pleurotus ostreatus* (Deepalakshmi e Sankaran 2014)

| VITAMINE | |
|-----------------------|-------------------|
| Descrizione nutriente | Valore per 100 g. |
| Tiamina (mg) | 1.9-2.0 |
| Riboflavina (mg) | 1.8-5.1 |
| Niacina (mg) | 30-65 |
| Folato (mg) | 0.3-0.7 |
| Acido ascorbico (mg) | 28-35 |

1.4 Coltivazione

La coltivazione del *P. ostreatus* è un processo economicamente sostenibile ed ecologico che, per i suoi bassi costi di produzione e l'elevata capacità produttiva, è cresciuta rapidamente a livello globale (Raman et al. 2021). La tecnica prevede l'utilizzo di substrati di crescita realizzati a partire da rifiuti agricoli come ad esempio foglie di banana, frutti e semi di mango e paglia di frumento o di riso (Raman et al. 2021). La trasformazione di questi rifiuti organici permette di favorire il riutilizzo di sottoprodotti (Golian et al. 2015) e lo sviluppo di un sistema agrario ecosostenibile e circolare, grazie anche al loro utilizzo come compost per il suolo una volta terminato il periodo di raccolta (Wan Mahari et al. 2020). Il fungo per crescere si adatta ad un ampio intervallo di temperature, a umidità relativamente elevata e a tollerare elevati livelli di anidride carbonica (Raman et al. 2021). La sua sopravvivenza e la sua moltiplicazione sono legate anche ad una serie di fattori che possono agire individualmente o interagendo tra loro: l'umidità, il pH, il rapporto tra carbonio e azoto del substrato ma anche la temperatura esterna o la quantità di inoculo (Bellettini et al. 2019).

L'umidità del substrato influisce sulla crescita dei funghi poiché i nutrienti vengono trasportati dal micelio ai corpi fruttiferi da un flusso costante di umidità (Bellettini et al. 2019). Se eccessiva però si riduce la porosità del substrato rendendo impossibile lo sviluppo del corpo fruttifero, influenzando anche la diffusione di organismi come batteri e nematodi (Bellettini et al. 2019). Il livello di umidità del substrato appropriato è compreso tra il 50% e il 70%, se inferiore a questo intervallo si registrerà la morte del corpo fruttifero (Bellettini et al. 2019). Anche il pH ha un ruolo importante per la crescita dei funghi e il suo valore cambia in base al ceppo (Bellettini et al. 2019) e alla fase di crescita; per la formazione del micelio l'intervallo è compreso tra 4,0 e 7,0, per il basidiocarpo è tra 3,5 e 5,0 e lo sviluppo del corpo fruttifero si ottiene tra 6,5 e 7,0 (Bellettini et al. 2019).

Con la colonizzazione fungina, il pH diminuisce fino a valori attorno al 4,0 per la riduzione degli acidi organici, soprattutto quello ossalico (Bellettini et al. 2019).

I funghi devono trovare nel substrato un rapporto basso tra carbonio e azoto poiché la produttività del *P. ostreatus* aumenta del 50% in quanto viene favorito lo sviluppo del micelio (Bellettini et al. 2019; Wan Mahari et al. 2020). Nella fase di sviluppo invece è più favorevole il verificarsi di un rapporto inferiore poiché il quantitativo di azoto è eccessivo, derivato da un'errata integrazione, determinando così la degradazione della lignina e il minor sviluppo del micelio (Bellettini et al. 2019). Il substrato deve presentare quindi un rapporto carbonio/azoto compreso tra 15/1 e 25/1 portando ad un'elevata produzione in considerazione dei costi di produzione e della domanda del mercato (Bellettini et al. 2019). Importante è anche la quantità di inoculo che viene deposto nel substrato che non deve superare il 10% del peso del substrato perché se il livello è più basso non si ha la quantità giusta per avviare la crescita mentre se eccessivo si può riscontrare un'inibizione competitiva (Bellettini et al. 2019).

La temperatura è uno dei principali fattori ambientali che influenza l'altezza e il diametro dello stelo e la dimensione del cappello (Bellettini et al. 2019). I valori utilizzati per la crescita del micelio si aggirano attorno ai 25°C e poi vengono abbassati a circa 15°C per favorire la fruttificazione e permettere quindi la produzione dei corpi fruttiferi (Bellettini et al. 2019). Parallelamente è importante però anche la temperatura che viene impiegata nella produzione dei substrati in modo tale da sterilizzare il composto. Esistono diverse tecniche che possono essere utilizzate: sterilizzazione a 121°C in autoclave, trattamento con vapore a 80-100°C per diverse ore e pastorizzazione a 72°C o con vapore a 60°C (Bellettini et al. 2019).

1.4.1 Substrato

I funghi del genere *Pleurotus* sono decompositori primari del legno e di altri materiali costituiti da cellulosa (come ad esempio la paglia) perciò, il substrato su cui verranno seminati, non deve subire un compostaggio ma viene semplicemente bagnato e liberato tramite sterilizzazione dai parassiti (Maffi 2007). La paglia, preferibilmente di grano duro a cui può essere prevista l'aggiunta di una percentuale di fieno di erba medica per aumentare il contenuto di azoto, viene inumidita in modo tale che i microrganismi possano degradare lo strato ceroso che la ricopre e quindi aumenti l'aggressione del micelio del fungo (Maffi 2007). Il materiale viene quindi accumulato in un luogo all'esterno per periodi variabili nelle diverse aziende e ripetutamente girato in modo da mantenere il livello di umidità e di degradazione della materia uniforme (Maffi 2007). Il composto viene poi pastorizzato in tunnel perfettamente chiusi e caratterizzati da filtri con diametro di 2-3 micron, per evitare l'ingresso alle spore delle muffe, in cui si raggiungono i 60-70°C per un periodo di tempo che varia dalle 48 ore ad una settimana (Maffi 2007). Si procede con la pastorizzazione, processo che si sviluppa in due fasi: nella prima il composto viene portato e mantenuto a 57-59°C per 8-10 ore per poter eliminare

gli organismi presenti nel composto che potrebbero danneggiare la coltivazione. La seconda fase, detta di condizionamento, prevede di mantenere la temperatura a 46-48°C per 4-5 giorni in modo da degradare il composto e renderlo selettivo per lo sviluppo del micelio. Alla conclusione del trattamento, il composto viene portato alla temperatura di semina che varia dai 23°C nel periodo invernale ai 30°C nel periodo estivo e viene ottenuta un'umidità del 75% e valori di pH superiori a 8 per evitare lo sviluppo di muffe verdi chiamate *Trichoderma* (Maffi 2007). Per ottenere lo sviluppo dei corpi fruttiferi, una volta che il substrato è raffreddato, vengono depositi i semi chiamati "spawn" con la specie desiderata (Sánchez 2010). Al momento della deposizione del micelio può essere aggiunto un supplemento a rilascio ritardato, con valori compreso tra il 3 e il 10% del peso del substrato secco, per aumentare la resa e le dimensioni del fungo (Sánchez 2010). Se il quantitativo è eccessivo il substrato può surriscaldarsi se i coltivatori non effettuano controlli sulla temperatura dell'aria (Sánchez 2010). Il substrato viene poi inserito in sacchetti di polietilene (Sánchez 2010) il cui peso e numero di fori è variabile per permettere ai funghi di svilupparsi all'esterno (Maffi 2007). I sacchetti saranno incubati per 12-14 giorni a 25°C con un'umidità relativa del 70 % (Raman et al. 2021) e verranno mantenuti nella camera di coltivazione a 15-23°C con un'umidità relativa dell'85-95% (Raman et al. 2021). Durante la fase vegetativa, il micelio assorbe i nutrienti colonizzando il substrato ottenendo tutti i componenti necessari alla crescita come fonti di carbonio, azoto e sali minerali (Melanouri et al. 2022). Dopo 3-4 settimane dalla deposizione dell'inoculo, a seconda del ceppo e della temperatura di semina, dal substrato iniziano a spuntare i primi corpi fruttiferi (Sánchez 2010) e ha inizio la cosiddetta volata. Il numero medio di volate è 3, in cui progressivamente la produzione di corpi fruttiferi diminuisce, e l'intervallo tra i picchi produttivi di due volate è di circa due settimane (Regione del Veneto 2021).

1.5 Biofortificazione

La biofortificazione è il processo mediante il quale i micronutrienti giornalieri necessari vengono forniti direttamente alle colture di base combinando la gestione, l'allevamento e gli approcci genetici (Hirschi 2009). Le piante infatti contengono livelli insufficienti dei diversi micronutrienti che non permettono di soddisfare il fabbisogno minimo giornaliero degli organismi umani se consumate in quantità normali. Inoltre, questi nutrienti non sono distribuiti in maniera uniforme tra le parti della pianta; ad esempio il contenuto di ferro è alto nelle foglie di riso ma basso nel seme (Hirschi 2009). Per questo la biofortificazione è diretta ad aumentare i livelli di micronutrienti nei tessuti commestibili delle colture (Hirschi 2009) tramite l'impiego di promotori tessuto-specifici o promotori costitutivi; i primi forniscono un controllo sui geni nativi in determinate cellule, tessuti o fasi di

sviluppo, i secondi invece possono guidare l'espressione genica a un livello costante in tutti i tessuti in ogni momento (Yin et al. 2020). In alcuni casi l'espressione di tali transgeni può indurre effetti indesiderati sulla crescita, sullo sviluppo e sulla resa delle colture, perciò vengono utilizzati dei promotori che sono inducibili alla luce (Yin et al. 2020). Questa tecnica può essere applicata anche per i funghi coltivati al fine di modificare lo sviluppo e la morfologia del corpo fruttifero (Wang et al. 2020) e migliorare la concentrazione dei nutrienti presenti in esso come, ad esempio, la vitamina D₂ (Wu e Ahn 2014).

1.5.1 Luce

Assieme alla temperatura e i nutrienti, la luce è un fattore ambientale critico per la differenziazione del primordio e l'induzione del corpo fruttifero nei funghi (Wang et al. 2020). Essa infatti agisce da segnale per l'innesco di vari processi biofisici e biochimici che alla fine portano a reazioni morfologiche e fototrofiche (Siwulski, Ziombra, and Sobieralski 2012). La lunghezza d'onda effettiva per l'induzione del corpo fruttifero include la lunghezza d'onda dell'ultravioletto (280 nm) e la luce blu (520 nm) (Wang et al. 2020). Durante le osservazioni condotte sull'effetto della luce led sullo sviluppo del micelio vegetativo e riproduttivo, è stato riscontrato che la quantità di corpi fruttiferi prodotti sotto l'esposizione alla luce era superiore di oltre il 100% rispetto ai corpi fruttiferi completamente formati che crescono con luce naturale (Zawadzka et al. 2022). Inoltre dopo l'erogazione di un'intensità di luce compresa tra 200-640 lux per 8-12 ore al giorno, è possibile notare un anticipo nello sviluppo dei funghi, mentre per le coltivazioni senza luce si notano solo le ife vegetative (Zawadzka et al. 2022). Alcuni studi hanno identificato i fotorecettori della luce rossa e blu nei funghi e hanno descritto fenomeni di fotorisposta legati alla formazione dei corpi fruttiferi, alla sporulazione, fototropismo, ciclo circadiano e la biosintesi di metaboliti secondari (Wang et al. 2020). La luce blu inoltre regola l'espressione dei geni che codificano enzimi attivi dei carboidrati durante la differenziazione del primordio nel corpo fruttifero e modifica il contenuto di vitamina D₂ (Wang et al. 2020).

1.6 Vitamina D

La vitamina D svolge un ruolo importante nei diversi processi metabolici umani come il metabolismo del calcio e del fosforo, l'omeostasi scheletrica e neuromuscolare. Si ottiene per via endogena dopo un'esposizione ai raggi UV, da integratori alimentari e fonti alimentari (Taofiq et al. 2017). È essenziale per la salute umana e la sua carenza, prevalente in Europa, Medio Oriente, e Nord America

(Taofiq et al. 2017), è un'epidemia non riconosciuta associata a tumori comuni, rachitismo, osteoporosi, diabete, malattie autoimmuni e malattie cardiovascolari (Wu e Ahn 2014).

1.6.1 Caratteristiche generali e contenuto nei funghi

L'assunzione raccomandata di vitamina D è diversa in base all'età e alla nazione in cui si vive (Tabella 5).

Tabella 5: Dose raccomandata espressa in µg/giorno in base all'età e alla nazione di provenienza (Cardwell et al. 2018)

| Nazione | Età (anni) | | | | |
|----------------------------------|------------|-------|-------|-------|-----|
| | 1-18 | 19-30 | 31-50 | 51-70 | 71+ |
| Stati Uniti d'America | 15 | 15 | 15 | 15 | 20 |
| Canada | 15 | 15 | 15 | 15 | 20 |
| Regno Unito | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Europa | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Australia e Nuova Zelanda | 5 | 5 | 5 | 10 | 15 |

Il fabbisogno umano di vitamina D dovrebbe essere soddisfatto dalla conversione epidermica indotta dalla luce solare del 7-deidrocolesterolo (pro-vitamina D₃) alla pre-vitamina D₃ (Wittig et al. 2013). Dopo l'esposizione ai raggi UV-B, l'anello B della pro-vitamina D si apre fotochimicamente alla pre-vitamina D intermedia, che poi subisce un riarrangiamento termico per formare la vitamina D (Wittig et al. 2013). Dopo l'isomerizzazione della pre-vitamina D₃, la risultante vitamina subisce un'idrossilazione per formare 25-idrossivitamina D, chiamata anche calcidiolo, e la forma più potente cioè l'1,25-diidrossivitamina D, definita calcitriolo (Taofiq et al. 2017). In natura esistono due forme distinte di vitamina D: la vitamina D₂ e vitamina D₃. La vitamina D₂, nota come "ergocalciferolo", viene sintetizzata quando l'ergosterolo di lieviti e funghi si attiva dall'irradiazione UV mentre la vitamina D₃, definita anche "colecalfiferolo", si può trovare in alimenti animali come oli di fegato di pesce, pesce, burro e formaggio ed è la forma biologicamente più attiva (Taofiq et al. 2017). Gli integratori sul mercato quindi sono derivati da fonti animali che diventano un problema per i vegani e inoltre l'applicazione terapeutica è limitata poiché può portare a ipercalcemia, cioè un eccesso di calcio nel sangue (Wu e Ahn 2014). L'esposizione alla luce solare è fonte primaria di vitamina D per l'uomo, tuttavia questo è diventato problematico a causa dell'utilizzo di creme solari, obesità, melanina e invecchiamento, che interferiscono con l'esposizione solare (Wu e Ahn 2014). I funghi quindi vengono considerati l'unica fonte di cibo naturale non di origine animale che contenga vitamina D₂, la cui concentrazione può essere migliorata dall'esposizione dei corpi fruttiferi alla luce ultravioletta (Wu e Ahn 2014). Nelle pareti cellulari dei funghi sono presenti alte concentrazioni di ergosterolo che svolge un ruolo simile al colesterolo negli animali, cioè rafforza le membrane cellulari

modulando la fluidità della membrana e aiutando il trasporto intracellulare (Cardwell et al. 2018). Con l'assorbimento di energia luminosa ultravioletta B, si ha l'isomerizzazione della molecola e la scissione del legame tra il Carbonio 9 e 10, risultando in un intermedio instabile chiamato "pre-vitamina D₂" (Keflie et al. 2019). Poiché la luce UVB non è in grado di penetrare in profondità il corpo fruttifero, la velocità di reazione deve cessare quando l'ergosterolo superficiale è esaurito; quindi le rese sono limitate ma allo stesso tempo il rischio di accumulare dosi elevate è basso (Keflie et al. 2019). Oltre alla lunghezza d'onda dell'irradiazione UV, l'efficienza della vitamina D₂ è influenzata dalla temperatura ambiente, dal tempo di esposizione e dall'intensità della radiazione (Keflie et al. 2019; Wu and Ahn 2014). L'ergosterolo nei funghi, può essere convertito in vitamina D₂ per effetto dei raggi UV non solo durante la crescita, ma anche dopo la raccolta (Sławińska et al. 2016). I funghi sono alimenti altamente deperibili perciò i corpi fruttiferi vengono essiccati ad aria calda a una temperatura tra 40°C e 70°C oppure liofilizzati per aumentare la loro conservazione (Sławińska et al. 2016). Queste tecniche, unite all'irraggiamento UVB, determinano un maggiore contenuto di vitamina D₂ nei corpi fruttiferi dato che con un minor livello di umidità non si verifica l'effetto di diluizione dell'ergosterolo (Sławińska et al. 2016). Tuttavia durante il periodo di conservazione per il *P. ostreatus* si registra una diminuzione, anche se statisticamente non significativa, di vitamina D₂ che può essere indotta dal mantenimento dei corpi fruttiferi in contenitori di plastica chiusi all'interno di un luogo buio e asciutto (Sławińska et al. 2016). Assumendo che la dose giornaliera raccomandata (RDA) di vitamina D per diverse categorie della popolazione mondiale sia compresa tra 5 e 15 µg al giorno (Cardwell et al. 2018), 1 grammo di sostanza secca di funghi essiccati con aria calda e irraggiati con UVB può fornire comunque più del 100% della dose giornaliera di vitamina D₂ durante tutto il periodo di conservazione (Sławińska et al. 2016).

2. Scopo del lavoro

Il *P. ostreatus* è una specie di fungo che grazie alle sue caratteristiche organolettiche e nutrizionali ricopre un ruolo importante nel mercato ortofrutticolo, tanto da essere riconosciuto come il secondo tra i funghi più coltivati al mondo. I suoi corpi fruttiferi presentano alte concentrazioni di macronutrienti come umidità e proteine, e anche molti micronutrienti come sali minerali e vitamine tra cui quelle del gruppo C e B, ad esempio tiamina, niacina e riboflavina, ma soprattutto ergosterolo. Questo sterolo, grazie all'irraggiamento di lunghezze d'onda UV, viene convertito in vitamina D₂ che possiede un ruolo importante nell'organismo umano. L'esperimento trattato in questa tesi fa parte del progetto YESP, finanziato dal Piano di Sviluppo Rurale della Regione del Veneto, ed ha l'obiettivo di valutare gli effetti sulle caratteristiche produttive, di accrescimento e qualitative (con particolare riferimento al quantitativo di vitamina D₂) di due tipologie di micelio di *P. ostreatus* coltivate su due diversi substrati (con paglia derivante da agricoltura biologica e convenzionale) irraggiati con illuminazioni led a 3 lunghezze d'onda diverse: luce blu, luce rossa e luce rossa/blu.

3. Materiali e metodi

3.1 Schema sperimentale

La prova è stata condotta all'interno della fungaia sperimentale situata presso l'Azienda Agraria "Lucio Toniolo" dell'Università di Padova a Legnaro (PD). L'area sperimentale è stata localizzata nei primi metri della struttura (*Figura 3*) utilizzando una parete di tessuto anti-alga per dividere i diversi blocchi sperimentali e concentrare l'intensità luminosa sui sacchi contenenti il substrato. La struttura presenta tecnologie per la climatizzazione, che permettono il raffrescamento dell'ambiente tramite un sistema di irrigazione a micro sprinkler, ma anche di riscaldamento grazie a un generatore a gasolio. Per monitorare i dati climatici della fungaia, come la temperatura ambientale e l'umidità dell'aria, è stato inserito un sensore nei settori di sperimentazione il quale ha inviato le misurazioni a una centralina che automaticamente regolava i diversi parametri attivando i sistemi menzionati. Per rilevare i valori della concentrazione di anidride carbonica invece è stato posizionato un sensore sulla parete nord della fungaia che registrava i livelli presenti nell'intera struttura. All'interno delle diverse aree adibite a questa prova sono state posizionate delle trappole cromotropiche per limitare la presenza dei ditteri patogeni e delle lampade led di diverse lunghezze d'onda per valutare il loro impatto sulla produzione e sulla qualità del *P. ostreatus*.



Figura 3: Zona adibita alla prova sperimentale con illuminazione a led

All'interno delle diverse sezioni, i sacchi sono stati posizionati seguendo uno schema a T: 2 in posizione verticale e uno orizzontale in modo tale da ridurre lo spazio di coltivazione. La prova è stata effettuata su 48 sacchi, 12 per ogni trattamento luminoso (*Figura 4*) e per 2 tipologie di substrato, fornite da una nota azienda italiana specializzata nella loro produzione, inoculati con 2 differenti miceli. I substrati contenevano una matrice pagliosa a gestione biologica (indicato con BIO oppure B) e convenzionale (CONV oppure C) mentre i miceli sono stati identificati come M1 per il micelio P80 e M2 per il P73.



Figura 4: Panoramica dei diversi trattamenti luminosi – In alto a sinistra led rossi e blu e a destra led blu; in basso a sinistra led rossi e a destra il "Controllo", sacchi coltivati con normali condizioni ambientali

Nella *Tabella 6* sono visibili le tipologie di substrato che sono state utilizzate e quali miceli sono stati inoculati, il numero di fori per sacco, il numero di sacchi con diverse combinazioni substrato/micelio per ogni trattamento luminoso, il peso medio del sacco espresso in kg e il materiale di copertura dei sacchi. Prima dell'inizio della prova sperimentale sono state effettuate delle misurazioni sui substrati per valutare i diversi livelli di elementi presenti al loro interno (*Tabella 7*).

Tabella 6: Caratteristiche dei sacchi per tipologia di substrato e micelio.

| SUBSTRATO | MICELIO | NUMERO SACCHI | PESO MEDIO SACCO (kg) | NUMERO FORI | MATERIALE DI COPERTURA |
|---------------|---------|---------------|-----------------------|-------------|------------------------------|
| Biologico | M1 | 12 | 29,10 | 22 | Polietilene di colore bianco |
| | M2 | 12 | 27,29 | | |
| Convenzionale | M1 | 12 | 26,95 | | |
| | M2 | 12 | 26,98 | | |

Tabella 7: Composizione chimica e presenza di metalli pesati nei diversi substrati utilizzati nella prova all'inizio del ciclo produttivo.

| ELEMENTI | UNITÀ DI MISURA | BIOLOGICO | CONVENZIONALE |
|-----------------------|-----------------|-----------|---------------|
| C. Organico | % | 41,32529 | 41,39632 |
| C. Inorganico | % | 0,365294 | 0,368421 |
| C. Totale | % | 41,69059 | 41,76474 |
| Azoto Tkn | % | 0,700274 | 0,752298 |
| Potassio | mg/kg | 14500,53 | 15616,26 |
| Fosforo | mg/kg | 624,72 | 809,20 |
| Carbonio/Azoto | | 59,53468 | 55,51624 |
| Cadmio | mg/kg | <0,7 | <0,7 |
| Cromo | mg/kg | 6,549626 | 5,178332 |
| Rame | mg/kg | 5,245964 | 4,938545 |
| Ferro | mg/kg | 1463,599 | 1034,635 |
| Piombo | mg/kg | <0,7 | <0,7 |

È stato studiato sulla base delle diverse combinazioni di substrato e micelio poi uno schema sperimentale a blocchi randomizzati per poter garantire un'omogenea disposizione dei trattamenti (Figura 5).

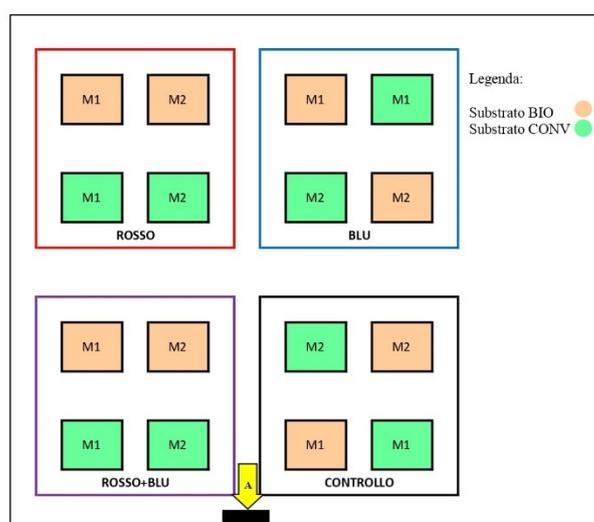


Figura 5: Schema sperimentale dei sacchi suddivisi in cubi per delimitare i trattamenti luminosi; ogni quadrato rappresenta 3 sacchi- A) Entrata fungaia

3.2 Rilievi illuminometrici

Sono stati effettuati dei rilievi illuminometrici in ogni cubo per poter valutare come l'intensità luminosa si distribuisse all'interno dell'area sperimentale. Tramite un radiometro sono state rilevate delle misurazioni a diverse altezze e diversi punti della zona interessata differenziando le diverse radiazioni luminose tramite l'utilizzo di colori distinguibili (Figura 6).

Con "altezza sacchi" si intendono le misurazioni ottenute con il radiometro posizionato sopra ogni schema a T dei diversi trattamenti luminosi rilevando 4-5 radiazioni diverse mentre con "altezza mediana sacchi" vengono compresi i dati ottenuti collocando il radiometro a circa la metà di ogni schema a T previsto per questa prova sperimentale (Figura 7).

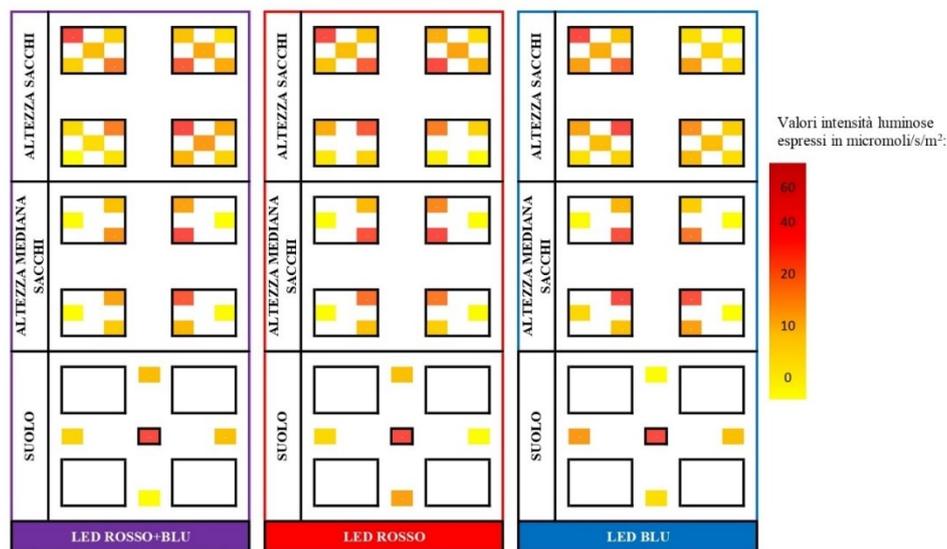


Figura 6: Rilievi illuminometrici effettuati con il fotometro della radiazione luminosa sui sacchi e sulle diverse aree dei trattamenti luminosi espressi in micromoli/s/m²



Figura 7: Localizzazione del posizionamento del radiometro "Suolo", "Altezza mediana sacchi", "Altezza sacchi"

3.3 Conta primordi

La prova ha avuto inizio con l'arrivo in azienda dei sacchi con i substrati inoculati e il loro posizionamento nei cubi il 5 gennaio 2022 avviando così la fase di incubazione. Questa fase prevede il mantenimento della temperatura ambientale a circa 18°C e si conclude con lo sviluppo dei primordi il cui numero è stato registrato ogni 3 giorni. Una volta conclusa la fase di comparsa, ha inizio il periodo di accrescimento; se le condizioni ambientali sono favorevoli, i corpi fruttiferi subiscono una crescita nelle dimensioni e nel volume determinando la loro raccolta entro i 7 giorni successivi (Figura 8).



Figura 8: A) Sviluppo dei primordi; B) Fase di accrescimento dei corpi fruttiferi; C) Famiglia di *P. ostreatus* pronta per la raccolta

3.4 Raccolta e rilievi dimensionali

Una volta che il cappello del *P. ostreatus* si presenta ampio e concavo, inizia la raccolta delle famiglie di funghi che avviene manualmente applicando una forza dall'alto per evitare la rottura dei corpi fruttiferi. Per ogni sacco di substrato durante i giorni di raccolta è stato misurato il peso della produzione e il numero di famiglie raccolte. Inoltre, su 3 famiglie rappresentative è stata effettuato il conteggio del numero di corpi fruttiferi e la misura del diametro, dello spessore e il colore di 3 corpi fruttiferi. L'analisi colorimetrica è stata effettuata con un colorimetro Minolta CR200 che rileva 3 diverse coordinate: L^* , a^* , b^* (Figura 9)

- L^* determina la luminosità con una scala da 0 (nero) a 100 (bianco)
- a^* presenta valori tra - 60 e + 60; se sono inferiori a 0 la tinta sarà verde mentre se sono maggiori la tinta è rossa
- b^* presenta valori tra - 60 e + 60; se sono inferiori a 0 la tinta è blu mentre se sono maggiori la tinta è gialla

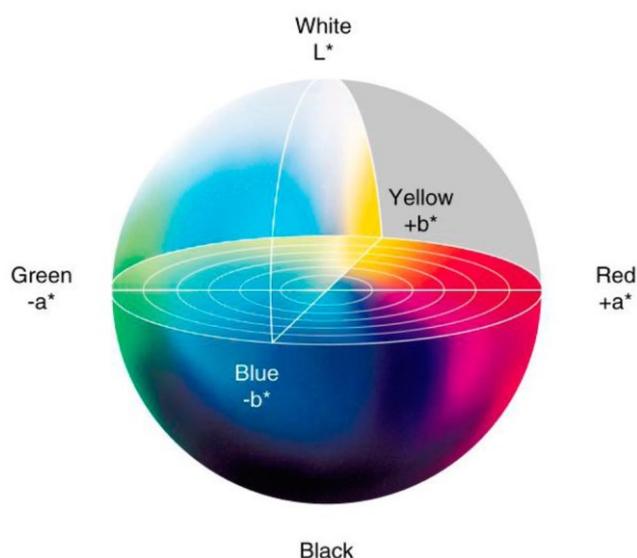


Figura 9: Rappresentazione della scala colorimetrica ottenuta con il Metodo CIE LAB (Riferimenti: <https://www.universofoto.it/perche-codificare-il-colore-classificazione-rgb-colore-lab/>)

In seguito alle analisi morfologiche, un campione è stato posto in stufa ventilata a 65°C per ottenere la percentuale di sostanza secca, mentre altri due campioni sono stati congelati per essere successivamente utilizzati per le analisi qualitative e la determinazione di antiossidanti totali, polifenoli e vitamina D₂.

3.5 Analisi qualitative

Le analisi qualitative hanno avuto lo scopo di caratterizzare il prodotto secondo alcuni parametri, tra cui sostanza secca, contenuto di solidi solubili, pH, conducibilità elettrica ed acidità titolabile. Per determinare la sostanza secca sono state pesate porzioni dei corpi fruttiferi e successivamente poste in stufa a 65°C per 48 ore. Al termine del processo di essiccazione il campione è stato nuovamente pesato ottenendo così la quantità di acqua che è evaporata e quindi per differenza la quantità di sostanza secca del *P. ostreatus*.

Uno dei due campioni precedentemente congelati è stato scongelato al fine di ottenere il succo cellulare contenuto all'interno dei corpi fruttiferi per determinare il contenuto di solidi solubili (°Brix). È stato effettuato tramite rifrattometro portatile digitale HI 96801 Hanna Instruments che utilizza la misura dell'indice di rifrazione per determinare il contenuto zuccherino. Parte del succo è stata inoltre prelevata per eseguire le analisi di pH e conducibilità elettrica (EC) tramite pHmetro-conduttivimetro portatile, modello H19811. L'acidità titolabile è stata determinata secondo il metodo standard ISO 750:1998 (E) tramite il titolatore automatico Titrex Act (Steroglass). Il volume di soda necessario al raggiungimento del punto di flesso (pH 8.2) è stato

utilizzato nella seguente formula:

$$Z = [(V*N*mEqwt)/Y]*100$$

dove:

Z = g di acido per 100 g di campione

V = volume in mL di NaOH usata per la titolazione

N = normalità di NaOH

mEqwt = milliequivalenti di acido (0.064 acido citrico)

Y = volume in mL di campione

3.6 Determinazione antiossidanti e polifenoli totali

La determinazione dell'attività antiossidante e dei fenoli totali ha previsto la liofilizzazione di uno dei due campioni precedentemente congelati ed è stato poi finemente macinato così da ottenere una polvere da cui sono stati prelevati 0,5 g e aggiunti a 20 mL di metanolo per realizzare l'HPLC; il campione è stato filtrato con carta da filtro (589 Schleicher diametro 125 mm). L'attività antiossidante è stata determinata con il metodo FRAP (FerricReducingAbility of Plasma). Il reagente FRAP (soluzione 1 mM di 2,4,6-tripiridil-2 triazina [TPTZ], 2 mM cloruro ferrico e 250 mM di acetato di sodio a pH 3.6) è stato preparato giornalmente a partire da soluzioni madri di 300 mM di buffer acetato, 12 mM di TPTZ (in acido cloridrico 48 mM) e 24 mM di cloruro ferrico in rapporto 10:1:1. A 100 µL di estratto sono stati aggiunti 1900 µL di reagente FRAP e si è omogeneizzato con l'ausilio di un vortex. Dopo 4 minuti a 20 °C è stata letta l'assorbanza a 593 nm (Shimadzu UV-1800) confrontandola con una curva di calibrazione costituita da soluzioni di solfato di ammonio ferroso con concentrazione da 0 a 1200 µg mL⁻¹ di ione ferroso. L'attività antiossidante è stata quindi successivamente espressa come mg di Fe²⁺ equivalenti (Fe²⁺E) per kg di campione secco o fresco.

Per la determinazione dei fenoli, invece, si sono prelevati 200 µL dell'estratto, si sono aggiunti 1000 µL di reattivo di Folin-Ciocalteu e 800 µL di carbonato di sodio anidro al 7.5%. Si è quindi proceduto con 15 secondi di agitazione e successivo riposo per 30 minuti a temperatura ambiente prima di leggere allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 765 nm (Shimadzu UV-1800).

L'assorbanza è stata confrontata con quella letta per soluzioni a concentrazione nota di acido gallico (da 0 a 300 µg mL⁻¹) che hanno subito lo stesso procedimento dei campioni. Il contenuto totale di fenoli è stato espresso come mg di acido gallico equivalenti (GAE) per kg di campione fresco o secco.

3.7 Contenuto di Azoto, Fosforo e Potassio

Nei confronti degli elementi Azoto, Fosforo e Potassio, le ceneri del campione sono state sospese in HCl concentrato, sciogliendo le ceneri di 1 g di sostanza secca in 5 mL di HCl. Trascorsa mezzora, la soluzione è stata diluita con acqua distillata fino al volume di 50 mL. Successivamente si è filtrata la soluzione da impiegare nella lettura del contenuto elementare utilizzando lo spettrofotometro ad emissione ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy) SPECTRO CIROS (della Spettro Italia S.r.l.).

3.8 Analisi anioni e cationi

Per quanto riguarda la determinazione del contenuto di anioni e cationi si è impiegata la cromatografia ionica (IC) usando un sistema cromatografico a gradiente (Dionex ICS-900), costituito da una pompa binaria e da un rivelatore di conducibilità (Dionex DS5) con soppressore anionico (AMMS 300, 4mm) per l'analisi degli anioni e soppressore cationico (CMMS 300, 4mm) per l'analisi dei cationi. La colonna Ion Pac AS23 con dimensioni 4x250 mm è stata utilizzata per l'analisi degli anioni mentre la colonna Ion Pac CS12A con dimensioni 4x250 mm è stata utilizzata per l'analisi dei cationi. Entrambe sono precedute da una pre-colonna. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software Chromeleon per sistemi LC. 200 mg di campione secco macinato sono stati estratti in 50 mL di acqua per 20 minuti su piastra rotante a 150 rpm. Il campione è stato quindi filtrato in un primo momento con carta da filtro 589 Schleicher e successivamente con filtri per siringa in acetato di cellulosa da 0.20 µm. Le iniezioni sono state fatte usando un iniettore a valvole (Rheodyne) con un loop di 50 µL. Sono stati impiegati multi standard di anioni (Dionex), multi standard di cationi (Dionex), eluente concentrato AS23 (Dionex), eluente concentrato CS12A (Dionex). L'eluente utilizzato è costituito dal 100% di sodio carbonato 4.5 mM, sodio bicarbonato 0.8 mM per l'analisi degli anioni e dal 100% di acido metansolfonico 20 mM per l'analisi dei cationi. Il flusso utilizzato è 1 mL/min e la colonna è mantenuta a temperatura ambiente.

3.9 Analisi statistica

I dati ricavati dai rilievi quantitativi e qualitativi sono stati elaborati statisticamente attraverso l'analisi della varianza ANOVA a tre vie e le medie sono state separate attraverso il test HSD di Tukey con $p \leq 0.05$. Per l'elaborazione statistica è stato utilizzato il software Statgraphics 19 centurion (Statgraphics Technologies, Inc.).

4. Risultati

4.1 Risultati produttivi

4.1.1 Primordi

Il ciclo produttivo del *P. ostreatus* si è concluso con la prima volata poiché durante la seconda i sacchi hanno prodotto corpi fruttiferi anomali che non potevano essere commercializzati; per questo motivo la prima volata è l'unica che viene considerata rappresentativa. La produzione cumulata dei primordi è stata normalizzata in base al numero di fori presenti sui sacchi ed è stata valutata in base ai tre trattamenti allo studio: illuminazione LED, micelio e gestione del substrato.

Inizialmente la comparsa dei primordi in funzione al trattamento luminoso (*Fig. 10*) non è risultata statisticamente significativa ma da 45 GDI i sacchi illuminati dal trattamento rosso + blu hanno ottenuto le performance migliori producendo a 51 GDI il 75% di primordi sul totale di fori. Il trattamento rosso e il controllo hanno invece ottenuto la produzione minore con una comparsa a 51 GDI rispettivamente del 45 e 55% dei primordi.

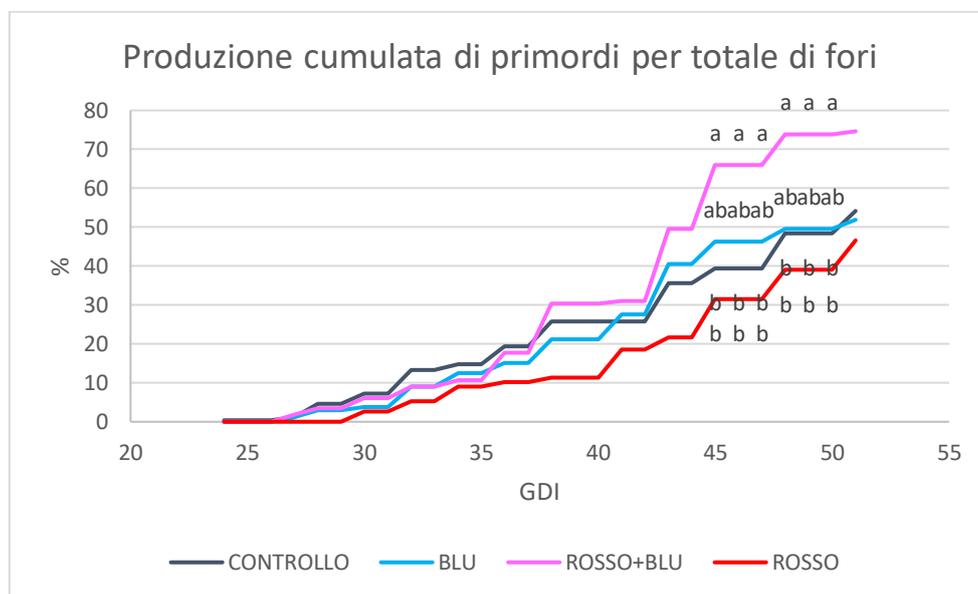


Figura 10: Effetto dei diversi trattamenti luminosi sulla produzione cumulata dei primordi per totale di fori nella prima volata del *P. ostreatus*. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $< 0,05$)

In base al micelio, invece, la produzione di primordi (*Fig. 11*) non è risultata statisticamente significativa. Il micelio M2 ha anticipato la comparsa dei primordi di due giorni, ma durante tutta la volata ha prodotto in modo simultaneo al micelio M1 fino al 53 GDI dove è stato raggiunto in entrambe le tesi il 55% dei primordi sul totale di fori.

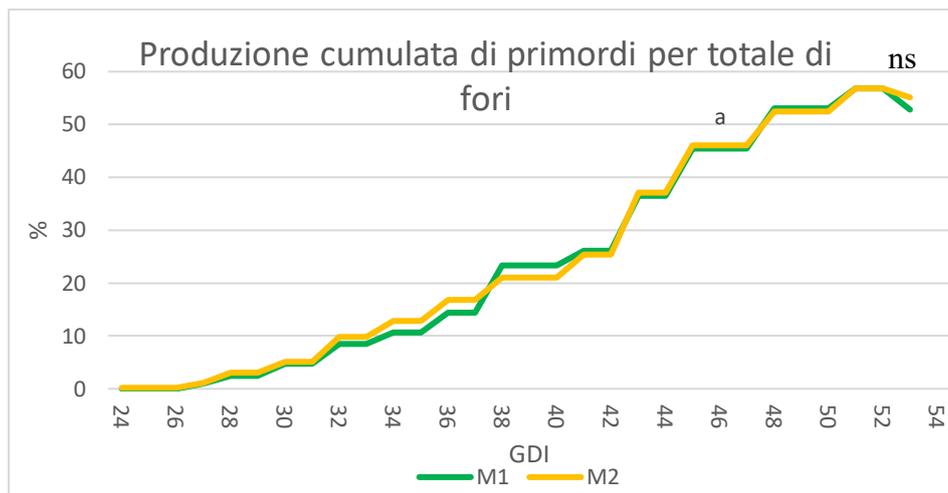


Figura 11: Effetto dei diversi miceli sulla produzione cumulata dei primordi per totale di fori nella prima volata del *P. ostreatus*. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value <0,05)

La diversa gestione del substrato (Fig. 12) ha determinato una differenza statisticamente significativa a partire da 29 GDI quando il substrato convenzionale ha sviluppato una quantità maggiore di primordi rispetto al substrato biologico, fino a 44 GDI in cui è stato prodotto il 47% di primordi. Il substrato biologico ha ottenuto nel complesso una minor comparsa e a 44 GDI è stata registrata la produzione del 40% di primordi. A partire da 45 GDI la produzione non è stata statisticamente differente e lo sviluppo è avvenuto in maniera simultanea fino a 53 GDI, al termine della volata si è registrata la comparsa di primordi sul 60% dei fori per il substrato convenzionale e sul 53% per il substrato biologico.

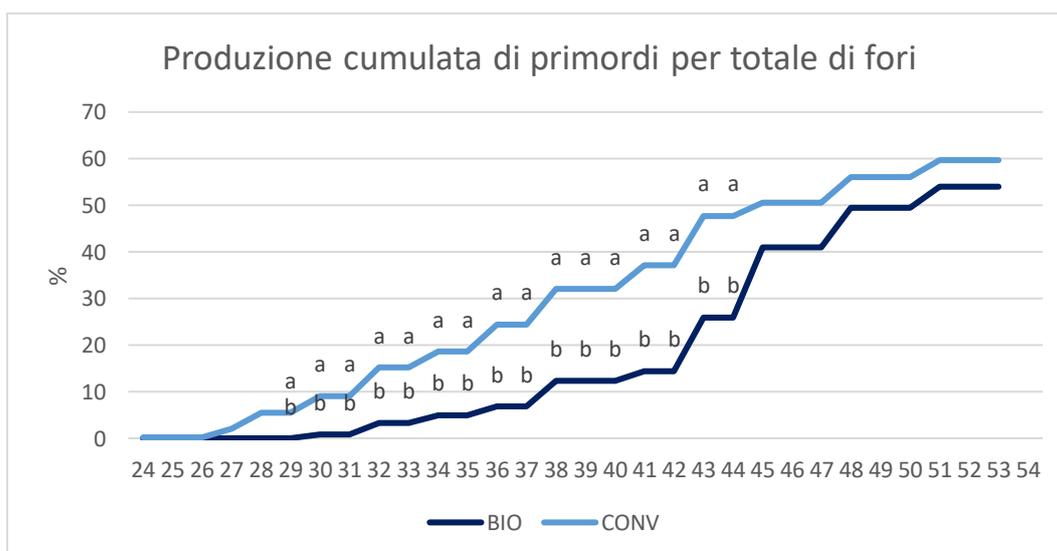


Figura 12: Effetto dei diversi substrati sulla produzione cumulata dei primordi per totale di fori nella prima volata del *P. ostreatus*. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value <0,05)

4.1.2 Produzione

La resa è stata normalizzata in base ai kg di substrato medio dei sacchi studiando l'effetto dei trattamenti luminosi, dei due miceli e dei substrati utilizzati. Nelle figure 13 e 14 sono stati riportati i valori medi riferiti alla produzione su kg di substrato per ogni trattamento luminoso effettuato. La produzione non si è diversificata statisticamente tra i diversi trattamenti luminosi, né per i substrati e i miceli e si assume che il valore medio sia pari a 1,86 kg/kg substrato.

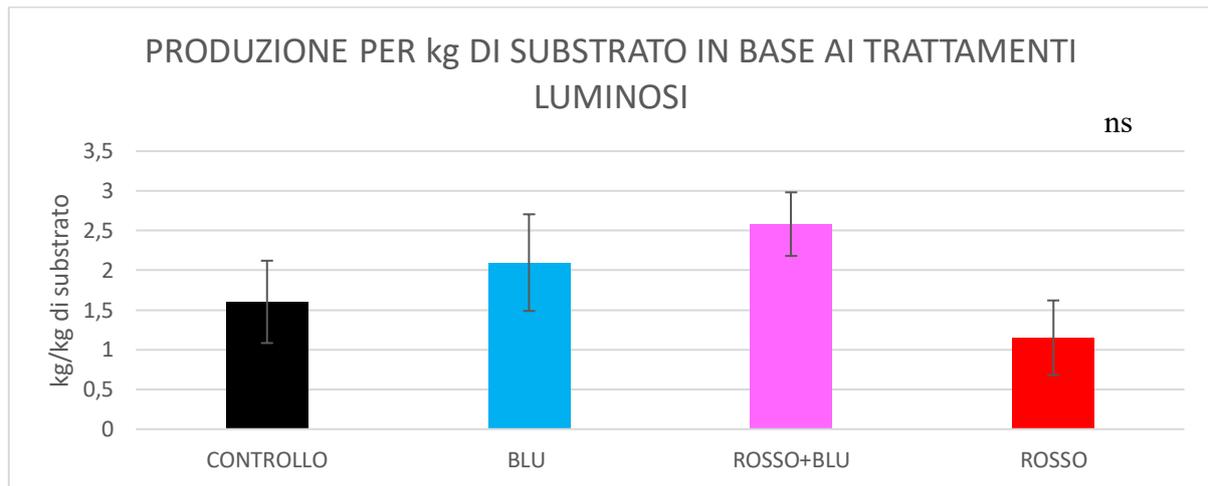


Figura 13: Effetto dei diversi trattamenti luminosi sulla produzione totale della prima volata del *P. ostreatus*. La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

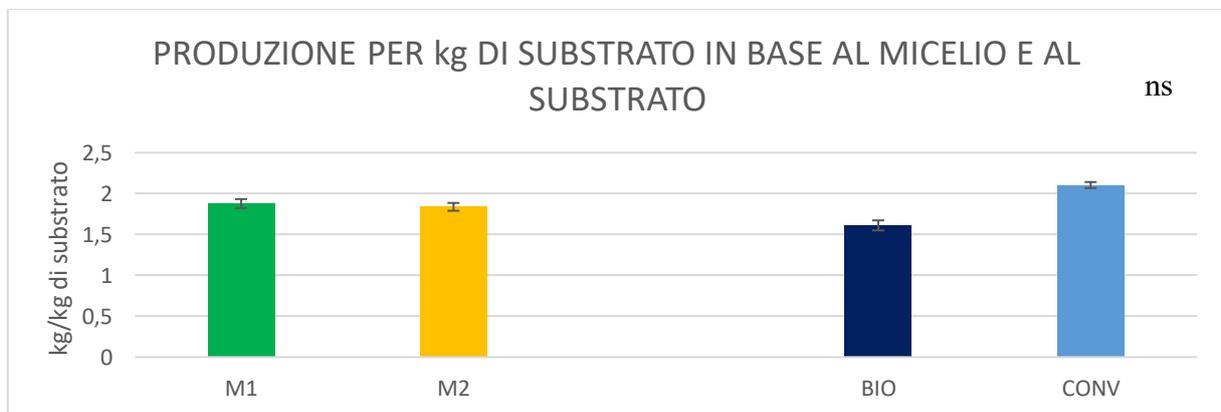


Figura 14: Effetto dei differenti miceli e substrati utilizzato sulla produzione totale della prima volata del *P. ostreatus*. La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

4.1.3 Numero di famiglie per sacco

Il diverso trattamento luminoso non ha avuto effetto sul numero di famiglie prodotte nella prima volata (Fig. 15), il valore medio prodotto è di 6,41 famiglie per sacco. Anche le differenti tipologie di miceli e substrati non hanno determinato una differenza statisticamente significativa.

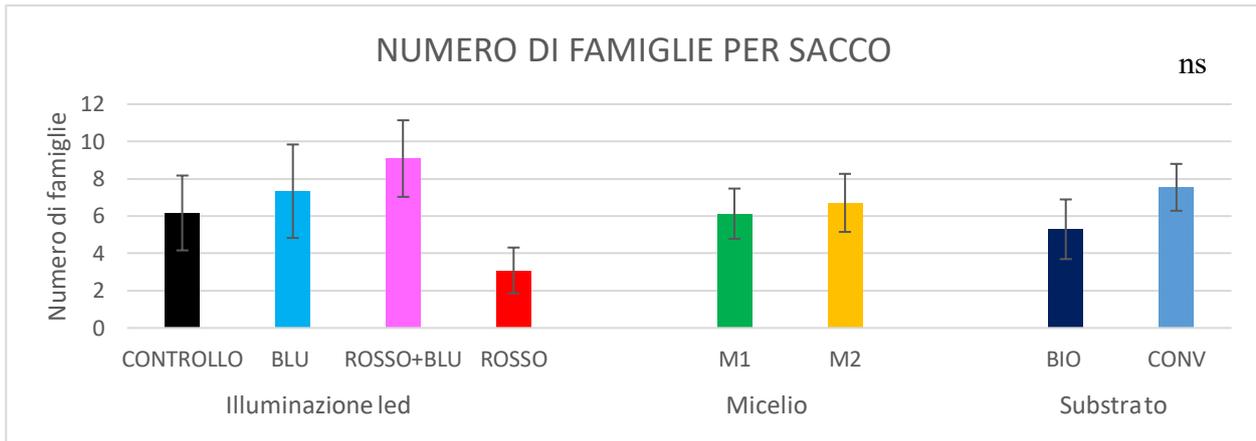


Figura 15: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sul numero di famiglie per sacco della prima volata del *P. ostreatus*. La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $< 0,05$)

4.1.4 Numero corpi fruttiferi per famiglia

Nella figura 16 vengono riportati il numero medio di corpi fruttiferi in base al trattamento luminoso. L'illuminazione rossa, producendo in media 21 corpi fruttiferi per famiglia, è il trattamento maggiormente produttivo e si differenzia statisticamente dagli altri trattamenti analizzati che hanno ottenuto nel complesso una produzione nettamente inferiore con un numero medio di corpi sempre inferiore a 15. Per quanto riguarda il micelio e il substrato, il numero di corpi fruttiferi non è stato statisticamente differente e si assume che il valore medio di basidiocarpi sia pari a 14.

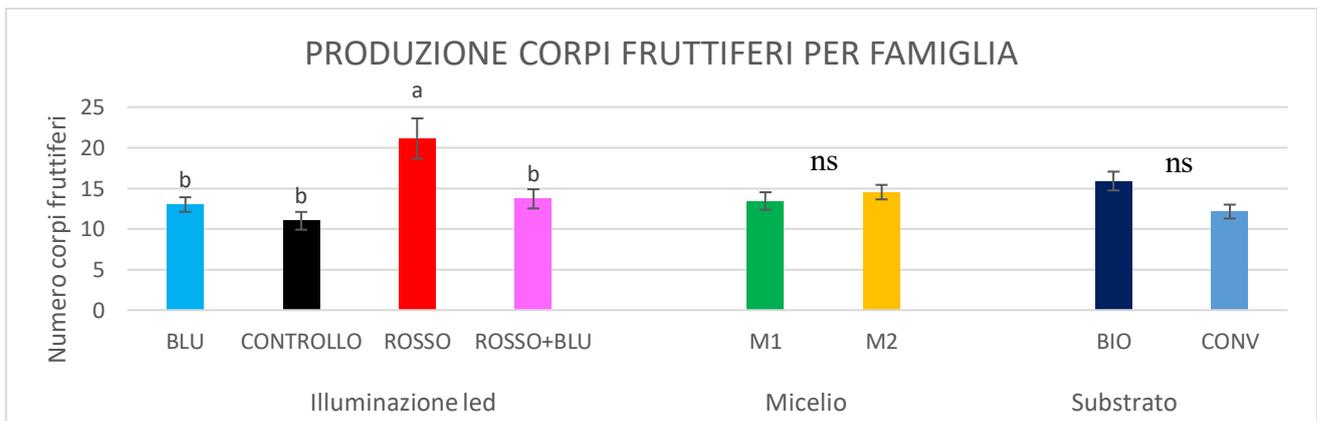


Figura 16: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sul numero dei corpi fruttiferi della prima volata del *P. ostreatus* (p -value $< 0,001$). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $< 0,05$).

4.1.5 Larghezza corpi fruttiferi

La larghezza dei corpi fruttiferi è risultata statisticamente differente per i diversi trattamenti luminosi (Fig. 17). Il trattamento con led blu e il controllo hanno determinato una larghezza maggiore dei corpi

fruttiferi (9,35 cm per il controllo e 8,96 cm per il trattamento blu) rispetto al trattamento con led rossi (7,17 cm). I miceli e i substrati invece non sono risultati statisticamente differenti riportando un valore medio pari a 8,22 cm.

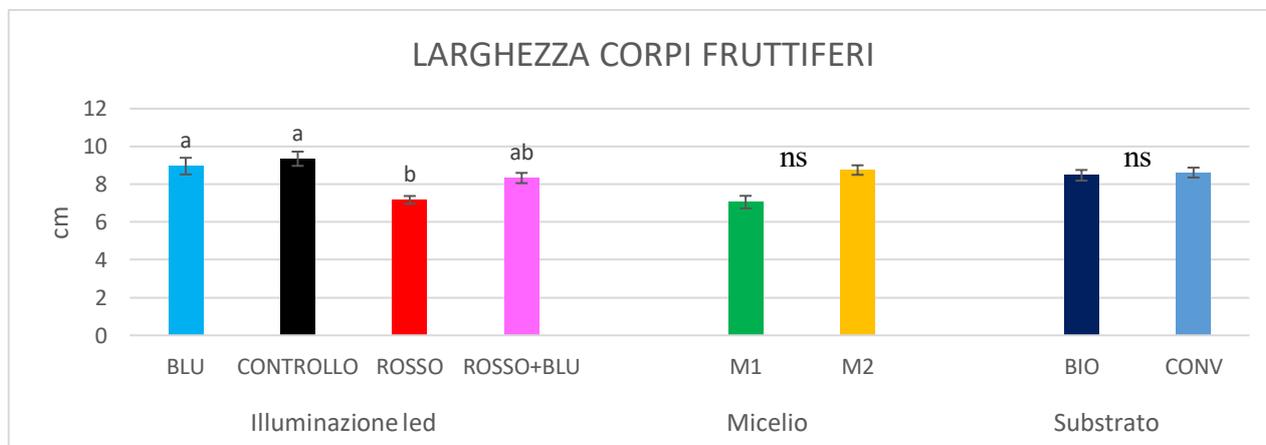


Figura 17: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sulla larghezza di corpi fruttiferi della prima volata del *P. ostreatus* (p -value $<0,001$). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

4.1.6 Spessore corpi fruttiferi

Lo spessore dei corpi fruttiferi non è risultato statisticamente significativo né per il trattamento luminoso né in funzione della tipologia di micelio e substrato utilizzato (Fig. 18). Nel caso del trattamento luminoso si è ottenuto un valore medio di 6,72 cm mentre per i miceli e i substrati di 6,69 cm.

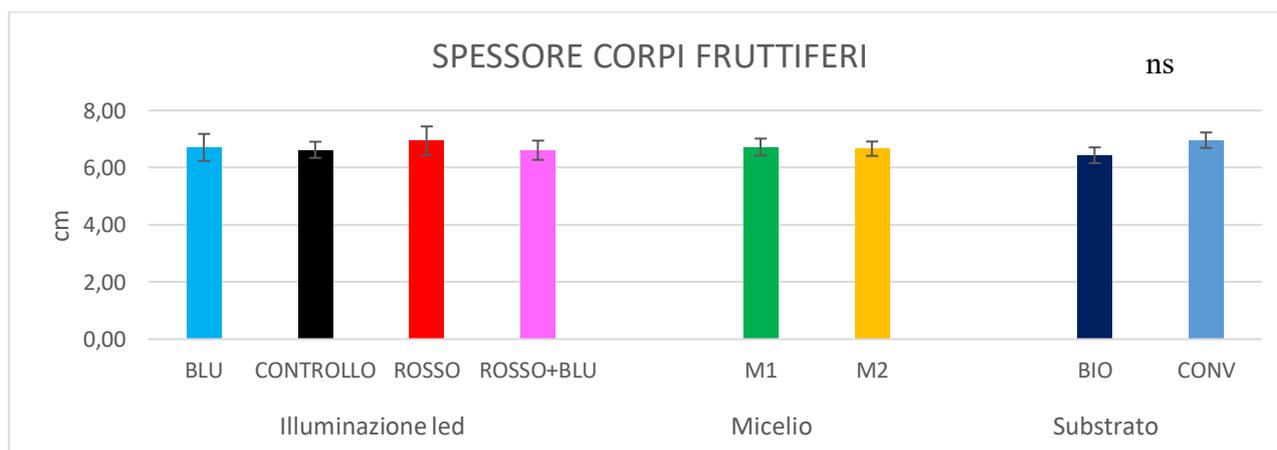


Figura 18: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sullo spessore dei corpi fruttiferi della prima volata del *P. ostreatus*. La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

4.1.7 Valori L*

In figura 19 sono riportati i valori L* ottenuti misurando la colorazione dei corpi fruttiferi, per quanto riguarda il trattamento luminoso questo valore è risultato statisticamente significativo: il valore di L* del controllo è risultato maggiore (pari a 61) rispetto al trattamento rosso + blu (con un valore di

54,13) determinando così una colorazione più chiara. I miceli e i substrati non hanno riportato differenze statisticamente significative, ottenendo un valore medio di 57,16.

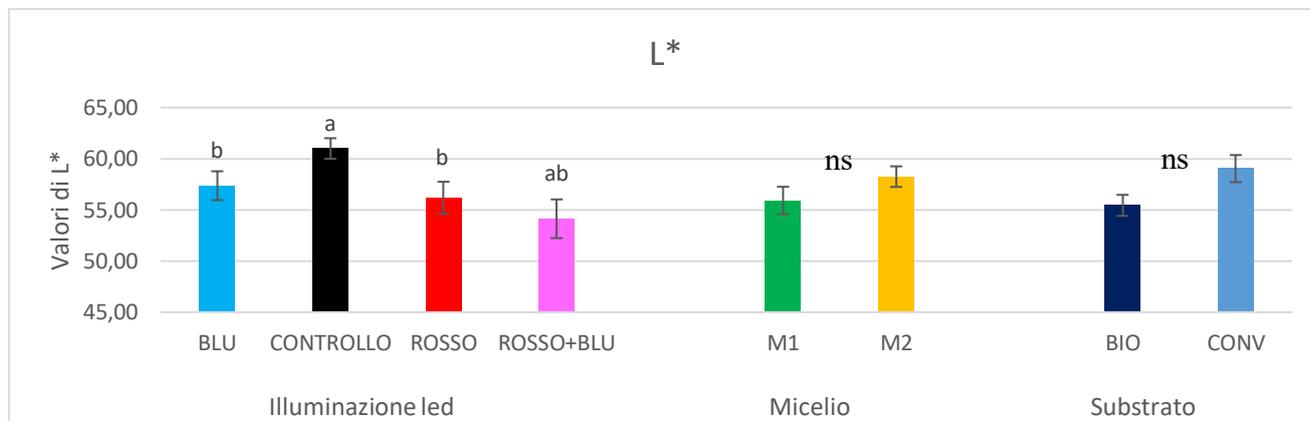


Figura 19: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sul valore L^* dei corpi fruttiferi della prima volata del *P. ostreatus* (p -value $<0,01$). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

4.1.8 Valori a^*

I valori a^* ottenuti da misurazioni sui corpi fruttiferi esposti al trattamento luminoso (Figura 20) hanno determinato che il valore a^* del trattamento rosso + blu risulti maggiore (valore di 4,06) rispetto al controllo (valore di 3,27), i trattamenti luminosi rosso e blu hanno ottenuto valori di a^* intermedi. Anche il substrato ha un effetto statisticamente differente in base alla sua gestione; infatti il substrato biologico ha riportato valori maggiori (pari a 4,13) rispetto al convenzionale (3,22). I diversi miceli invece hanno riportato parametri che non differiscono statisticamente.

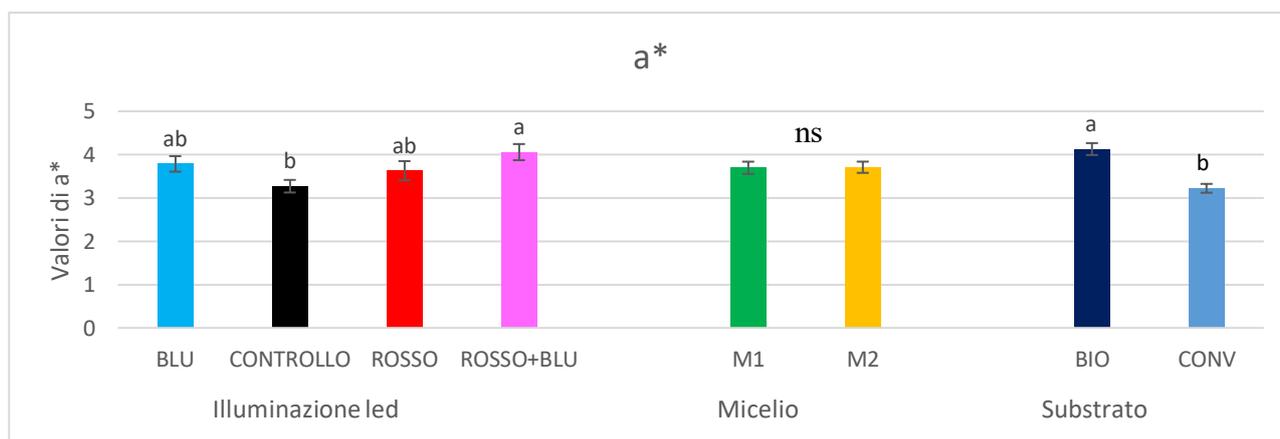


Figura 20: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sul valore a^* dei corpi fruttiferi della prima volata del *P. ostreatus* (p -value $<0,001$). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

4.1.9 Valori b^*

Nella figura 21 sono riportati valori b^* i quali sono statisticamente differenti in base al trattamento luminoso. Il controllo ha determinato valori maggiori di b^* (11,55) differendo quindi statisticamente

dal trattamento rosso + blu (10,63). Il substrato biologico si differenzia statisticamente dalla gestione convenzionale riportando il valore di 12,13 mentre i miceli non presentano difformità significative.

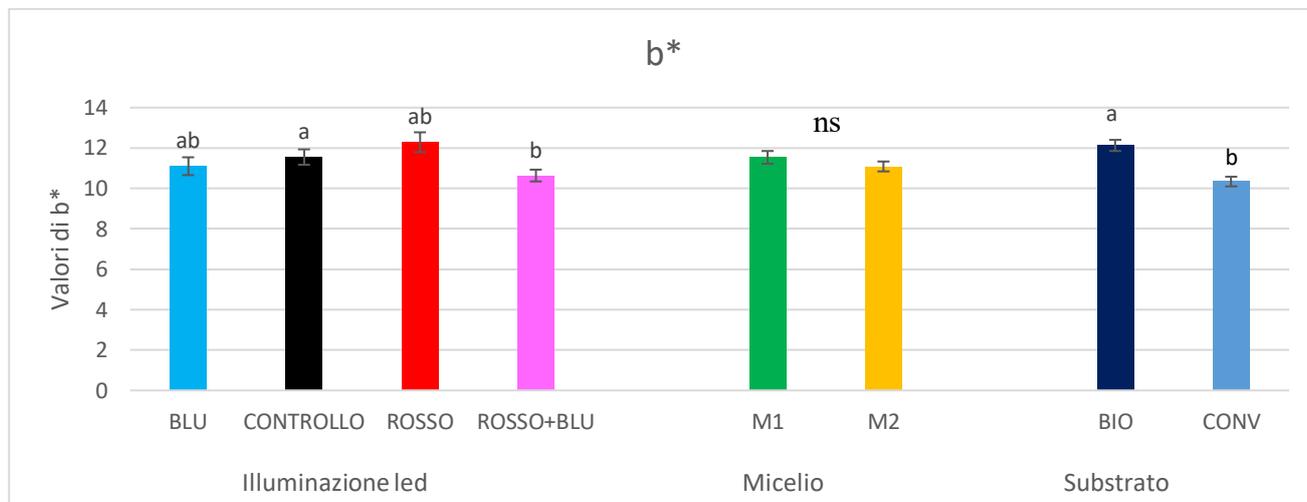


Figura 21: Effetto dei diversi trattamenti luminosi, miceli e substrati sul valore b* dei corpi fruttiferi della prima volata del *P. ostreatus* (p -value <0,05). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value <0,05).

4.2 Risultati qualitativi

4.2.1 Parametri qualitativi

I valori dei diversi parametri qualitativi, cioè solidi solubili, pH, conducibilità elettrica, percentuale di sostanza secca e acidità titolabile, sono statisticamente differenti tra i diversi trattamenti luminosi (Tabella 8), ma anche in base ai miceli e ai substrati utilizzati (Tabella 9). I valori riguardanti il contenuto di solidi solubili sono risultati statisticamente significativi e, come si può osservare nella tabella, i trattamenti luminosi con led rosso e rosso/blu hanno ottenuto valori di solidi solubili maggiori (4,9 °Brix) rispetto al trattamento blu (4,23 °Brix) in cui si è riscontrato un contenuto zuccherino più basso. Anche l'inoculo del micelio M2 (4,77 °Brix) e il substrato con gestione biologica (4,675 °Brix) hanno determinato un contenuto di solidi solubili maggiori rispetto al micelio M1 (4,32 °Brix) e il substrato convenzionale (4,42 °Brix). I valori di pH sono risultati statisticamente differenti, e di conseguenza sono maggiori, utilizzando anche in questo caso i led rossi e rossi/blu e il substrato biologico ma con l'inoculazione del micelio M1 (6,62). La conducibilità elettrica è risultata statisticamente differente sfruttando i led rossi (4,76 mS/cm), il micelio M1 (3,99 mS/cm) e il substrato a gestione biologica (4,24 mS/cm), determinando quindi dei risultati maggiori rispetto al trattamento del controllo (2,62 mS/cm), il micelio M2 (3,82 mS/cm) e il substrato convenzionale (3,57 mS/cm). La sostanza secca è risultata statisticamente differente durante la coltivazione con luce naturale (7,89%) e in sacchi di substrato a gestione convenzionale (7,71%) con inoculato il micelio M2 (7,46%). I valori ottenuti quindi sono maggiori rispetto al trattamento con led blu (7,01%), e

l'utilizzo di substrato biologico (7,26%) con il micelio M1 (7,44%) in cui la percentuale di sostanza secca è minore. Infine anche l'acidità titolabile ha valori statisticamente differenti se i sacchi vengono esposti alla luce naturale (0,063) o ai led rosso/blu (0,067) in cui all'interno ci sia il micelio M2 (0,0056) inoculato nel substrato a gestione convenzionale (0,057). I valori quindi si discostano da quelli ottenuti nei sacchi con substrato biologico (0,056), con all'interno il micelio M1 (0,056) ed esposto ad un trattamento luminoso con led rossi (0,049) o con led blu (0,047) in cui l'acidità titolabile ha dei risultati inferiori.

Tabella 8: Effetto dei diversi trattamenti luminosi sui valori dei parametri qualitativi tenendo conto dell'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value <0,05).

| illuminazione | ° Brix | Ph | EC (mS/cm) | ss% | Acidità titolabile |
|--------------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------------|--------------------|
| Controllo | 4,25 ± 0,27 ab | 6,2575 ± 0,08 b | 2,62 ± 0,04 b | 7,891003244 ± 0,32 a | 0,06312 ± 0,003 a |
| Blu | 4,125 ± 0,22 b | 6,5325 ± 0,03 ab | 3,81 ± 0,10 ab | 7,008811644 ± 0,19 b | 0,046656 ± 0,002 b |
| Rosso | 4,9 ± 0,23 a | 6,8125 ± 0,07 a | 4,7575 ± 0,37 a | 7,301576776 ± 0,24 ab | 0,049216 ± 0,005 b |
| Rosso + Blu | 4,9 ± 0,26 a | 6,7825 ± 0,08 a | 4,43 ± 0,46 ab | 7,575094651 ± 1,29 ab | 0,066688 ± 0,004 a |

Tabella 9: Effetto dei diversi trattamenti miceli e substrati sui valori dei parametri qualitativi tenendo conto dell'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value <0,05).

| Miceli e substrati | ° Brix | pH | EC (mS/cm) | ss% | Acidità titolabile |
|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------|--------------------|
| M1 | 4,3125 ± 0,13 b | 6,62 ± 0,06 a | 3,98625 ± 0,19 a | 7,441457649 ± 0,16 b | 0,056192 ± 0,002 b |
| M2 | 4,775 ± 0,11 a | 6,5725 ± 0,03 b | 3,8225 ± 0,16 b | 7,464270618 ± 0,11 a | 0,056648 ± 0,002 a |
| Bio | 4,675 ± 0,13 a | 6,66 ± 0,04 a | 4,2375 ± 0,20 a | 7,22507002 ± 0,12 b | 0,055888 ± 0,003 b |
| Conv | 4,4125 ± 0,11 b | 6,5325 ± 0,05 b | 3,57125 ± 0,14 b | 7,714829761 ± 0,14 a | 0,056952 ± 0,001 a |

4.2.2 Antiossidanti e fenoli totali

I risultati ottenuti dall'analisi della presenza di antiossidanti non sono risultati statisticamente significativi in base ai diversi trattamenti luminosi (Fig. 22); quindi si assume che il valore medio sia pari a 35,827 g Fe²⁺eq*kg⁻¹ ps. Nella figura 23 invece viene riportato che il micelio M2 (42,086 g Fe²⁺eq*kg⁻¹ ps) si differenzia statisticamente dal micelio M1 (29,568 g Fe²⁺eq*kg⁻¹ ps) come anche il substrato a gestione convenzionale che ha ottenuto un valore maggiore (40,399 g Fe²⁺eq*kg⁻¹ ps) rispetto a quello a gestione biologica (29,949 g Fe²⁺eq*kg⁻¹ ps).

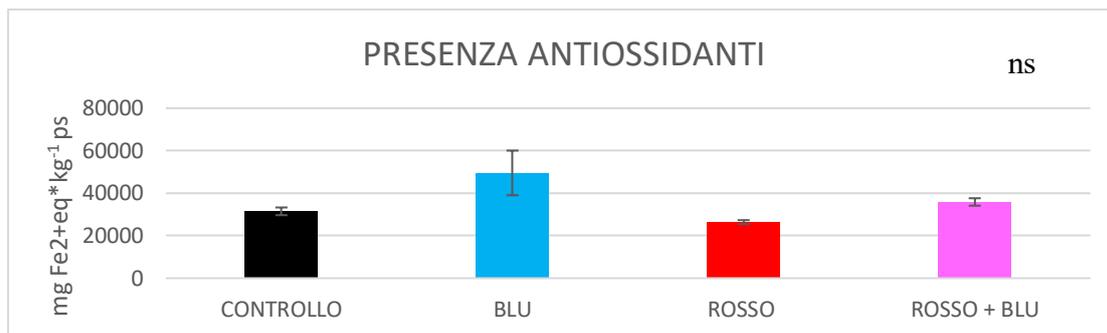


Figura 22: Effetto dei trattamenti luminosi sulla presenza degli antiossidanti (FRAP). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

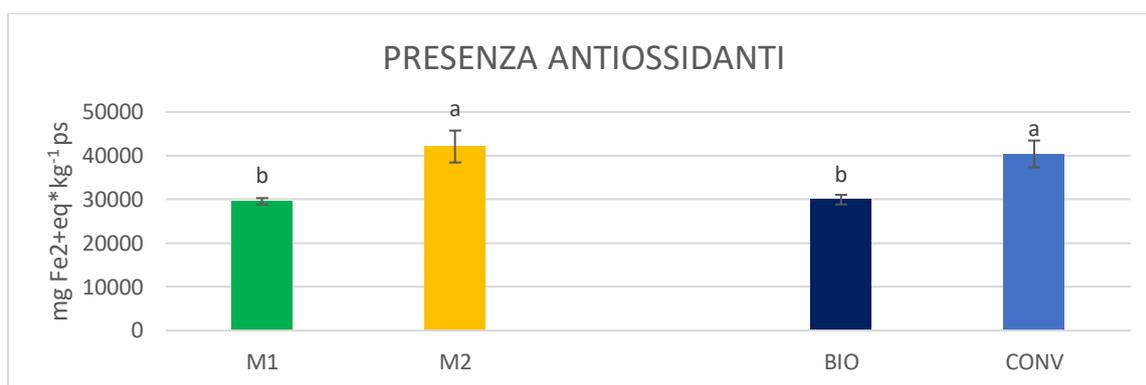


Figura 23: Effetto dei diversi miceli e substrati sulla presenza degli antiossidanti (FRAP). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

Nella figura 24 sono stati riportati i valori relativi alla presenza dei polifenoli totali in base ai diversi trattamenti luminosi. I risultati ottenuti non si differenziano statisticamente tra di loro perciò si assume che il valore medio sia pari a $1805 \text{ mg GAE kg}^{-1} \text{ ps}$. Anche i diversi miceli e substrati utilizzati (Fig. 25) non determinano delle differenze staticamente significative; i valori medi ottenuti sono quindi pari a $1803 \text{ mg GAE kg}^{-1} \text{ ps}$.

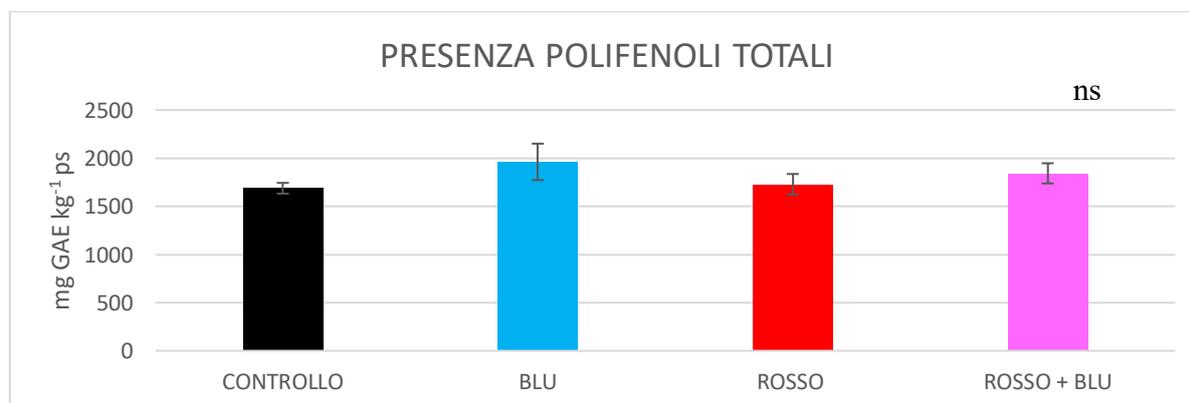


Figura 24: Effetto dei trattamenti luminosi sulla presenza dei polifenoli totali (FOLIN). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $<0,05$).

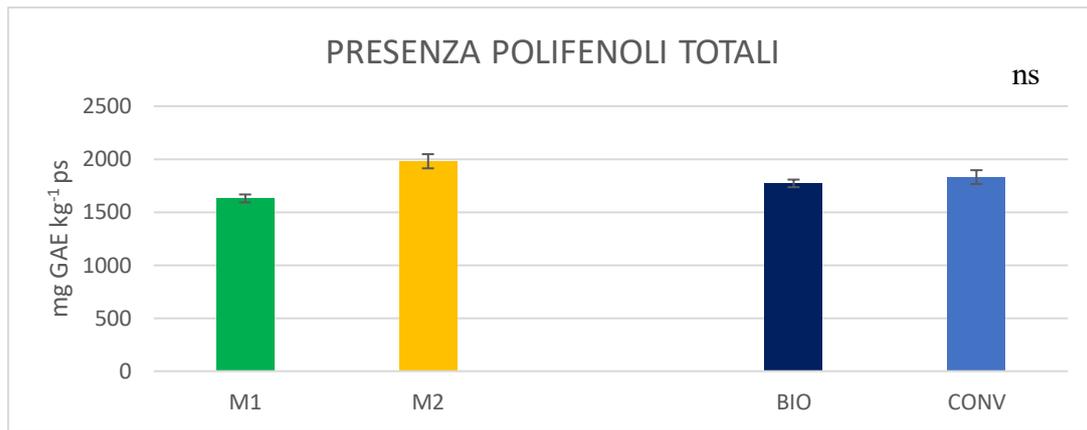


Figura 25: Effetto dei diversi miceli e substrati sulla presenza dei polifenoli totali (FOLIN). La barra di errore rappresenta l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le medie (p -value $< 0,05$)

5. Discussione

5.1 Analisi produttive

Il picco di emergenza dei primordi dal substrato di crescita è avvenuta dopo 26 GDI per entrambi i miceli. Questi valori si riscontrano anche nello studio di Raman et al. (2021) in cui la massima comparsa dei primordi è avvenuta al 25 GDI mentre si discosta dallo studio di Muswati et al. (2021) dove i primordi si sono sviluppati a 31-35 GDI. Questi valori sono stati ottenuti per l'utilizzo di substrati con diverse percentuali di materiali organici e per il mantenimento dei sacchi a temperature tra i 14 e i 18°C, inferiori rispetto a quelle misurate nella presente prova. La comparsa dei primordi nei sacchi esposti ai diversi trattamenti luminosi invece non conferma la tesi affrontata da Jo et al. (2011) poiché la crescita è iniziata a 24 GDI e non si è differenziato l'impatto del trattamento rosso + blu rispetto alle altre lunghezze d'onda. Questo può essere riconducibile a diverse condizioni ambientali, la tipologia di substrato e la copertura di plastica del sacco, ma anche alla tecnica di coltivazione in fungaie.

Per quanto riguarda la capacità produttiva in funzione del trattamento luminoso, i dati ottenuti si discostano dallo studio di Siwulskiet al. (2012) in cui l'illuminazione ha determinato un impatto significativo sulla resa. Questa differenza può essere riconducibile all'inoculazione di ceppi diversi di *P. ostreatus*, come il PX e il K22, e all'utilizzo di paglia di grano come substrato di coltivazione. I substrati hanno sviluppato una resa totale che si discosta dallo studio di Muswati et al. (2021) in cui la resa più alta ottenuta è di 1,29 kg su 2 kg di supporto utilizzato, determinata dall'utilizzo di un substrato di fibra di cotone.

L'effetto sul numero delle famiglie dei diversi trattamenti luminosi, i substrati e i miceli non è presente in letteratura perciò, con i valori misurati da questa sperimentazione, si può dimostrare che i diversi ceppi di *P. ostreatus*, la gestione biologica e convenzionale del substrato e le differenti radiazioni luminose non hanno un effetto significativo su questo parametro. Questo può essere determinato dalle diverse capacità dei miceli di mantenere la stessa produzione di famiglie durante il ciclo di produzione, ma anche dalle condizioni climatiche e luminose che, non essendo costanti e distribuite in maniera omogenea nei cubi sperimentali, hanno influenzato la produttività.

In bibliografia invece esistono articoli che riportano gli effetti di differenti tipologie di coltivazione sul numero dei corpi fruttiferi. Infatti secondo Hoa et al. (2015), la diversa tipologia di substrato ha un effetto sul numero medio di corpi fruttiferi per famiglia, nel nostro studio la tipologia di substrato era il medesimo e la diversa gestione di questo materiale non è risultata avere un effetto sul numero di corpi fruttiferi. In bibliografia non sono presenti articoli che studino l'andamento del numero di corpi fruttiferi in base ai diversi trattamenti luminosi. Analizzando quindi i dati ottenuti da questa

prova sperimentale si può affermare che il trattamento con led rossi influenzi in modo positivo la produzione di corpi fruttiferi per famiglia. La minor produzione è stata ottenuta dal trattamento del controllo in cui le famiglie possedevano in media 11 corpi fruttiferi per famiglia. Il minor quantitativo di corpi fruttiferi per famiglia non è un risultato sfavorevole. Infatti il minor numero di basidiocarpi può portare al maggiore sviluppo delle caratteristiche morfologiche come la dimensione e lo spessore del pileo.

È noto che la larghezza dei corpi fruttiferi dipenda anche dall'intensità e dalla durata della luce (Siwulski et al. 2012) poiché la radiazione luminosa innesca vari processi biofisici e biochimici che portano allo sviluppo di reazioni morfologiche e fototrofiche. I risultati del presente studio sono in accordo con l'articolo appena citato poiché si è notato che il trattamento luminoso con led blu ha determinato una larghezza media dei pilei di 9,35 cm. A differenza dello studio condotto da Muswati et al. (2021), la larghezza dei corpi fruttiferi non è influenzata dalla diversa tipologia di substrato e di micelio. Questo probabilmente è determinato dal fatto che il substrato più produttivo era costituito dal 100% di fibra di cotone e dall'utilizzo del ceppo Grey HK35.

Siwulski et al. (2012) nel loro articolo, hanno inoltre dimostrato come l'esposizione della luce influenzi lo spessore dei basidiocarpi. Questo risultato però si discosta dalla presente prova poiché non è stata registrata questa differenza statisticamente significativa. La discrepanza tra i dati può essere causata dall'utilizzo di lampade con diverse lunghezze d'onda e dalle diverse condizioni ambientali, dato che la crescita del micelio è avvenuta al buio. L'effetto dei miceli e dei substrati sullo spessore dei corpi fruttiferi non è stato ancora studiato ma, analizzando i dati ottenuti durante il progetto, si afferma che non determinano differenze statisticamente significative.

Nell'articolo di Zawadzka et al. (2022) è stato riportato che la luce è un fattore determinante per la resa e le caratteristiche morfologiche del *P. ostreatus*. Marino et al. (2003) hanno riportato che il valore L^* varia in funzione alla tipologia di substrato e al micelio ma questo non è stato confermato nella presente prova probabilmente anche per la diversa composizione del substrato impegnato dagli autori (segatura, bagassa di canna da zucchero, crusca di frumento e di riso).

Il valore a^* è variato in base al trattamento luminoso e alla gestione del substrato. Dalle misurazioni effettuate il valore più alto è stato ottenuto nel trattamento con led rosso /blu (4,06) e nei sacchi con substrato biologico (4,13). In base ai valori raccolti di b^* è stata dimostrata un'influenza significativa sia in base alla tipologia di substrato che dalle diverse radiazioni luminose. Infatti il valore più elevato è stato misurato nel substrato biologico (12,13) e nel trattamento di controllo (11,55) rispetto al substrato convenzionale (10,34) e del trattamento con led rosso/blu (10,63).

5.2 Analisi qualitative

I valori di pH ottenuti in questo studio (da 6,25 a 6,81) sono comparabili con i risultati presenti nell'articolo di Hoa et al. (2015) che variano da 6,7 a 6,93. Non sono ancora stati studiati gli effetti dei trattamenti luminosi sul valore del pH, ma con i risultati ottenuti in questa tesi si può definire che i led rossi e rossi/blu hanno aumentato il pH del corpo fruttifero (6,78 per i led rossi/blu e 6,81 per i led rossi) rispetto alla luce naturale (6,25).

La conducibilità elettrica osservata in questa prova sperimentale ha ottenuto valori compresi tra 3,57 e 4,23 mS/cm e sono risultati simili a quelli rilevati da Hoa et al. (2015) poiché variabili tra 2,88 e 4,20 mS/cm. Secondo i dati presenti in questa prova sperimentale, dato che non sono presenti risultati in bibliografia, il trattamento luminoso con i led rossi ha ottenuto un risultato maggiore e quindi una differenza statisticamente significativa (4,76 mS/cm) rispetto ai sacchi esposti alla luce naturale (2,62 mS/cm).

Per quanto riguarda i solidi solubili i valori ottenuti sono compresi tra 4,31 e 4,77 °Brix, determinando una differenza con l'articolo di Villaescusa e Gil (2003) in cui il valore riscontrato era pari a 5,1 °Brix. Tale differenza può essere imputata per l'inoculo del ceppo K-15 e per le condizioni climatiche presenti nella zona di coltivazione, poiché situata a La Rioja in Spagna. Anche nel caso dei solidi solubili non sono stati studiati gli effetti dei trattamenti luminosi sulla loro quantità, ma in questo studio sperimentale è stato dimostrato che i led rossi e rossi/blu (4,9 °Brix) hanno comportato dei valori maggiori e perciò una differenza statisticamente significativa rispetto al trattamento con i led blu (4,13 °Brix).

I dati raccolti in questa tesi sperimentale sull'acidità titolabile si attestano a valori pari a 0,04-0,06 g/L affermando i risultati ottenuti da Villaescusa e Gil (2003) che sono pari a 0,08-0,10 g/L.

Tra le analisi qualitative viene anche calcolata la presenza di antiossidanti, componenti che difendono il nostro organismo dai prodotti del metabolismo cellulare, i radicali liberi (Mihai et al. 2022). È stato dimostrato che alcune tipologie di funghi, tra cui il *P. ostreatus*, contengono elevate quantità di antiossidanti rispetto alla frutta e verdura presenti nel mercato ortofrutticolo (Mihai et al. 2022). La quantità di antiossidanti calcolata in questa tesi non è statisticamente significativa come è stato determinato anche in alcuni articoli presenti in letteratura (Mihai et al. 2022). I miceli e i substrati differenti non hanno avuto effetto sulla produzione di antiossidanti, quindi i diversi trattamenti non hanno determinato differenze significative. In letteratura non sono presenti articoli che studino come i diversi trattamenti luminosi influenzino la presenza di antiossidanti ma, valutando i risultati ottenuti in questa tesi sperimentale, si può stabilire che le diverse lunghezze d'onda non hanno un effetto sul contenuto di queste molecole. Nel *P. ostreatus*, tra gli antiossidanti presenti, si possono trovare tannini, flavonoidi totali e polifenoli totali e il loro contenuto dipende da alcuni fattori come quelli

genetici ed ambientali, il ceppo dei funghi e le tecniche di coltivazione (Yıldız et al. 2017). In questa prova sperimentale è risultato che sia i trattamenti luminosi che le differenti tipologie di miceli e substrati non hanno determinato differenze statisticamente significative e questo afferma che non vanno ad influenzare la quantità di fenoli totali. In alcuni articoli scientifici (Fontes Vieira et al. 2013) invece sono state riscontrate delle differenze nel contenuto di fenoli totali; questo è determinato dal fatto che nell'articolo vengono utilizzati dei substrati arricchiti con zinco o ferro in cui è stato inoculato il ceppo Plo 02.

Il *P. ostreatus* è un fungo decompositore primario e per poter degradare i componenti presenti nel substrato deve formare un biofilm (Válková et al. 2017). All'interno del substrato però possono essere presenti microrganismi che determinano un'interazione ma soprattutto una competizione con il micelio vegetativo del fungo che perciò si trova in condizioni di stress (Válková et al. 2017). Tali condizioni non solo possono influenzare la crescita dei primordi e quindi anche lo sviluppo dei basidiocarpi, ma anche la quantità dei composti antiossidanti, riducendo così la loro azione nel contrastare i radicali liberi e quindi proteggere la salute degli organismi umani che consumano i corpi fruttiferi (Valenzuela-Cobos et al. 2019).

L'utilizzo dell'illuminazione led durante il ciclo produttivo, come è stato dimostrato nel precedente progetto YESP, ha determinato anche l'aumento della quantità di vitamina D₂ nei basidiocarpi. Ci si aspetta dunque che anche nella presente prova sperimentale il contenuto di ergosterolo aumenti se i sacchi di substrato vengono irraggiati con led blu e rosso/blu (85-90 µg/kg) rispetto agli altri trattamenti luminosi. In bibliografia sono presenti degli articoli scientifici (Keflie et al. 2019; Wittig et al. 2013) i quali stabiliscono che, una volta assorbita l'energia luminosa compresa tra i 290 e i 320 nm, viene provocata l'isomerizzazione dell'ergosterolo e la scissione del legame tra il carbonio 9 e 10 determinando la "pre-vitamina D₂". Tale pre-vitamina poi, grazie a un processo di catalizzazione viene convertito in vitamina D₂.

6. Conclusioni

In questa prova sperimentale sono stati valutati gli effetti sulle caratteristiche quantitative e qualitative di due miceli differenti di *P. ostreatus* coltivati su due tipologie substrati (gestione biologica e convenzionale) illuminati da tre led con diverse lunghezze d'onda. L'utilizzo dell'illuminazione con led rossi/blu durante il ciclo produttivo ha determinato una maggior produzione di primordi e, valutando le analisi qualitative, è stato dimostrato che i corpi fruttiferi provenienti dai sacchi esposti a tale luce presentano valori maggiori di a^* , di grado Brix, di pH, di acidità titolabile e di vitamina D₂. La sola luce rossa invece ha permesso di ottenere un maggior numero di corpi fruttiferi per famiglia i quali presentano valori alti di solidi solubili, di pH e conducibilità elettrica rispetto agli altri basidiocarpi provenienti dagli altri trattamenti luminosi. La luce blu non ha implicato un numero elevato di risultati differenti dagli altri trattamenti luminosi; infatti ha influito positivamente soltanto sulla larghezza media dei basidiocarpi e sull'aumento di vitamina D₂. Per quanto riguarda la diversa gestione dei substrati è stato dimostrato che la gestione convenzionale determina una maggior comparsa dei primordi e dal punto di vista qualitativo una maggior percentuale di sostanza secca, di acidità titolabile e di antiossidanti presenti. La gestione biologica invece ha influito sui caratteri qualitativi; infatti si riscontrano risultati maggiori per i valori di a^* e b^* , del grado Brix, del pH e della conducibilità elettrica. Diversi miceli hanno determinato delle differenze sui valori dei parametri qualitativi. Il micelio M1 ha influito sul quantitativo del pH e della conducibilità elettrica mentre il micelio M2 sui valori del grado Brix, della percentuale di sostanza secca, di acidità titolabile e della quantità di antiossidanti presenti. Visto l'importante effetto dell'illuminazione luminosa sui principali caratteri qualitativi e produttivi del *P. ostreatus*, si vedono necessari ulteriori sperimentazioni al fine di approfondire la conoscenza di tale effetto su altri miceli.

Bibliografia

- Bellettini, Marcelo Barba et al. 2019. "Factors Affecting Mushroom *Pleurotus* Spp." *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(4): 633–46.
- Cardwell, Glenn, Janet F. Bornman, Anthony P. James, Lucinda J. Black. 2018. "A Review of Mushrooms as a Potential Source of Dietary Vitamin D." *Nutrients* 10(10).
- Josiane, M., Estelle, M., & Francis, N. (2018). Effect of substrates on nutritional composition and functional properties of *Pleurotus ostreatus*. *Current Research in Agricultural Sciences* 5(1): 15–22.
- Fontes Vieira, Patrícia A. et al. 2013. "Antioxidant Activities, Total Phenolics and Metal Contents in *Pleurotus Ostreatus* Mushrooms Enriched with Iron, Zinc or Lithium." *LWT - Food Science and Technology* 54(2): 421–25.
- Golian, Marcel, Alena Andrejiová, Ivana Mezeyová, Alžbeta Hegedúsová. 2015. "Design of Oyster (*Pleurotus Ostreatus*) Production Unit Taking into Account Its Agrotechnic of Growign and Quality and Quantity of Its Production." *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 4(Special issue 3): 48–51.
- González, Abigail et al. 2020. "Edible Mushrooms as a Novel Protein Source for Functional Foods." *Food and Function* 11(9): 7400–7414.
- González, Nobre et al. 2021. "Evaluation of Functional and Nutritional Potential of a Protein Concentrate from *Pleurotus Ostreatus* Mushroom." *Food Chemistry* 346.
- Hirschi, Kendal D. 2009. "Nutrient Biofortification of Food Crops." *Annual Review of Nutrition* 29: 401–21.
- Hoa, Ha Thi, Chun Li Wang, Chong Ho Wang. 2015. "The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus Ostreatus* and *Pleurotus Cystidiosus*)." *Mycobiology* 43(4): 423–34.
- Jo, Woo-Sik et al. 2011. *Effect of LED Lights on Pleurotus Ostreatus and Pleurotus Eryngii Commercialization of Export Container Type Mushroom Plant Factory System Development Etc. View Project Bioactive Compounds of Juice View Project.* <https://www.researchgate.net/publication/275025051>.

- Keflie, Tibebe Selassie Seyoum et al. 2019. "Impact of the Natural Resource of UVB on the Content of Vitamin D2 in Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) under Subtropical Settings." *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(7): 1724–30.
- Deepalakshmi, K., & Sankaran, M. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), 718-726.
- Kuè, U, Y Liu. 2000. *MINI-REVIEW Fruiting Body Production in Basidiomycetes*. <http://apps.fao.org/>.
- Maffi, Gian Pietro. 2007. *Parassiti Dei Funghi Coltivati*. ed. Arsenale Editore.
- Majesty, Duru K C, Kalu Winner, Odika Prince, Duru Majesty. 2018. *Environmental/ Wastewater View Project Food Biochemistry Project View Project Cronicon EC NUTRITION Research Article Nutritional, Anti-Nutritional and Biochemical Studies on the Oyster Mushroom, Pleurotus Ostreatus*. <https://www.researchgate.net/publication/333220567>.
- Marino, R. H., Eira, A. F. D., Kuramae, E. E., & Queiroz, E. C. (2003). Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) kummer strains in relation to luminosity and temperature of frutification. *Scientia Agricola*, 60, 531-535.
- Nwoko, M. C., Onyeizu, U. R., & Achufusi, J. N. (2017). Productivity, vitamins and heavy metals analysis of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: fr) kumm. Fruit bodies cultivated on wood logs. *J Environ Anal Toxicol*, 7(446), 2161-0525.
- Melanouri, Eirini Maria, Marianna Dedousi, Panagiota Diamantopoulou. 2022. "Cultivating *Pleurotus Ostreatus* and *Pleurotus Eryngii* Mushroom Strains on Agro-Industrial Residues in Solid-State Fermentation. Part I: Screening for Growth, Endoglucanase, Laccase and Biomass Production in the Colonization Phase." *Carbon Resources Conversion* 5(1): 61–70.
- Mihai, Raluca A., Erly J. Melo Heras, Larisa I. Florescu, Rodica D. Catana. 2022. "The Edible Gray Oyster Fungi *Pleurotus Ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm a Potent Waste Consumer, a Biofriendly Species with Antioxidant Activity Depending on the Growth Substrate." *Journal of Fungi* 8(3).
- Muswati, Charles et al. 2021. "The Effects of Different Substrate Combinations on Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*)." *International Journal of Agronomy* 2021.

- Okal, Eyalira J., Mehtab Muhammad Aslam, Joseph K. Karanja, Witness J. Nyimbo. 2020. "Mini Review: Advances in Understanding Regulation of Cellulase Enzyme in White-Rot Basidiomycetes." *Microbial Pathogenesis* 147.
- Raman, Jegadeesh et al. 2021. "Cultivation and Nutritional Value of Prominent Pleurotus Spp.: An Overview." *Mycobiology* 49(1): 1–14.
- Regione del Veneto. 2021. *Disciplinare Di Produzione Integrata*.
- Sánchez, Carmen. 2010. "Cultivation of Pleurotus Ostreatus and Other Edible Mushrooms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1321–37.
- Siwulski, Marek, Mirosława Ziombra, Krzysztof Sobieralski. 2012. *Impact of Light on Yielding of Some Pleurotus Sp. Strains*.
- Sławińska, Aneta et al. 2016. "Study on Vitamin D2 Stability in Dried Mushrooms during Drying and Storage." *Food Chemistry* 199: 203–9.
- Taofiq, Oludemi et al. 2017. "UV-Irradiated Mushrooms as a Source of Vitamin D2: A Review." *Trends in Food Science and Technology* 70: 82–94.
- Valenzuela-Cobos, Juan Diego et al. 2019. "Chemical Composition and Biological Properties of Pleurotus Spp. Cultivated on Peat Moss and Wheat Straw." *Emirates Journal of Food and Agriculture* 31(11): 830–36.
- Válková, Hana et al. 2017. "Effect of Bacteria on the Degradation Ability of Pleurotus Ostreatus." *Science of the Total Environment* 584–585: 1114–20.
- Villaescusa, R, M I Gil. 2003. *Quality Improvement of Pleurotus Mushrooms by Modified Atmosphere Packaging and Moisture Absorbers*. www.elsevier.com/locate/postharvbio.
- Wan Mahari, Wan Adibah et al. 2020. "A Review on Valorization of Oyster Mushroom and Waste Generated in the Mushroom Cultivation Industry." *Journal of Hazardous Materials* 400.
- Wang, Huan et al. 2020. "Transcriptomic Profiling Sheds Light on the Blue-Light and Red-Light Response of Oyster Mushroom (Pleurotus Ostreatus)." *AMB Express* 10(1).
- Wittig, Maximilian, Ulrich Krings, Ralf G. Berger. 2013. "Single-Run Analysis of Vitamin D Photoproducts in Oyster Mushroom (Pleurotus Ostreatus) after UV-B Treatment." *Journal of Food Composition and Analysis* 31(2): 266–74.

- Wu, Wei Jie, Byung Yong Ahn. 2014. “Statistical Optimization of Ultraviolet Irradiate Conditions for Vitamin D2 Synthesis in Oyster Mushrooms (*Pleurotus Ostreatus*) Using Response Surface Methodology.” *PLoS ONE* 9(4).
- Yin, Chaomin et al. 2020. “Identification and Characterization of a Novel Light-Induced Promoter for Recombinant Protein Production in *Pleurotus Ostreatus*.” *Journal of Microbiology* 58(1): 39–45.
- Yıldız, Sibel et al. 2017. “Total Phenolic, Flavonoid, Tannin Contents And Antioxidant Properties Of *Pleurotus Ostreatus* And *Pleurotus Citrinopileatus* Cultivated On Various Sawdust.” *GIDA / THE JOURNAL OF FOOD* 42(3): 315–23.
- Zawadzka, Agnieszka et al. 2022a. “The Effect of Light Conditions on the Content of Selected Active Ingredients in Anatomical Parts of the Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus* L.)” *PLoS ONE* 17(1 January).

Sitografia

<https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/006010>

Ringraziamenti

Un ringraziamento va al professor Carlo Nicoletto per avermi dato la possibilità di realizzare questa tesi, a Silvia Locatelli, Emanuela Trevisan e a tutto il gruppo di orticoltura per la loro accoglienza e i loro insegnamenti, ma soprattutto un grande ringraziamento va a Marina De Bonis per il suo aiuto durante tutti questi mesi.

Inoltre ci tengo a ringraziare la mia famiglia per avermi permesso di raggiungere quest'obiettivo, gli amici che ho potuto conoscere in questi tre anni di università e le mie amiche Chiara e Valentina.