ENHANCEMENT OF NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF CALOCYBE INDICA MUSHROOM

HIMANSHI

CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JUNE 2018

ENHANCEMENT OF NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF CALOCYBE INDICA MUSHROOM

by

HIMANSHI

CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY

Submitted

in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JUNE 2018

DEDICATED TO MY PARENTS

CERTIFICATE

*This is to certify that the thesis entitled '**Enhancement of nutraceutical potential of Calocybe indica mushroom'** submitted by **Ms. Himanshi** for the degree of **DOCTOR OF PHILOSPHY** has been prepared under my guidance with the rules and regulations of Indian Institute of Technology Delhi, India. The research report and results presented in the thesis have not been submitted for any degree or diploma in any other institute or university.*

(Dr. Satyawati Sharma)

Date: ***(Professor)***

Place: *Centre for Rural Development and Technology*

Indian Institute of Technology 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. But before I do, I take a special moment to thank 'GOD' who bestowed me with all the favorable circumstances to run smoothly on this decisive path of my life. Also, there are number of people whom I would to thank for their love, care, support and efforts.

It is my heartfelt pleasure and deepest sense of gratitude to offer my humble thanks to my mentor Prof. Satyawati Sharma for her unconditional love and motherly affection. Her precious suggestion, academic excellence, incisive criticism and inevitable faith drove me to successful completion of my research work. Her sweet words of wisdom will always be cherished throughout my life.

Besides my supervisor, I would like to thank the rest of my thesis committee: Prof. S.N Naik, Prof. S. K. Khare and Dr. A. S. Yadav for their insightful comments and encouragement, but also for the hard question which incented me to widen my research from various perspectives.

My sincere thank goes to Dr. Abhishek Sharma and Dr. Pratibha Yadav for their unending support during my Ph.D. tenure. Their valuable time and moral support was something which helped in many ways to complete this research work. My special gratitude goes to Dr. Sneha Sehwag for her patience, understanding, encouragement and above all the personal guidance has been of great value for me.

I extend my warm thanks to my seniors Dr. Monica Verma, Dr. Sharad Verma, Dr. Anuroop Adak, Dr. Kanika, Mr. Ram Kumar and my juniors Garima, Mandira and Amir for their help and support. I would like to extend my thanks to my labmates cum friends Shalinee

Prasad, Ritika Pathak, Garima Tiwari, Megha Pant, Monika Jangra and Sonal Yadav for the stimulating discussions, for the days spent together working in labs and for all the fun had in the last four years. I can hardly overlook the remarkable corporation and timely help extended by my friends Deepak, Rakhi, Rohit, Paridhi, Karuna, Juhi, and Arshad.

I am grateful to University Grant Commission (UGC), Delhi for UGC-JRF and UGC-SRF fellowships which enabled me to successfully pursue my research experiments.

Last but not the least my words are inadequate to express my emotional love to my family. The endless love, affection and encouragement from my parents have always pushed me forward. Warmth of my mother always geared me up with huge peace and positivity. The support from my brother, sister in law and my sister always motivated me up to the million levels. My life is indebted to all my family members for their love, patience, support and sacrifices. I would never have been able to achieve such heights without their blessings.

(Himanshi)

ABSTRACT

In the era of increasing world population, shrinking lands and limited agricultural resources, edible mushrooms offers the promising substitute providing tenacity towards the problems of waste generation, food security, malnutrition and poverty. Edible mushrooms such as *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* spp., *Lentinus edodes* etc. have been successfully explored for their production on various kinds of wastes including their nutraceutical enhancement, value addition and spent utilization for the compost preparation. Also, these mushroom species are well known for their unique significant pharmacological properties. Indigenous edible mushroom *Calocybe indica* grown in tropical and sub-tropical regions has also been emerged as one of the culinary mushroom providing great nutritional properties along with the marvelous therapeutic values. In spite having easy cultivation technology, good biological efficiency, great nutritional properties and huge revenues, the mushroom species has not been explored. The present study aimed to enhance the nutritional and nutraceutical properties of the *C. indica* mushroom by substrate enrichment using novel organic and inorganic supplements, post harvest treatments, their utilization for development of functional food product and propagation of the complete technology package developed to the selected rural areas.

Waste nitrogenous tree biomasses viz. *Bauhinia variegata* (BVL), *Syzygium cumini* (SCL) and *Cassia fistula* (CFL) were identified, collected and used as the co-substrate in varying proportions (0, 25, 50 and 75%) with the wheat straw (WS) for the production of *C. indica*. Results indicated that 25% BVL was the best co-substrate for producing highest yield (622g) and biological efficiency (82.93%) of *C. indica*. High contents of nitrogen presented in the CFL hindered the growth of *C. indica* and yielded poorly. Supplementation significantly ($p<0.05$) improved the protein, ash, fibers and minerals contents of the fruit bodies. Additionally, among

the ten treatments, 25 BVL produced the fruiting bodies with high antioxidant properties followed by 25 CFL and 25 SCL. Significant degradation of complex material such as cellulose, hemicelluloses and lignin was scrutinized (quantitative and qualitative by FTIR) in all mushroom spent and found to support the growth of *E. fetida* earthworms, juveniles and cocoons. The vermi-compost produced after 70 days possessed good manurial values.

Inorganic supplements viz. essential mineral Fe, Zn and Se were utilized to improve the quality and quantity of *C. indica*. Preliminary studies identified the optimum doses for the supplementation i.e. 6.25 ppm for Fe, 125ppm for Zn and 5 & 10 ppm for Se for producing higher mycelial yield, which were then further carried out in the field for the production of mushroom fruit bodies. Bio-accumulation of the minerals studied using SEM –EDX was found to be in well correlation with the minerals estimated *via* ICP-MS. Further, antioxidant profiling estimated signified a negative correlation with the Fe enrichment, whereas Zn was found to increase the contents of TPC, DPPH and FRAP assays. Interestingly, Se was found to enhance the protein contents of the fruit bodies and hence evaluated for their amino acid profiling, HPLC graphs revealed increased chemical scores of glutamic acid (4.73 g/100g) followed by aspartic acid (1.80 g/100g), glycine (1.61 g/100g) and leucine (1.39 g/100g) in the 10 ppm Se treated mushrooms. Also, antioxidant studies examined showed a significant ($p<0.05$) increment in the TPC contents along with noticeable scavenging effects and ferric reducing capacities.

The fruit bodies harvested were further studied for their vitamin D_2 contents by experimenting with natural sunlight and artificial UVB light. The kinetic performed at different time intervals (0, 15, 30, 45, 60 and 90 minutes) revealed a linear increment of the vitamin D_2. Both the sunlight and UVB radiation were able to improve the vitamin D levels, but significant high contents were recorded with the UVB treated mushrooms after 60 min of irradiations.

Surprisingly appreciable amount of β-glucan (44.5 g/100g) was recorded with the fruit bodies irradiated under UVB source for 60 min. Further, these rays positively augmented the TPC, TFC FRAP and DPPH radical scavenging activities along with the altered scores for all the seventeen amino acids analyzed of the treated fruit bodies. Nutraceutically enriched fruit bodies were further processed into the dried powder and studied for their hydration properties (WHC, OHC & WSI) and found appropriate for developing bakery product. *C. indica* powder (CIP) mushroom cookies were successfully formulated with a high acceptance of 10% fortification. Cookies were found rich in protein, fibre, minerals (Fe, Zn and K), and β-glucan contents as compared to the wheat flour cookies. Also, CIP incorporation increased the levels of TPC, TFC, DPPH and FRAP of the cookies and reduced the glycemic index of the same.

Propagation of the technology designed for *C. indica* mushroom was successfully carried out in the selected nine villages of Haryana. The program effectively resolved the problems of low income and availability of quality food from the respective areas. The farmers implemented the technique transferred and are willing to continue the activity for their future wellbeing.

सार

विश्व में बढती आबादी, घटती भूमि और सीमित कृषि संसाधनों के युग में, कचरे से उत्पादित खाद्य मशरूम की खेति कुपोषण, खाद्य सुरक्षा, और गरीबी की समस्याओं में दृढ़ता प्रदान करने वाला एक आशाजनक विकल्प हैं। खाद्य मशरुम जैसे की बटन मशरुम, प्लीरोटस की किस्मे, लेंटिनस एडोडस इत्यादि को विभिन्न प्रकार के अपशिष्टों पर उनके उत्पादन के लिए सफलतापूर्वक खोजा गया है, जिनमे न्यूट्रस्यूटिकल पॉवर को बढ़ाना, उनसे वैल्यू एडेड प्रोडक्ट बनाना और कंपोस्ट तैयार करना शामिल है। इसके अलावा, इन मशरूम प्रजातियों को उनके अद्वितीय महत्वपूर्ण औषधीय गुणों के लिए भी जाना जाता है। स्वदेशी खाद्य मशरूम 'कैलोसिबे इंडिका' जोकि उष्णकटिबंधीय और उप उष्णकटिबंधीय क्षेत्रों में उगाई जाती है, भी एक अद्भुत मशरूम के रूप में उभर रही है। यह मशरुम भी अद्भुत चिकित्सकीय मूल्यों के साथ साथ महान पौष्टिक गुण प्रदान करता है। आसान खेती तकनीक, अच्छी जैविक दक्षता, अच्छे पौष्टिक गुणों और विशाल राजस्व के बावजूद भी इस मशरूम प्रजाती की खोज नहीं की गई है। वर्तमान अध्ययन का उद्देश्य कैलोसिबे इंडिका मशरुम के औशाधिये (न्यूट्रास्यूटिकल) एवं पोषण गुणों को बढाने हेतु किया गया हैं, जिसमे आर्गेनिक एवं नॉन-आर्गेनिक सप्लीमेंट का खेती के समय इस्तेमाल, फसल तोड़ने के बाद उपचार, फसल का गुणात्मक आहार में प्रोयोग, एवं चुने गए पूर्ण प्रौद्योगिकी पैकेज को ग्रामीण क्षेत्रो में प्रचार करना शामिल हैं।

नाइट्रोजेन से भरपूर पेड़ो की पत्तिया जैसे की बोहिनिया वेरिगाटा (कचनार), सिजीजियम कमिनी (जामुन) और कैसिया फिस्टुला (अमलतास) शोध के लिए चुने गए। इन सभी पत्तियो को गेहूं के भूसे (डब्ल्यूएस) के साथ अलग-अलग अनुपात (0, 25, 50 और 75%) में सह-सब्सट्रेट के रूप में सी इंडिका के उत्पादन के लिए मिलाया गया। परिणाम बताते हैं कि 25% कचनार उच्चतम उपज (622 ग्राम) और जैविक दक्षता (82.93%) के उत्पादन के लिए सबसे अच्छा सह-सब्सट्रेट था। अमलतास में प्रस्तुत नाइट्रोजन की उच्च मात्रा के कारण, सी इंडिका की उपज एवं विकास में बाधित और खराब साबित हुई। तुडाई उपरांत पूरक मशरुम प्रोटीन, राख, फाइबर और खनिज सामग्री में सर्वश्रेष्ठ पाए गये। इसके अतिरिक्त, दस उपचारों में से, 25% कचनार से उच्च एंटीऑक्सीडेंट गुण भी पाए गए। सेलूलोज़, हेमिसेल्यूलोज़ और लिग्निन जैसी जटिल सामग्री के महत्वपूर्ण गिरावट की जांच भी की गई (एफटीआईआर द्वारा मात्रात्मक और गुणात्मक)। सभी उपचार इ. फेतिदा केचुओ, किशोर और कोकून के विकास का समर्थन करने के लिए उत्तम पाया गए । 70 दिनों के बाद उत्पादित वर्मी-कंपोस्ट में अच्छे मानदंड मूल्य थे।

अकार्बनिक पूरक जैसे आवश्यक खनिज Fe, Zn और Se का उपयोग सी इंडिका की गुणवत्ता और मात्रा में सुधार के लिए किया गया था। प्रारंभिक अध्ययनों ने पूरक के लिए इष्टतम खुराक की पहचान की, जिसमे 62.5 ppm Fe के लिए, 125 ppm Zn और 5 ppm Se उच्च और माइक्रेलियल उपज के लिए उत्तम पाए गए। SEM-EDX का उपयोग करके अध्ययन किए गए खनिजों का बायो-संचय आईसीपी-एमएस के माध्यम से अनुमानित खनिजों के साथ अच्छी तरह से सहसंबंध में पाया गया था। इसके अलावा, एंटीऑक्सीडेंट प्रोफाइलिंग ने अनुमानित रूप से Fe संवर्द्धन के साथ एक नकारात्मक सहसंबंध को इंगित किया, जबकि Zn को टीपीसी, डीपीपीएच और फ्रैप assays में वृद्धि

हुई। दिलचस्प बात यह है कि Se से सप्लीमेंट करे गये मुशरूम के प्रोटीन में वृद्धि पाई गई और इसलिए उनके एमिनो एसिड प्रोफाइलिंग (HPLC) के लिए मूल्यांकन किया गया, ग्लूटामिक एसिड (4.73 ग्राम / 100 ग्राम), एस्पोर्टिक एसिड (1.80 ग्राम / 100 ग्राम), ग्लिसिन (1.61 ग्राम / 100 ग्राम) और ल्यूसिन (1.3 9 ग्राम / 100 ग्राम) के रासायनिक स्कोर 10 पीपीएम सप्लीमेंटेड मशरुम में अधिक पाए गए।

फसल निकायों को प्राकृतिक सूरज की रोशनी और कृत्रिम UVB प्रकाश के साथ प्रयोग करके विटामिन डी की मात्रा बढाने हेतु अध्ययन किया गया था। विभिन्न समय अंतराल (0, 15, 30, 45, 60 और 90 मिनट) में किए गए गतिशीलता ने विटामिन डी की रैखिक वृद्धि का खुलासा किया। सूरज की रोशनी और UVB विकिरण दोनों विटामिन डी के स्तर में सुधार करने में सक्षम थे, लेकिन 60 मिनट विकिरण के बाद UVB से ट्रीट की गए मशरूम के साथ महत्वपूर्ण उच्च मात्रा दर्ज की गई। UVB स्रोत के तहत 60 मिनट के लिए विकिरणित फल निकायों के साथ β-glucan (44.5 ग्राम / 100 ग्राम) की आश्चर्यजनक रूप से सराहनीय मात्रा दर्ज की गई। इसके अलावा, इन किरणों ने टीपीसी, टीएफसी एफआरपी और डीपीपीएच कट्टरपंथी स्कावेंगिंग गतिविधियों को सकारात्मक रूप से बढ़ाया, साथ ही इलाज किए गए फल निकायों में एमिनो एसिड के बढे हुए स्कोर भी दर्ज किये गए। न्यूट्रस्यूटिकली समृद्ध फल निकायों को सूखे पाउडर में बदलकर उन्हें आगे संसाधित किया गया और उनके हाइड्रेशन गुणों (डब्ल्यूएचसी, ओएचसी और डब्ल्यूएसआई) के लिए अध्ययन किया गया था और बेकरी उत्पाद विकसित करने के लिए उपयुक्त पाया गया था। सी इंडिका पाउडर (सीआईपी) मशरूम कुकीज़ सफलतापूर्वक 10% की उच्च स्वीकृति के साथ तैयार की गई थी। गेहूं के आटे की कुकीज़ की तुलना में मशरुम कुकीज़ प्रोटीन, फाइबर, खनिज (Fe, Zn और K), और β-glucan में समृद्ध पाए गए थे। इसके अलावा, सीआईपी निगमन ने कुकीज़ के टीपीसी, टीएफसी, डीपीपीएच और एफआरपी के स्तर में वृद्धि की और इसके ग्लाइसेमिक इंडेक्स को कम कर दिया।

सी इंडिका मशरूम के लिए डिजाइन की गई तकनीक का प्रचार हरियाणा के चयनित नौ गांवों में सफलतापूर्वक किया गया था। इस कार्यक्रम ने कम आय की समस्याओं और संबंधित क्षेत्रों से गुणवत्ता वाले भोजन की उपलब्धता को प्रभावी ढंग से हल किया। किसानों ने तकनीक को स्थानांतरित कर दिया और भविष्य के कल्याण के लिए गतिविधि को जारी रखने के प्रति इच्छा भी जताई।

CONTENTS

LIST OF FIGURES

LIST OF TABLES

LIST OF PLATES

ABBREVIATIONS

ANNOVA	Analysis of Variance
DMRT	Duncan's Multiple Range Test
%	Percentage
ºC	Degree centigrade
h	Hour
min	Minutes
s	Seconds
g	Gram
mg	Milligram
µg	Microgram
L	Litre
mL	Milliliter
ppm	Parts per millions
rpm	Revolutions per minute
/	Per
cm	Centimeter
m	Meters
nm	Nanometer
mm	Millimeter
BE	Biological Efficiency

fw	Fresh weight
dw	Dry weight
KV	Kilovolts
lbs	Pound
W	Watt
N1	Newton
N	Normality
Ha	Hectare
Kg	Kilogram
Rs	Rupees
@	At