# BIOPROCESS DEVELOPMENT FOR THE LARGE-SCALE PRODUCTION OF VITAMIN D ENRICHED MUSHROOM MYCELIA

**UMESH SINGH**

**CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY**

**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

**DECEMBER 2023**

# BIOPROCESS DEVELOPMENT FOR THE LARGE-SCALE PRODUCTION OF VITAMIN D ENRICHED MUSHROOM MYCELIA

*by*

**UMESH SINGH**

**Centre for Rural Development and Technology**

***Submitted***
**in fulfillment of the requirements of the degree of philosophy**
***to the***


**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

**DECEMBER 2023**

*DEDICATED TO MY FAMILY*

# CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled **"Bioprocess development for the large scale production of vitamin D enriched mushroom mycelia"** being submitted by **Mr. Umesh Singh** to the **Indian Institute of Technology Delhi** for the award of **"Doctor of Philosophy"** is a record of bonafide research carried by him. He has worked under my supervision and guidance and has fulfilled the requirements for the submission of the thesis. To the best of my knowledge, the results presented in this thesis have not been submitted in part or full to any other institute or university for the award of any degree or diploma.

***(Dr. Satyawati Sharma)***

**Professor**

Centre for Rural Development and Technology
Indian Institute of Technology,
New Delhi, Hauz Khas
New Delhi-110016, India

## *Acknowledgements*

It takes me immense pleasure to finally arrive at the moment where I can submit my Ph.D. thesis. Writing each word of this thesis has been fascinating and extremely rewarding. While I look back at the start of my journey, I would like to thank those who have contributed to the final result in many different ways:

To commence with, I take a special moment to thank all my family members who were there with me all the times, thick and thin, motivating and inspiring me to never give up. Also, there are a number of people whom I would like to thank for their love, support and efforts.

First of all, I would like to express my sincere and deepest gratitude to my supervisor Prof. Satyawati Sharma for her love, motivation, support and motherly affection. Her immense knowledge, positive criticism, constant encouragement and faith in me helped me sail through my bad times and successfully finish my research work. Her continual inspiration and sweet words of wisdom will always be cherished throughout my life.

I would also like to thank other faculty members: Prof. V.K. Vijay, Prof. Vivek Kumar, and Prof. J.K. Sahu for their guidance, positive support and facilities for my research work.Support from all the staff members at all times is duly acknowledged. I am especially grateful to Prof. Vikram Sahai, for his genuine guidance, and facilities to help me improve the quality of my work.

I sincerely admire the contribution of all my seniors and other project members: Dr. Ashwani Gautam, Dr. Shalinee, Dr. Monika Jangir, Dr. Ritika Pathak, Dr. Monica Verma, Dr. Pratibha Yadav, Dr. Kanika Tokas and Mr. Ram Kumar for their help and encouragement throughout my research work.

I would like to extend my heartfelt thanks to my friends who made this journey a memorable one. Their constant support and encouragement always motivated me to keep movingthroughout my research work. Friends who stood with me all the times, made my tough times lighter and dark times brighter: Dr. Garima Singh, Dr. Sonal Yadav, Ms. Pooja Tiwari, Raju Kumar, Aamir, Abhay Tiwari, Mandira Kapri, Himanshu Arora, Akansha Gupta and also many more whom I have not mentioned here personally including all my roommates from hostel life.

Last, but not the least, words prove a meager media to express my emotional love towards my family. The strongest pillars of my life, my parents, who believed in me since I was born, motivated me to pursue my dreams and always pushed me forward. I admire them for their trust, patience and hope in me. No word of thanks will be enough to express the support I received from my Dad (Mr. Sarvdaman Singh), Mother (Mrs. Vidya Devi) and Wife (Rashmi). They geared me up time to time and always believed in me. I owe a special token of affection and love for my children Rudransh and Shubhra,who not only brightened up my days but also added joy in my life. My life, indeed, is indebted to my family members for their love, patience, support and sacrifices. I would never have been able to achieve such heights without their blessings.

(**Umesh Singh**)

## *Abstract*

Mushrooms are rich in various nutritious and biologically active compounds such as polysaccharides including β-glucans, peptides, proteins, terpenoids, fatty acid esters, organic acids, sterols, alkaloids, phenolic compounds and are responsible for antioxidative, anticancer, antiviral, anti-inflammatory, antihyperlipidemic, immunomodulating and hypocholesterolemic properties. These properties can modify the physiological and metabolic functions of the human body and also have pro-health effects. However, the cultivation of mushrooms is tedious, requires a specific substrate approach, labour-intensive and takes 2 to 3 months. Moreover, its growth is season dependent and if the temperature is not controlled in the interior of the mushroom unit, it could only be grown during specific months of the year and hence makes it unsuitable for the commercialization of mushroom fortified products. In this context, the production of mushroom mycelia through submerged culture technique can be used as an alternative solution to produce higher mycelial biomass of mushrooms at industrial scale in a shorter period (8-10 days) in a fermenter enriched with nutraceutical properties. Also, growing mushroom mycelium under submerged culture conditions ensures its availability throughout the year, which requires limited space and fewer chances of contamination. At the same time, there exist certain limitations in this process e.g. the need for rather sophisticated equipment, expensive infrastructure and highly skilled personnel. In this study, mass production of fungal mycelial biomass of *Pleurotus eryngii* and *Calocybe indica* with enhanced nutritional values through submerged cultivation technique was achieved using one factor at a time (OFAT) approach. Both the physical (Temperature, pH, and RPM) and chemical (carbon sources, nitrogen sources, and C/N ratio) parameters were studied in shake flasks levels and further the optimized parameters were used for mass production of mushroom mycelia in fermenters (15 L, 100 L, 350 L). The harvested mushroom mycelia were then exposed to UV-B irradiation for enhancement of vitamin D2. The highest biomass yield of *P. eryngii* in 15 L fermenter in batch mode

under optimized conditions of agitation 200 rpm, aeration rate 0.1 vvm, temperature 28 °C, pH 6.5 and inoculum size 4% was 13.44±0.82 g/l. The batch phase was extended to fed-batch phase to increase biomass yield and the final biomass was increased up to 22.68 ± 0.8 g/l. *P. eryngii* mycelial biomass was further produced in 100 L fermenter in which biomass yield obtained was 12.54 ± 0.81 g/l. The highest biomass yield of *C. indica* in 15 L fermenter in batch mode under optimized condition of agitation 150 rpm, aeration rate 0.1 vvm, temperature 28 °C, pH 6.5 and inoculum size 4% was 9.54 ± 0.35g/l. Further, *C. indica* mycelia was also produced in large scale fermenter 350 L and the final biomass yield was 9.34 ± 0.81 g/l. The ideal UV-B irradiation conditions were determined for vitamin D2 synthesis in harvested mycelia using RSM. The effects of three independent variables namely, temperature (20-40 ºC), ultraviolet-B intensity (0.6-1.2 W/m$^2$), and time of exposure (10-30 min) on vitamin D2 were investigated. Under optimal conditions of ambient temperature, 24.29 ºC, UV-B intensity, 1.099 W/m$^2$, and exposure time, 23.88 min, the vitamin D2 got increased to 329.43 µg/g dry wt. Similarly, for *C.indica* the vitamin D2 was improved to 247±3.28 µg/g dry wt. The freeze-dried *P. eryngii* mycelia contained protein 24.52±0.53%, crude fat 6.78±0.81%, crude fiber 18.54±0.57%, total ash 7.82±0.61%, and carbohydrate 55.36±1.24% and rich in various amino acids like glutamic acid (3.05%), arginine (2.28%), threonine (2.03%), glycine (2.01%), and alanine (1.74%). While, freeze-dried *C.indica* mycelia was found to have protein 28.21±0.31%, crude fat 5.78±0.55%, crude fiber 14.24±0.37%, total ash 6.72±0.22%, and carbohydrate 57.06±1.13%. *C.indica* mycelia showed higher content of glutamic acid (4.01%), alanine (2.77%), leucine (1.89%), lysine (1.74%), isoleucine (1.68%), aspartic acid (1.68%), glycine (1.49%), Threonine (1.33%) and valine (1.33%). The effect UVB irradiation on nutritional quality of produced mycelia was also studied and compared with their non UV-treated (control) mycelia. Ergosterol content in both the mycelia (*P. eryngii* & *C.indica*) got decreased significantly from 2.48 to 1.63 mg/g (*P. eryngii*) and from 2.11 to 1.46 mg/g (*C. indica*).

UV irradiation caused a significant ($p < 0.05$) improvement in mycelial beta glucans (%), i.e., from 26.18 to 32.21% (w/w) in *P. eryngii* and from 24.11 to 31.46 % (w/w) in *C. indica.* The antioxidant activity including FRAP, DPPH scavenging ability, TPC and TFC in UVB treated samples was also improved significantly ($p<0.05$) of both the mycelial extracts when compared with their control (non UVB treated) samples. Nutraceutically enriched mycelia were utilized for the preparation of two different types of food products namely instant noodles and meat analogues. The physico chemical properties, sensory evaluation and self-life studies were conducted for both the products. The noodle samples with 6% *P. eryngii* mycelia powder and with 15% *C. indica* mycelia powder were found acceptable. It was observed that mushroom mycelia fortified food products are well accepted by the rural consumers (both adults and children).

## सार

मशरूम विभिन्न पौष्टिक और जैविक रूप से सक्रिय यौगिकों जैसे बीटा ग्लूकेन्स, पेप्टाइड्स, प्रोटीन, टेरपेनोइड्स, फैटी एसिड एस्टर, कार्बनिक अम्ल, स्टेरोल्स, अल्कलॉइड्स, फेनोलिक यौगिकों से भरपूर होते हैं और एंटीऑक्सीडेंट, एंटीकैंसर, एंटीवायरल, एंटी-इंफ्लेमेटरी, एंटीहाइपरलिपिडेमिक, इम्यूनोमॉड्यूलेटिंग और हाइपोकोलेस्ट्रोलेमिक गुण के लिए जिम्मेदार होते हैं। ये गुण मानव शरीर के शारीरिक और चयापचय कार्यों को संशोधित कर सकते हैं और स्वास्थ्य-समर्थक प्रभाव भी डाल सकते हैं। हालाँकि, मशरूम की खेती कठिन है, इसके लिए एक विशिष्ट सब्सट्रेट दृष्टिकोण की आवश्यकता होती है, श्रम-गहन होता है और इसमें 2 से 3 महीने लगते हैं। इसके अलावा, इसकी वृद्धि मौसम पर निर्भर है और यदि तापमान को बाहरी रूप से नियंत्रित नहीं किया जाता है, तो इसे केवल वर्ष के विशिष्ट महीनों के दौरान ही उगाया जा सकता है और इसलिए यह मशरूम फोर्टिफाइड उत्पादों के व्यावसायीकरण के लिए अनुपयुक्त है। इस संदर्भ में, जलमग्न कल्चर तकनीक के माध्यम से मशरूम माइसेलिया का उत्पादन, मशरूम फलने के बराबर न्यूट्रास्युटिकल गुणों के साथ किण्वक में कम अवधि (8-10 दिन) में औद्योगिक पैमाने पर मशरूम के उच्च माइसेलियल बायोमास का उत्पादन करने के लिए एक वैकल्पिक समाधान के रूप में इस्तेमाल किया जा सकता है। इसके अलावा, जलमग्न संस्कृति परिस्थितियों में मशरूम माइसेलियम उगाने से पूरे वर्ष इसकी उपलब्धता सुनिश्चित होती है, जिसके लिए सीमित स्थान की आवश्यकता होती है और संदूषण की संभावना कम होती है। इस अध्ययन में, एक समय में एक कारक (ओएफएटी) दृष्टिकोण का उपयोग करके जलमग्न खेती तकनीक के माध्यम से बढ़े हुए पोषण मूल्यों के साथ प्लुरोटस एरिंजि और कैलोसाइब इंडिका के फंगल मायसेलियल बायोमास का बड़े पैमाने पर उत्पादन हासिल किया गया था। भौतिक (तापमान, पीएच, और आरपीएम) और रासायनिक (कार्बन स्रोत, नाइट्रोजन स्रोत, और सी/एन अनुपात) दोनों मापदंडों का अध्ययन शेक फ्लास्क

स्तरों में किया गया था और इसके अलावा किण्वकों में मशरूम मायसेलिया के बड़े पैमाने पर उत्पादन के लिए अनुकूलित मापदंडों का उपयोग किया गया था (15) एल, 100 एल, 350 एल)। विटामिन डी2 की वृद्धि के लिए काटे गए मशरूम मायसेलिया को यूवी-बी विकिरण के संपर्क में लाया गया। दोलन (200 आरपीएम), वातन दर (0.1 वीवीएम), तापमान (28 डिग्री सेल्सियस), पीएच (6.5) और इनोकुलम आकार (4%) की अनुकूलित स्थितियों के तहत बैच मोड में 15 एल किण्वक में पी. इरिंजि की उच्चतम बायोमास उपज 13.44±0.82 ग्राम/लीटर था। बायोमास उपज बढ़ाने के लिए बैच चरण को फेड-बैच चरण तक बढ़ाया गया था और अंतिम बायोमास को 22.68 ± 0.8 ग्राम/लीटर तक बढ़ाया गया था। पी. इरिंजि मायसेलियल बायोमास को 100 एल किण्वक में उत्पादित किया गया था जिसमें बायोमास उपज 12.54 ± 0.81 ग्राम/लीटर प्राप्त हुई थी। दोलन (150 आरपीएम), वातन दर (0.1 वीवीएम), तापमान (28 डिग्री सेल्सियस), पीएच (6.5) और इनोकुलम आकार (4%) की अनुकूलित स्थिति के तहत बैच मोड में 15 एल किण्वक में सी. इंडिका की उच्चतम बायोमास उपज 9.54 ± 0.35 ग्राम/लीटर था। इसके अलावा, सी. इंडिका मायसेलिया का उत्पादन भी बड़े पैमाने पर किण्वक (350 लीटर) में किया गया था और अंतिम बायोमास उपज 9.34 ± 0.81 ग्राम/लीटर थी। आरएसएम का उपयोग करके कटे हुए मायसेलिया में विटामिन डी2 संश्लेषण के लिए आदर्श यूवी-बी विकिरण की स्थिति निर्धारित की गई थी। विटामिन डी2 पर तीन स्वतंत्र चर, तापमान (20-40 डिग्री सेल्सियस), पराबैंगनी-बी तीव्रता (0.6-1.2 डब्ल्यू/एम2), और एक्सपोजर का समय (10-30 मिनट) के प्रभावों की जांच की गई। इष्टतम परिस्थितियों (परिवेश तापमान, 24.29 ओसी, यूवी-बी तीव्रता, 1.099 डब्लू/एम2, और एक्सपोज़र समय, 23.88 मिनट) के तहत विटामिन डी2 बढ़कर 329.43 µg/g शुष्क डब्लूटी हो गया। इसी प्रकार, सी.इंडिका के लिए विटामिन डी2 को 247±3.28 माइक्रोग्राम/ग्राम शुष्क वजन तक सुधारा गया था। फ़्रीज़-सूखे पी. इरिंजि मायसेलिया में प्रोटीन 24.52±0.53%, अपरिष्कृत वसा 6.78±0.81%, अपरिष्कृत फ़ाइबर 18.54±0.57%, कुल राख 7.82±0.61%, और कार्बोहाइड्रेट 55.36±1.24 शामिल थे। %) और ग्लूटामिक एसिड (3.05%), आर्जिनिन (2.28%), थ्रेओनीन (2.03%), ग्लाइसिन (2.01%), और एलानिन

(1.74%) जैसे विभिन्न अमीनो एसिड से भरपूर है। जबकि, फ्रीज-सूखे सी.इंडिका मायसेलिया में प्रोटीन 28.21±0.31%, अपरिष्कृत वसा 5.78±0.55%, अपरिष्कृत फाइबर 14.24±0.37%, कुल राख 6.72±0.22%, और कार्बोहाइड्रेट 57.06±1.13% पाया गया। सी.इंडिका मायसेलिया में ग्लूटामिक एसिड (4.01%), ऐलेनिन (2.77%), ल्यूसीन (1.89%), लाइसिन (1.74%), आइसोल्यूसीन (1.68%), एसपारटिक एसिड (1.68%), ग्लाइसिन (1.49%) थ्रेओनीन (1.33%) और वेलिन (1.33%) की उच्च मात्रा देखी गई। उत्पादित मायसेलिया की पोषण गुणवत्ता पर यूवीबी विकिरण के प्रभाव का भी अध्ययन किया गया और उनके गैर यूवी-उपचारित (नियंत्रण) मायसेलिया के साथ तुलना की गई। दोनों मायसेलिया (पी. एरिंगी और सी. इंडिका) में एर्गोस्टेरॉल की मात्रा 2.48 से 1.63 मिलीग्राम/जी (पी. एरिंगी) और 2.11 से 1.46 मिलीग्राम/जी (सी. इंडिका) तक काफी कम हो गई।

यूवी विकिरण के कारण मायसेलियल बीटा ग्लूकेन्स (%) में महत्वपूर्ण (पी <0.05) सुधार हुआ, यानी, पी. इरिंजि में 26.18 से 32.21% (डब्ल्यू/डब्ल्यू) और सी. इंडिका में 24.11 से 31.46% (डब्ल्यू/डब्ल्यू) तक सुधार हुआ। यूवीबी उपचारित नमूनों में एफआरएपी, डीपीपीएच सफाई क्षमता, टीपीसी और टीएफसी सहित एंटीऑक्सीडेंट गतिविधि में भी उनके नियंत्रण (गैर यूवीबी उपचारित) नमूनों की तुलना में दोनों मायसेलियल अर्क की काफी सुधार हुआ (पी <0.05)। न्यूट्रास्यूटिक रूप से समृद्ध मायसेलिया का उपयोग दो अलग-अलग प्रकार के खाद्य उत्पादों अर्थात् इंस्टेंट नूडल्स और मीट एनालॉग्स की तैयारी के लिए किया गया था। भौतिक रासायनिक गुण, संवेदी मूल्यांकन और स्व-जीवन अध्ययन आयोजित किए गए। 6% पी. इरिंजि मायसेलिया पाउडर और 15% सी. इंडिका मायसेलिया पाउडर वाले नूडल्स के नमूने स्वीकार्य पाए गए। यह देखा गया कि मशरूम मायसेलिया फोर्टिफाइड खाद्य उत्पादों को ग्रामीण उपभोक्ताओं (वयस्कों और बच्चों दोनों) द्वारा अच्छी तरह से स्वीकार किया जाता है।

## *TABLE OF CONTENTS*

## *LIST OF FIGURES*

## *LIST OF TABLES*

# ABBREVIATIONS

FAO: Food and Agricultural Organization

PE: *Pleurotus eryngii*

CI: *Calocybe Indica*

SSF: Solid state fermentation

SmF: Submerged fermentation

EPS: Exopolysaccharide

vvm: Volume of air per unit volume of media

SFx: Soya flour extract

CSL: Corn steep liquor

UV: Ultraviolet

C/N: Carbon to nitrogen ratio

VDR: Vitamin D receptor

LLC: Lewis Lung Carcinoma cells

MDA: Malondialdehyde

ROS: Reactive oxygen species

HYP: Hydroxyproline

TLR: Tolllike receptors

KCR: Kupffer cell receptor

GLUT4: Glucose transporter 4

RIPs: Ribosomal inactivating proteins

GABA: gamma-aminobutyric acid

GI: Glycaemic index

%: percent

ºC: degree celcious

h: hour

min: minutes

s: seconds

PDA: Potato Dextrose Agar

g: gram

mg: milligram

µg: microgram

L: Litre

mL: milliliter

ppm: Parts per millions

rpm: Revolutions per minute

cm: centimeter

m: meter

nm: nanometer mm: millimeter

dw: Dry weight

N: Nitrogen

C:  Carbon

K: Potassium

P: Phosphorus

Fe: Iron

Zn: Zinc

Mn: Manganese

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

ANOVA: analysis of variance

DMRT: Duncan's Multiple