



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

| | |
|-------------------------------------|------------------------|
| DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO | 102015000057159 |
| Data Deposito | 01/10/2015 |
| Data Pubblicazione | 01/04/2017 |

Classifiche IPC

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| A | 01 | G | 1 | 04 |

Titolo

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Metodo di produzione di funghi officinali, contenitore per la loro produzione e funghi così ottenuti |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo

“Metodo di produzione di funghi officinali, contenitore per la loro produzione e funghi così ottenuti”

A nome: Maurizio BAGNATO

residente in Roma (00145), Viale Giustiniano Imperatore, 15

Mandatario: Basilio CICCARELLO iscritto all'Albo con il n. 512 BM,
domiciliato presso la INGENIIS s.a.s. di B. Ciccarello e C.,
Via Antonio De Berti, 24 - 00143 Roma.

Campo della tecnica

La presente invenzione concerne un metodo di produzione di funghi officinali, un contenitore per la loro produzione e i funghi così ottenuti.

Stato dell'arte

- 5 In genere i funghi sono coltivati in balle o contenitori di materiale vario, come cellulosa, sabbia, terriccio, con una grande variabilità di metodologie e di risultati sulla qualità del prodotto finale. Per ottenere risultati e qualità standardizzati la presente invenzione adotta contenitori di polipropilene, sostanzialmente bottiglie, disposti su banconi in serre tecnologiche, con la
- 10 possibilità di variare l'intensità della luce naturale o artificiale e di controllare i valori di umidità e temperatura. Tale tecnica è trattata da Rodriguez-Estrada e Royse (2005) nella coltivazione del *Pleurotus eryngii*.
- È nota la coltivazione di funghi con sistemi idroponici, a ciclo chiuso o aperto. Soluzioni liquide nell'idroponica basate su saccarosio e destrina,
- 15 usate come fonti nutritive, danno una bassa resa, tra 0,1 e 0,4 kg/m² (Bechara MA 2006), poco di più con l'aggiunta di carbonato di calcio, per il nodo cruciale del controllo del pH. La resa tipica, ad esempio, è dell'ordine di

1,92 kg/m² con soluzione con saccarosio; nel ciclo aperto con composti antimicrobici e saccarosio, destrina, destrina con muschio e acqua deionizzata, la resa varia da 1,5 a 2,3 kg/m²; nel ciclo chiuso con destrina da sola, alla concentrazione di 30 g/L, la resa risulta più alta, quasi 3 kg/m².

5 Comunque, la coltivazione idroponica di *Agaricus bisporus* come di altri funghi è assolutamente non competitiva rispetto al sistema tradizionale; pertanto è stata abbandonata per far posto ad una semi-idroponica, come quella descritta da Rodriguez-Estrada e Royse (2005) a cui ci si ispira nel presente metodo.

10 Nel 2008 si è notato, da un'osservazione casuale in USA su confezioni di funghi coltivati e irraggiati con lampada con luce allo xenon per abbattere la carica batterica, così come prevedono le norme sanitarie negli USA, lo sviluppo della vitamina D₂, che, per certi versi, è risultata una sorpresa inaspettata e gradita. Non che si fosse ignari della capacità dei funghi
15 disseccati al sole di concentrarsi di vitamina D, ma l'essere riusciti a produrre qualche centinaio di volte la dose di partenza di vitamina D da funghi appena raccolti, attraverso una macchina che veniva utilizzata per tutt'altro scopo, ha fatto balenare l'idea a chi produceva tali macchine, la Xenon Corporation, di brevettarne l'uso, con la modalità a luce pulsata, per la
20 produzione di vitamina D₂ dai funghi raccolti. Erano già note, da numerose ricerche, le proprietà salutistiche, comprese quelle antitumorali, della vitamina. E' stata fatta, da parte del Richiedente, un'esperienza di arricchimento dei funghi in vitamina D tramite lampada a luce pulsata della Xenon Corp. (Steripulse XL 3000 Xenon Co, Wilmington; MA) che ha
25 dimostrato quanto già descritto in letteratura, cioè l'innalzamento medio di cinque volte la dose giornaliera raccomandata (400 UI) per porzione di 84 g dopo solo tre impulsi e l'andamento esponenziale di tale arricchimento in relazione al numero di impulsi. Tale indicazione è adattabile ad ogni specie di fungo che si intende produrre, e la luce pulsata può essere somministrata

secondo frequenza di impulsi luminosi e con un tempo variabili tali da consentire alle varie specie di funghi considerate, la produzione di vitamina D2 per porzione di fresco o nel secco di 2.000 UI, dose questa ritenuta sufficiente alla prevenzione e trattamento delle malattie neoplastico-degenerative perché con capacità antidegenerativa cellulare.

Altro elemento fondamentale è quello di ottenere, al di là degli ammendanti immessi nel substrato, condizioni idonee di crescita fisiche che possano ovviare alle ridotte dimensioni del contenitore per il substrato, ottimizzando l'utilizzo dei precursori minerali e azotati attraverso campi elettromagnetici (CEM) secondo le osservazioni di Jamil et al. (2011). Infatti CEM di potenza variabile dai 10 ai 100 mT, a cui si espongono i funghi secondo tempi prefissati ed in fasi dello sviluppo fungino, possono determinare un miglioramento dell'utilizzo del substrato di crescita da parte dei funghi stessi, rendendoli maggiormente capaci di formare massa secca, incamerare acqua ed organizzare precursori minerali e azotati, sviluppandosi così in maniera sana concentrando metaboliti ed in minor tempo. Il meccanismo si basa probabilmente sull'effetto elettromagnetico che induce una polarizzazione e l'apertura di canali ionici tramite i quali vengono velocizzate le operazioni di trasporto e di conversione enzimatica mediata dagli oligoelementi inorganici che vengono massivamente organizzati, provocando a cascata un aumento di trasporto di acqua intracellulare e la produzione di costituenti base, come nucleotidi, amminoacidi (AA), peptidi etc, che incrementano il residuo secco fungino e formano massa.

Sommario dell'invenzione

In vista dello stato della tecnica sopra descritto, uno scopo della presente invenzione è di fornire un metodo di coltivazione ottimale per costi e resa. Un altro scopo è quello di preparare un substrato adatto alla coltivazione di funghi.

Un ulteriore scopo è quello di ottimizzare il contenitore nel quale il fungo è fatto crescere.

Ancora uno scopo dell'invenzione è quello di scegliere varietà di funghi atti a divenire funghi officinali, nel senso che verrà spiegato nel seguito.

- 5 Per raggiungere gli scopi, l'invenzione propone un metodo chimico-fisico di produzione di funghi arricchiti in sostanze biologicamente attive, ottenuti in serre tecnologiche su contenitori di substrato predosato comprendente i passi di isolamento e sviluppo pre-semina del micelio, maturazione del substrato, semina del micelio della specie fungina desiderata, incubazione
- 10 con sviluppo dei primordi fungini in condizioni controllate e assistite tramite macchinari e processori atti a regolare temperatura, umidità e irraggiamento, sviluppo dei carpofori, loro raccolta, loro trattamento con luce pulsata allo scopo di stimolare la produzione di vitamina D2, ed in cui si ha un trattamento fisico mediante campi elettromagnetici (CEM) in tutti i passi
- 15 precedenti la raccolta, oltre ad un trattamento chimico coll'aggiunta nel substrato di polvere d'uovo, e successivamente alla semina del micelio, di oligoelementi inorganici. Si ottengono così funghi officinali, cioè dotati di capacità terapeutiche in particolare nelle malattie neoplastiche e degenerative.
- 20 In particolare il trattamento fisico permette un incremento del numero dei carpofori, un aumento di massa secca e umidità, una diminuzione dei tempi di produzione, e un'ottimale organizzazione degli oligoelementi inorganici, nonché di migliorare il metabolismo del substrato e la qualità finale dei funghi. Vantaggiosamente, il trattamento fisico è modulato secondo
- 25 sequenza e consiste nell'esposizione a CEM di 15-25 mT per un intervallo di 10-20 min/die fin dal passo di isolamento e sviluppo pre-semina del micelio e per tutte le fasi fino allo sviluppo dei primordi fungini, successivamente a CEM di 100 mT per un intervallo di 2-3 min/die fino alla raccolta. Questo trattamento in sequenza ha dimostrato (Jamil, 2011) che CEM a bassa

intensità per lunghi periodi di tempo sono utili nelle prime fasi fino alla formazione dei primordi, mentre per lo sviluppo in altezza del carpoforo sono necessari CEM ad alta intensità in un lasso di tempo breve. Tale trattamento permette in alcuni casi addirittura di dimezzare il tempo di produzione aumentando il numero di volate.

La polvere d'uovo è aggiunta al substrato in un rapporto in peso compreso in un intervallo del 2 a 3% del peso secco del substrato nel contenitore in maniera che il carpoforo sviluppi un quantitativo biologicamente attivo di ergotioneina. L'ergotioneina stimola i meccanismi detossificanti ed antiossidanti-antinfiammatori cellulari.

Gli oligoelementi inorganici comprendono un complesso scelto dal gruppo dei sali di selenio, germanio, zinco e rame, che sono aggiunti in un rapporto in peso compreso fra 1 e 3‰ del peso secco del substrato nel contenitore, importanti per le proprietà antiossidanti, antidegenerative e antitumorali perché facenti parte di numerosi complessi enzimatico-vitaminici e stimolanti il sistema immunitario contro i tumori e altre malattie cronico-degenerative.

La luce pulsata consente di stimolare la produzione di vitamina D₂; la frequenza degli impulsi luminosi e il tempo di esposizione variano a seconda della specie di fungo con l'obiettivo di raggiungere la quantità di 2.000 UI di vitamina D₂ per porzione/die di fungo fresco o secco che rappresenta la dose antidegenerativa e antineoplastica secondo numerosi autori.

L'invenzione fornisce inoltre un contenitore per la produzione di funghi arricchiti in sostanze biologicamente attive sotto forma di una bottiglia cilindrica con un asse longitudinale, in materia plastica, dotata di una bocca superiore con un tappo superiore e di un fondo, provvisto di una bocca inferiore e dotato di un tappo inferiore, la bottiglia essendo provvista di una coppia di beccucci chiudibili per il passaggio di liquido.

I beccucci sono disposti in prossimità del fondo e della bocca angolati verso questi rispetto all'asse longitudinale della bottiglia.

Le specie fungine vengono scelte, sia per le loro già dimostrate capacità contrastanti le malattie neoplastico-degenerative e sia per l'adattabilità delle tecniche di coltivazione utilizzate nel presente metodo, dal gruppo delle seguenti venti specie: *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* "Shiitake", *Flammulina velutipes*, *Morchella conica* Parsons, *Auricularia auricula-judae* (L.:Fr.) Schroeter, *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., *Tremella fuciformis* Berk. Brand, *Agrocybe aegerita*, *Pholiota nameko*, *Hypsizygus tessulatus* (Bull.) Singer, *Hypsizygus ulmarius*, *Grifola frondosa* "Maitake", *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, *Hericium erinaceus*, *Poria cocos*.

Inoltre l'invenzione prevede l'uso di funghi arricchiti di sostanze biologicamente attive e standardizzati, per essere destinati al consumo come alimento, sia freschi che secchi e sia interi che in polvere, nella prevenzione e trattamento delle malattie neoplastico-degenerative, in quanto dotati di attività funzionali e proprietà terapeutiche oltre alle loro capacità nutrizionali, distinguendosi dalla specie comune mediante il suffisso *officinalis*, (abbrev. *off.*) da aggiungersi al nome scientifico latino di specie.

In pratica, in contemporanea con il trattamento fisico con CEM a potenza variabile, vengono fatte pervenire sostanze minerali e oligoelementi inorganici diluiti in acqua, assicurando che sia presente nella bottiglia una minima quantità di compost come substrato solido, che fornisce azoto e carbonio, con aggiunta di polvere di uovo, quale fonte di cisteina precursore del prodotto finale ergotioneina. Il substrato solido contiene inoltre sali di germanio (germanato solubile), selenio (selenito di sodio), zinco (idrossido di zinco) e rame (idrossido di rame) ad una concentrazione del 1-3‰ che sono incorporati nella struttura del fungo. Il substrato solido, dopo la sua insemminazione con il micelio, viene irrigato automaticamente. Nel compost sono presenti comunemente sottoprodotti della produzione di farine, crusca, paglia, frantumati di cereali, carbonato di calcio ecc., ognuno con il rapporto

fra carbonio e azoto (C/N) ottimale per la specie fungina da coltivare. Con l'aggiunta di polvere d'uovo il contenuto di azoto nel compost è compreso tra 1,8 e 2%. Non appena il fungo è raccolto viene sottoposto a irraggiamento tramite lampada allo xenon a luce pulsata per favorire la produzione di ergocalciferolo (vitamina D2). I funghi ottenuti vengono quindi in parte immessi sul mercato nelle consuete forme, cioè fresca, essiccata o liofilizzata, e in parte utilizzati per la preparazione di integratori alimentari.

Razionale delle sostanze prodotte nell'invenzione

Le sostanze finali obiettivo del metodo secondo l'invenzione sono prodotte tramite agenti fisici, campi elettromagnetici e luce pulsata per vitamina D2, o chimici, che possono essere organici precursori, ad es. l'amminoacido cisteina per ergotioneina, o inorganici minerali (metalli e terre rare) che devono essere trasformati in organici, attraverso l'attivazione catalitica enzimatica, nella forma di oligoelementi colloidali. Le sostanze sono state scelte sulla base di un'attenta revisione bibliografica che le indica tra le più attive nei funghi nella prevenzione e trattamento in particolare delle patologie neoplastiche e in generale degenerative, e già presenti in minime quantità nei funghi considerati, da cui l'idea di farle produrre partendo da precursori o concentrare a livelli sensibili e di azione terapeutica. Come visto in precedenza, il trattamento fisico tramite i CEM produce un miglioramento qualitativo e quantitativo generale dei funghi migliorando l'adattamento alle condizioni e agli scopi della produzione, cioè renderli officinali. Per quanto riguarda i minerali, i funghi, comportandosi da spugne, in linea teorica possono organicarli tutti, assorbendoli o meglio inglobandoli nella materia organica. In realtà, il grado di assorbimento varia sulla base del "tropismo" fenotipicamente correlato ad uno o più oligoelementi inorganici a cui il fungo è maggiormente sensibile. Ciò si rileva dalla presenza di tali oligoelementi inorganici nel fungo di partenza. Pertanto si hanno funghi come il *Ganoderma lucidum* particolarmente ricchi in germanio (Ge) o come

l'Auricularia a.j. o la Tremella f. ricchi in rame (Cu); per questo motivo per ogni specie di fungo sarà variata la percentuale relativa dei singoli oligoelementi facenti parte dell'ammendante inorganico, pur mantenendo un quantitativo standard di sali rappresentato dal 1-3‰ del peso secco di substrato nel contenitore e comunque con la presenza sempre di tutti e quattro gli oligoelementi inorganici. In generale gli oligoelementi inorganici sono metalli o metalloidi che svolgono un ruolo fisiologico indispensabile alla vita, strutturale come nel caso di ormoni quali il cromo per l'insulina (Cr), lo iodio per la tiroxina, il ferro per l'emoglobina, o di varie proteine e vitamine, come il cobalto per la vitamina B12, associandosi ad una molecola partner organica di natura non enzimatica. Gli oligoelementi inorganici hanno anche un ruolo funzionale, come nel caso di Se, Zn, Ge, Cu, secondo la presente invenzione, poiché gli oligoelementi inorganici considerati entrano a far parte della molecola di un enzima o sono ad esso indispensabili per il suo funzionamento catalitico. Questo secondo aspetto è legato al ruolo terapeutico degli oligoelementi inorganici utilizzabili nella disciplina di medicina complementare denominata Oligoterapia. Le carenze enzimatiche oppure di oligoelementi inorganici, essendo rare nella popolazione sana con una dieta varia ed equilibrata, sono invece molto frequenti nella popolazione di malati cronici e neoplastici qui considerati per ovvie problematiche di assorbimento, e frequentemente implicate nella genesi o come complicanze di molte patologie a livello fenotipico/epidemiologico. La supplementazione o terapia con oligoelementi inorganici è indicata, anche in associazione con altre terapie, in malattie della pelle, del sistema gastrointestinale, respiratorio, cardiocircolatorio ed endocrino.

Se nel caso della luce pulsata sono gli impulsi luminosi che fanno produrre al fungo, analogamente a quanto si verifica nell'uomo, la vitamina D2 partendo dal proprio ergosterolo presente nella parete cellulare, attraverso la polvere d'uovo verrà fornita al substrato, facendo sempre attenzione a non superare

la quantità massima di azoto (N) consentita nel rapporto carbonio/azoto (C/N) tipica di ogni specie fungina, la cisteina. La cisteina, che è un amminoacido che rappresenta il metabolita intermedio nella produzione di ergotioneina, evita la produzione di un eccesso di radicali sulfidrilici pro-allergenici e tossici, che viceversa si potrebbe verificare con l'ordinaria via dell'istidina. Tutte le sostanze prodotte sono salutari e a dosi attive e di sicurezza, con l'unica controindicazione precauzionale da evitarsi in coloro che sono allergici alle proteine dell'uovo.

Sostanze

Ergotioneina: l'ergotioneina è il più strano aminoacido con una sostanziale efficacia da antiossidante. E' esclusivamente prodotto dai funghi dalla decarbossilazione dell'istidina e successivo passaggio in cisteina, e la sua capacità di agire da antiossidante deriva dal suo gruppo sulfidrilico che allorché ossidato si riduce rapidamente, a causa dell'unicità della struttura tautomerica con emivita di un mese, che passa velocemente da ossidata a ridotta in maniera non enzimatica. Questo permette il perdurare della capacità antiossidante (citoprotezione) fino ad un mese, al contrario degli altri antiossidanti naturali che durano al massimo pochi giorni, e soprattutto di preservare dallo stress ossidativo e dai conseguenziali danni il DNA mitocondriale in particolare delle cellule a basso o nullo indice replicativo, come quelle nervose. L'ergotioneina quindi apporta citoprotezione e stabilità cellulare, soprattutto nelle cellule che hanno la sua stessa emivita, come i globuli rossi nei quali è spesso trovato e per i disordini dei quali è stato proposto come terapia da Hartmen et al., 1988; preserva altri antiossidanti dell'organismo, come il glutathione, ossidandosi per loro; non è metabolizzato in nessun tessuto dei mammiferi ma nell'uomo sono stati individuati specifici trasportatori intracellulari. La presenza e l'azione dello zolfo nei gruppi SH assicura all'ergotioneina oltre alla proprietà antiossidante anche quella antinfiammatoria in quanto trofico e depurativo

del tessuto connettivo e del fegato, con stimolo del sistema immunitario. L'ergotioneina agisce quindi a livello preventivo nell'infiammazione cronica di basso grado, che si ritiene oggi la causa più importante delle malattie degenerative (neurodegenerative) e neoplastiche. Non esiste una dose giornaliera consigliata. E' presente in tutti i funghi, soprattutto i boleti, e la sua percentuale può essere incrementata attraverso l'utilizzo dell'ammendante polvere d'uovo in un rapporto del 1-3% del substrato secco di crescita.

Selenio (Se) organico: è assorbito al 90% a livello intestinale. Negli alimenti è presente in discrete quantità nella carne e nei frutti di mare, mentre per quanto riguarda i cereali ed i legumi, la presenza è soggetta a variazioni geografiche di una certa importanza. La quantità raccomandata va dai 60 ai 150 µg/die, con un quantitativo totale nel corpo umano di 21 mg distribuito prevalentemente nella milza, fegato, rene e cuore. Il selenio è importante nella prevenzione del tumore al polmone, alla prostata e alla pelle in quanto potente antiossidante. La dose giornaliera consigliata è di 55 µg/die, per donne in gravidanza 60 µg, mentre l'apporto massimo secondo il Ministero della Salute è di 83 µg/die. Una porzione di 84 g dovrebbe garantire un apporto di 40 a 50 µg per porzione.

La funzione principale del Se è quella di concorrere alla formazione dell'enzima glutathione perossidasi, il più potente antiossidante nel corpo umano, che si somma al glutathione. E' in grado di aumentare le capacità antiossidanti di vitamina C ed E. Attiva la formazione del coenzima Q 10, altro antiossidante che facilita il trasporto dell'ossigeno a livello cellulare. In ultima analisi il selenio esplica un'azione complessiva atta a proteggere la cellula in tutti i suoi componenti (mitocondrio, membrana e nucleo) preservando in particolare il collagene e il tessuto nervoso. E' capace di chelare, cioè rimuovere, i metalli tossici, e stimolare il sistema immunitario con aumento dei linfociti NK. E' essenziale per il funzionamento della tiroide.

Visti l'ampio spettro di attività e i processi di raffinazione e di processazione degli alimenti, spesso ci si trova in situazioni di relativa carenza che diventa carenza assoluta in caso di patologie gastrointestinali, come la semplice disbiosi, probabile motivo questo di molte patologie, ad esempio tiroidee, di cui spesso non si riesce a comprendere la causa. Gli epidemiologi, ben consci della problematica, hanno fatto autorizzare in Europa l'addizionamento di selenio in molti alimenti tra cui il sale.

Zinco (Zn) organico: lo zinco totale nel corpo umano è compreso tra 1,4 e 2,5 g. E' un potente stimolante del sistema immunitario e stabilizza il DNA.

La dose giornaliera consigliata negli uomini è circa 10 mg, nella donna 8 mg (in gravidanza 11 mg). L'apporto massimo secondo il Ministero della Salute è di 12,5 mg/die. E' molto rara la carenza in persone sane, mentre nei malati oncologici è presente negli stadi terminali e cachettici. Dovrebbe essere assicurata una dose attorno ai 5 mg per porzione (nel *Pleurotus o.* la dose media è 0,77 mg/porzione). Lo Zn è ubiquitario nel regno animale e vegetale, pertanto la sua carenza è rara, ma in alcune malattie si riscontra su basi genetiche e in patologie eredo-familiari; in tali casi provoca un deficit generale dell'attività enzimatica come della struttura proteica e del sistema endocrino in particolare asse ipofisi-gonadi come nelle sindromi adrenogenitali. Nei malati neoplastici cachettici può essere utile proprio in virtù delle sue azioni fisiologiche in quanto facente parte delle "zinc finger" che sono molecole di zinco raggruppate, a mo' di "cravatta", attorno al materiale proteico tra cui i muscoli, allo scopo di rendere più stabile la struttura, che in carenza espone la struttura stessa alla raddomolisi tipica della cachessia neoplastica. In collegamento con altri oligoelementi inorganici forma complessi catalitici attivi a livello dell'asse ipofiso-genitale e ipofiso-pancreatico e risulta indispensabile per la sintesi ed il funzionamento di numerosi enzimi. La quantità totale contenuta nel corpo umano è molto alta, raggiungendo 2.300 mg. L'apporto quotidiano nell'adulto deve essere

tra i 15 e 20 mg ed è presente nella carne ma soprattutto nelle noci, nelle ostriche e, in minor misura, nei cereali, nella frutta e nei funghi, e il suo contenuto varia a seconda della presenza della sostanza minerale nel terreno.

- 5 Germanio (Ge) organico: il germanio organico 132 (sesquiossido) agisce stimolando le cellule NK e linfociti citotossici impegnati nella risposta antitumorale, oltre ad aumentare la produzione di interferone gamma ed i linfociti T e B con azione immunomodulante. L'assunzione è libera, non essendoci una dose raccomandata; sono state usate dosi da 10 mg ogni 24
- 10 ore fino a 100 mg per kg di peso corporeo (in un uomo di 75 kg = 7500 mg al giorno). E' certo che la risposta immunitaria aumenta in modo direttamente proporzionale alla dose. Di solito si utilizzano da 50 a 250 mg al giorno, indipendentemente dal peso del paziente a seconda della gravità della malattia (dosaggio medio 50 mg di Ge-132). Tuttavia in bibliografia è
- 15 riportato (Mainwaring M.G., 2000 pubblicato su *Chest*) un caso di completa remissione di un carcinoma spinocellulare polmonare non operabile di quasi 5 cm di diametro, completamente regredito in una donna di 47 anni attraverso l'assunzione di 7 gr/die per tre mesi di Ge organico orale Ge-132 (sesquiossido) insieme a diverse altre segnalazioni meno "ufficiali" che
- 20 riportano risultati analoghi ad alte dosi contro il cancro delle vie aeree superiori (labbro, laringe, faringe, trachea e polmone). Ciò depone più per un'azione locale che immunomediata. A tal proposito il Prof. Asai, padre dell'utilizzo mondiale del germanio contro il cancro, ha evidenziato che il Ge, per la caratteristica chimica di legare ben otto molecole di ossigeno, è il più
- 25 potente antiossidante esistente in natura. Inoltre il Ge è anche il più pronto allo scambio laddove ci sia un eccesso di idrogenioni per la formazione di CO₂ come nelle vie aeree e perdipiù cancerose, quindi in anaerobiosi obbligata. Agevolato dal basso peso molecolare che gli permette una rapida diffusione e trasporto attraverso le membrane cellulari, il Ge penetra nella

cellula cancerosa causando un effetto di deidrogenazione immediato producendo così tanta acqua intracellulare da letteralmente annegare o "liquefare" il cancro, producendo lo "scoppio", la lisi della cellula. Questo fenomeno può rientrare nei fenomeni apoptotici. Questo effetto antitumorale si ottiene ad alti dosaggi come quelli indicati in precedenza, mentre dosaggi più bassi agiscono maggiormente nel favorire la risposta immunitaria, probabilmente sempre con un meccanismo antiossidante ma di basso grado. Essendo l'escrezione per via renale, le alte dosi sono da evitare nei pazienti con ridotta funzionalità renale.

I funghi, in particolare il *Ganoderma lucidum*, il *Phellinus linteus* e il *Lentinus edodes*, sono gli alimenti che, assieme all'aglio, contengono le maggiori quantità di Ge organico. Nei funghi citati, rispetto agli altri funghi secondo la presente invenzione, l'ammendante minerale inorganico sarà ovviamente sbilanciato a favore del Ge rispetto agli altri (Se, Cu, Zn).

Rame (Cu) organico: carenze di Cu sono quasi sempre collegabili all'anemia poiché è noto che il Cu interviene nella sintesi dell'emoglobina, per cui nei malati anemici, spesso per complicità della malattia neoplastica, non è sufficiente somministrare ferro, ma è necessario associare il Cu. Il rame è ancora più diffuso dello zinco negli alimenti sia di origine animale che vegetale, con il vantaggio di un fabbisogno quotidiano piuttosto scarso (2-5 mg) rispetto a quello di ben 4 volte superiore dello Zn. La carenza assoluta è quindi piuttosto rara. Ma una carenza relativa rispetto all'aumentato fabbisogno è invece piuttosto frequente, soprattutto nei malati anemici e immunocompromessi come quelli neoplastici. Infatti oltre che per l'emoglobina, il rame interviene a livello enzimatico nella produzione dei linfociti e di anticorpi, risultando un grande stimolatore delle difese organiche generiche antinfettive contro batteri e virus e di linfociti NK per quelle specifiche antitumorali. Stimola anche lo sviluppo e la mineralizzazione ossea. Nel corpo umano la quantità totale di rame è

relativamente scarsa (80 mg) ed è tutto impiegato in attività enzimatiche non essendovi quantità di riserva, e questo spiega la possibilità di carenze relative e temporanee con conseguenze non immediatamente evidenti come l'anemia e l'immunodeficienza. A tal proposito si evidenzia il ruolo dei funghi in generale come apportatori significativi tramite alimentazione di quantità di Cu substrato-correlate, ed in particolare di alcuni funghi come l'*Auricularia a.j.* o la *Tremella f.* che rappresentano veri "accumulatori" naturali di rame.

Vitamina D2 (ergocalciferolo): la vitamina D2 origina dallo sterolo dei funghi (ergosterolo), la vitamina D3 origina dal 7-deidrocolesterolo, un precursore del colesterolo, quando sintetizzato dalla pelle. I passi del metabolismo coinvolti nella vitamina D2 sono simili a quelli della vitamina D3. La vitamina D generica è in tutte e due le forme ma è biologicamente inerte, richiedendo due idrossilazioni obbligate (la prima nel fegato e la seconda nel rene) per formare l'ormone biologicamente attivo 1,25(OH)₂D. La funzione biologica più importante della vitamina D nell'uomo è quella di mantenere la concentrazione sierica di calcio e fosforo nei normali intervalli, implementando l'efficienza dell'intestino tenue ad assorbire questi minerali dalla dieta. Quando l'assunzione di calcio è scarsa, la coppia formata da 1,25(OH)₂D dal rene e PTH (paratormone) dalla tiroide, mobilizzano le riserve di calcio dalle ossa; in questo modo la vitamina D mantiene nel sangue il calcio e fosforo ad una concentrazione di supersaturazione che si deposita nelle ossa sotto forma di idrossiapatite. Molti tessuti e cellule dell'organismo riconoscono la 1,25(OH)₂D. Sfortunatamente l'esatta funzione fisiologica dell'1,25(OH)₂D in cervello, cuore, pancreas, cellule monocitiche, linfociti attivati, e pelle rimane sconosciuta, mentre la funzione biologica individuata è quella di potente ormone antiproliferativo e pro-differenziazione cellulare (Abe 1981, Smith 1987). E' universalmente acclarato che deficienze di vitamina D causino squilibri nell'assorbimento del calcio (rachitismo) e nel metabolismo delle ossa (osteoporosi). Per tali motivi

nel mondo da molti anni sono in atto campagne di fortificazione degli alimenti in vitamina D e calcio e programmi di screening e di informazione di massa sul ruolo dell'attività fisica e dell'esposizione solare. Specialmente nei paesi posti alle latitudini più alte, l'ipovitaminosi D è un'emergenza generalizzata, ma anche alle altre latitudini soprattutto negli anziani e nei malati cronici. La possibilità che la deficienza di vitamina D sia associata all'incremento del rischio di cancro alla prostata, al colon e alla mammella è stato suggerito in numerosi studi epidemiologici (Garland 1985, Schwartz 1990). Più recenti studi osservazionali sull'associazione di elevata incidenza di alcune malattie come quelle neurodegenerative del tipo della sclerosi multipla, ad esempio in una popolazione di militari statunitensi osservati per 12 anni, hanno correlato bassi livelli di vitamina D a diabete, depressione con attacchi di panico e infarto del miocardio. L'azione antiproliferativa e pro-differenziazione dell'1,25(OH)₂D sarebbe mediata dall'attivazione, con un meccanismo di regolazione della crescita cellulare Ca⁺⁺ dipendente, del recettore VDR posto nel nucleo delle cellule prevalentemente ad alto indice di replicazione come quelle ghiandolari, linfatiche, pelle etc. Diminuendo l'attività del recettore VDR, le cellule proliferano in maniera indifferenziata ed incontrollata. La vitamina D₂ è stata la prima a fortificare gli alimenti ed ha permesso agli USA di sconfiggere il rachitismo. Attualmente invece le industrie farmaceutiche propongono la vitamina D₃ di derivazione animale (lanolina). La vitamina D₃ ha alcune cautele d'uso dovute alla possibilità di causare la calcolosi per l'intensa azione sul metabolismo del calcio e l'aumento del colesterolo avendo in comune con l'uomo il nucleo sterolico. Per tali motivi l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomanda un'assunzione non superiore a 400 UI/die per patologie non comportanti osteoporosi. Tutto ciò non vale per la vitamina D₂, perché ha un'azione più lenta sulla calcemia non avendo vie di deposito nel grasso della pelle essendo immediatamente idrossilata nel fegato, e circola nel torrente

ematico in forma non attiva mentre viene nuovamente idrossilata a 1,25(OH)₂D nel rene dove l'emivita è talmente rapida (4-6 ore) che l'eventuale eccesso è escreto nelle urine. Il nucleo sterolico, facente parte dei fitosteroli, ha invece un'azione di sequestrazione e sostituzione nella bile del colesterolo in eccesso aumentandone l'escrezione e impedendo la formazione di calcoli. In sostanza il vantaggio della vitamina D₂ è il circolo enteroepatico con i meccanismi di feedback dei livelli indipendenti dalla quantità depositata autoprodotta dall'uomo. Tutto ciò permette di superare ampiamente i limiti di 400 UI/die di vitamina D dell'OMS, in perfetta sicurezza e con l'obiettivo di arrivare ai livelli di saturazione dei recettori VDR di 1,25(OH)₂D, nei soggetti a rischio e ammalati di malattie degenerative e neoplastiche consigliati da vari autori di 2000 UI/die di vitamina D₂. Tale obiettivo si raggiunge facilmente nei funghi officinali secondo l'invenzione con una porzione giornaliera che varia da 80-100 g di fresco a 10-20 g di secco, trattati con lampada a luce pulsata.

Azioni e proprietà degli ammendanti

Capacità antiossidanti: Se, ergotioneina, Ge

Capacità citotossiche locali: Ge

Capacità antiossidante-antinfiammatorie: ergotioneina

Immunostimolante: ergotioneina, Se, Ge, Z, Cu

Antiproliferative/Pro-differenzianti: vitamina D₂

Capacità citoprotettive: ergotioneina

Anti anemico: Cu

Anticachettico: Zn

Anti cancro vie aeree: Ge

Pro funzione tiroide: Se

Prevenzione cancro: Se, Vit D₂, Zn

Antineurodegenerazione: ergotioneina

Antibatterico/Antivirale: Cu

Malattie della pelle: ergotioneina, Se, Zn, Vit D2

Razionale terapeutico del complesso degli ammendanti

Tutte le malattie degenerative iniziano dall'ossidazione cellulare, allorquando non viene controllata dagli svariati sistemi antiossidanti dell'organismo. Gli antiossidanti contenuti negli alimenti, anche se assunti in quantità sufficienti a ricaricare tali sistemi, come ad esempio quello del glutathione, non riescono a contrastare questa azione per la loro breve emivita da poche ore a qualche giorno, spesso insufficiente a riparare i sistemi enzimatici danneggiati in particolare negli organi fortemente stressati e intossicati come quelli di un malato cronico. Esiste un'unica sostanza naturale contenuta in tutti i funghi la cui azione persiste per oltre 30 giorni e che si ossida al posto di altri sistemi antiossidanti cellulari, risparmiandoli, un amminoacido tipicamente fungino: l'ergotioneina.

Tale sostanza, il migliore antiossidante naturale esistente perché persistente, viene prodotto dalla polvere d'uovo, e rappresenta la partenza, la prevenzione primaria nell'agire sulla struttura cellulare migliorandone le performance (INPUT), su cui si innestano tutte le azioni antiossidanti e antinfiammatorie delle altre sostanze ammendate, soprattutto gli oligoelementi inorganici, implementando non solo l'azione specifica dei singoli oligoelementi inorganici sui rispettivi organi/funzioni, ma anche favorendo le funzioni fisiologiche generali dell'organismo con valenza sulla risposta immunitaria. L'altro caposaldo, che completa quello dell'ergotioneina e degli oligoelementi inorganici, è rappresentato dalla vitamina D2 che viene implementata attraverso la luce pulsata che agisce, alla dose giornaliera di 2000 UI nelle malattie neoplastico/degenerative, attraverso la sua capacità antiproliferativa/pro-differenziazione cellulare, sul prodotto finale cellulare (OUTPUT), ottimizzandone il ciclo vitale nello stabilizzare il DNA. Non si deve dimenticare che con la luce pulsata viene stimolata la produzione anche di

ergosterolo (il cui nucleo sterolico compone la struttura della vitamina D2), dotato anch'esso di capacità antitumorali come citato in letteratura.

Pertanto, con i funghi officinali secondo la presente invenzione, si ha un alimento unico capace di agire dall'inizio alla fine grazie alle capacità
5 antiossidanti, antinfiammatorie, antiproliferative/pro-differenziazione cellulare, stabilizzanti il DNA cellulare e immunomodulanti, contro la trasformazione neoplastico/degenerativa della cellula, che implementa le già riconosciute capacità antitumorali/antidegenerative dei vari ceppi di funghi considerati dovute, in maggior misura, ai polisaccaridi (alfa e beta-glucani) e
10 glicoproteine della struttura cellulare fungina.

Razionale della metodologia dell'invenzione

Il metodo si sostanzia nell'azione fisica di un'apparecchiatura a solenoide che produce campi elettromagnetici (CEM) a potenza variabile con un'azione in determinati momenti della crescita fungina definiti con lo scopo di consentire
15 un incremento del numero dei carpofori, un aumento di massa secca e umidità, una riduzione dei tempi di produzione con ottimale organizzazione degli oligoelementi inorganici, un miglioramento del metabolismo del substrato e della qualità finale dei funghi.

Il metodo si sostanzia nell'azione fisica di un'apparecchiatura a lampada a luce pulsata che espone i funghi appena raccolti a impulsi luminosi con lo
20 scopo di stimolare la produzione di vitamina D2 dall'ergosterolo fungino, tale da raggiungere 2000 UI per dose giornaliera raccomandata nelle malattie neoplastico-degenerative.

Il metodo si sostanzia nell'azione metabolica dei funghi su substrati arricchiti di polvere d'uovo con lo scopo di metabolizzare il precursore amminoacido
25 cisteina nell'amminoacido fungino ergotioneina, per stimolare nell'uomo i meccanismi di detossificazione ed antiossidanti-antinfiammatori cellulari.

Il metodo si sostanzia nell'azione organicante dei funghi su substrati arricchiti di oligoelementi inorganici (Se, Ge, Cu, Zn) sotto forma di sali con

lo scopo di esaltare le proprietà anti-ossidanti, antidegenerative e antitumorali fungine, in quanto gli oligoelementi fanno parte di numerosi complessi enzimatico-vitaminici e di stimolare il sistema immunitario contro i tumori e altre malattie cronico-degenerative.

5 **Breve descrizione delle figure**

Ulteriori caratteristiche e vantaggi della presente invenzione appariranno maggiormente chiari dalla descrizione indicativa, e pertanto non limitativa, di forme di esecuzione dell'invenzione coll'utilizzo di un contenitore, come illustrato negli uniti disegni in cui:

- 10 - la figura 1 è una vista laterale di un contenitore secondo l'invenzione;
- la figura 2 è una sezione longitudinale del contenitore della figura 1; e
- la figura 3 è una vista assonometrica del contenitore della figura 1.

Descrizione di forme di esecuzione dell'invenzione

Secondo l'invenzione si è individuata una categoria di alimenti con proprietà
15 antitumorali e antidegenerative sia a livello preventivo che di supporto o integrazione alimentari per la popolazione a rischio di ammalarsi per motivi di familiarità e genetici, o già ammalata, o a rischio di recidiva.

Tali alimenti sono funghi coltivati di cui già si conoscono alcune proprietà contrastanti le malattie neoplastiche e degenerative e di stimolo del sistema
20 immunitario. Tali funghi diventano funzionali, cioè amplificano le loro proprietà antitumorali e quelle di sostegno all'organismo malato, grazie alla capacità tipicamente fungina, di biosintetizzare nuovi composti partendo da precursori o di organizzare, cioè rendere biodisponibili, sostanze minerali, metalli, terre rare, che sono stati aggiunti al substrato di crescita. Per la
25 metodica di standardizzazione e la tecnologia utilizzata, tali funghi subiscono modifiche migliorative delle loro capacità salutistiche come alimenti, a tal punto che possono denominarsi officinali. Infatti, in analogia con le piante officinali della farmacopea, subiscono trasformazioni a "quasi farmaco" non in un'officina farmaceutica ove si estrae un principio attivo, ma nelle serre

tecnologiche e secondo la propria fisiologia di crescita. Tale trasformazione non altera la natura del prodotto di partenza, vale a dire il fungo, ma ne amplia l'efficacia di utilizzo nella popolazione individuata, provvedendo a fornire un prodotto standardizzato, bioattivo, sicuro ed efficace, oltre che

5 buono e nutriente.

La coltivazione può godere della modularità dal momento che viene fatta in singoli contenitori come le bottiglie, poste in serre tecnologicamente avanzate, che possono essere ottenute da container riadattati, dotati di impianto di climatizzazione automatizzato, gestito da software dedicato a

10 garanzia del rispetto del processo produttivo.

Il processo produttivo, basato, oltre che su tecnologie automatizzate gestite da software, su strumenti come le bottiglie descritte nel seguito, consente la produzione di funghi diversi con caratteristiche di standardizzazione e monitoraggio dei principi attivi ammendati.

I funghi sono utili non solo ad integrazione della dieta per tali categorie di malati, ma sono favoriti nell'assorbimento attraverso l'integrazione di vitamina C e di vitamina E, e in pazienti gravemente malati, possono essere assunti anche come integratori sotto forma di estratti in capsule o polvere, che amplificano enormemente le potenzialità terapeutiche.

15

In particolare l'invenzione fornisce insegnamenti sui componenti utilizzati per la preparazione del compost che possono essere: paglia di grano da sola o miscelata a residui della lavorazione del legno, potature, crusca, segatura ecc.; è importante aggiungere al compost il carbonato di calcio nella proporzione dal 3 al 5% per ottenere il pH di crescita ottimale per la specie

20 da coltivare. Il micelio generalmente allevato su semi di graminacee necessita di un foro nel substrato solido per l'inseminazione. Quando invece il micelio è allevato allo stato liquido, è possibile iniettarlo nel compost mediante l'uso di una siringa oppure di una pistola. Nel compost dentro il

25 contenitore è possibile aggiungere, in un secondo tempo, una miscela di

oligoelementi e di sali nel garantire il mantenimento del pH ottimale che permette una notevole semplificazione della metodica dando, in partenza, una quantità dosata di oligoelementi minerali che verranno gradatamente assorbiti dal micelio con la crescita in bottiglie di polipropilene secondo l'invenzione, eliminando così in partenza problematiche di alterazione del pH del substrato dovuto all'irrigazione con l'ammendante. Per tornare al substrato, che varierà a seconda della specie fungina, verrà scelto quello più adatto, come insegnato da Tan et al., 2005, per esempio fatto di segatura al 72-73%, crusca 23-25%, gesso 1%, superfosfato di calcio 1%, con l'aggiunta degli ammendanti secondo la presente invenzione. In ogni caso i componenti lunghi devono esser trinciati in porzioni di 2-3 cm, quindi miscelati e rimanere inumiditi al 70% in apposite attrezzature note come carro miscelatore. Il substrato comunque preparato è sottoposto a trattamenti noti con calore in autoclave a 110-120°C per 1-2 ore o in forno a pressione atmosferica per diverse ore a seconda del livello di temperatura raggiunto, per es. 98°C, e del volume delle confezioni.

Per quanto riguarda il contenitore di produzione, esso rappresenta una parte rilevante. Come indicato anche da Rodriguez-Estrada e Royse, 2005, si tratta di una bottiglia in polipropilene, preferibilmente, da 1 L, con collo corto e apertura ampia per consentire lo sviluppo dei funghi. Secondo l'invenzione, rispetto a quanto proposto da Rodriguez-Estrada, le bottiglie, come mostrato nelle figure 1 a 3, hanno due bocche 1 e 2, opposte, una superiore ed una inferiore, chiuse con relativi tappi 3 e 4. Ogni bottiglia è dotata di un raccordo 5, 6 richiudibile in prossimità di ogni bocca. I raccordi 5, 6 sono utilizzati in una posizione della bottiglia e nella sua posizione capovolta. Questa forma costruttiva permette al fungo di incorporare la quantità di ammendante proporzionale alle proprie capacità, senza eventuali impedimenti alla crescita, e consente all'operatore di monitorare e modificare la quantità per la migliore crescita ed il miglior rapporto di

assorbimento in relazione all'umidità del compost e alla frequenza di irrigazione. L'altra caratteristica della bottiglia è correlata alla successiva fase di incubazione dove sarà necessario far crescere il micelio e irrigare la bottiglia ma dal basso quando saranno capovolte. Si supponga di dividere idealmente la bottiglia in due parti mediante una sezione verticale centrale, una arricchita con gli oligoelementi, e l'altra dove è presente il micelio. Nella parte con gli oligoelementi, e quindi arricchita in minerali, il raccordo richiudibile può essere collegato mediante un tubicino ad una rete di irrigazione automatizzata. In questo modo, al momento dell'irrigazione, dalla parte arricchita con gli oligoelementi arriva all'altra parte dove è presente il micelio in acqua con ammendante minerale nelle dosi e nei tempi dettati dal grado di solubilità che così diventa monitorabile.

Qualora non sia disponibile il micelio su supporto liquido ma su semi di graminacee, la semina dovrà essere effettuata tramite attrezzatura a forma di pistola a canna lunga. Quest'ultima, inserita nella confezione e mediante un forte flusso di aria sterile, consente di sparare il micelio in grani, raccolto in un contenitore, all'interno della metà del substrato di crescita che è convenzionalmente nella parte sinistra della bottiglia. Successivamente e per evitare interferenze con lo sviluppo del micelio, con la stessa pistola, o con siringa se liquido, verrà inserito nella parte destra il composto metallico o di minerali che fornirà gli oligoelementi. In entrambi i casi il foro di introduzione del micelio/oligoelementi è poi chiuso con feltro filtrante o con etichetta adesiva. Le bottiglie sono riempite con circa 2/3 di compost. Le bottiglie seminate e chiuse con un tappo filtrante, sono poi incubate in un ambiente buio e in appositi locali, scrupolosamente puliti, e ad una temperatura variabile nel tempo a secondo della specie fungina.

Razionale dei funghi prodotti dall'invenzione

Nel seguito sono presi in esame venti specie di funghi che si sono dimostrate efficaci per l'applicazione del metodo secondo la presente invenzione e con

già presenti scientificamente rilevate capacità antineoplastico-antidegenerative. Sono venti: *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* "Shiitake", *Flammulina velutipes*, *Morchella conica* Parsons, *Auricularia auricula-judae* (L.:Fr.) Schroeter, *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., *Tremella fuciformis* Berk. Brand, *Agrocybe aegerita*, *Pholiota nameko*, *Hypsizygus tessulatus* (Bull.) Singer, *Hypsizygus ulmarius*, *Grifola frondosa* "Maitake", *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, *Hericium erinaceus*, *Poria cocos*.

***Pleurotus eryngii* off.**

Ci si soffermerà particolarmente su questo fungo poiché il metodo di coltivazione in serra su contenitori di polipropilene è partito proprio dal *P. eryngii* (Rodriguez-Estrada e Royse, 2005). Il genere *Pleurotus*, abbreviato nel seguito con *P.*, che comprende funghi edibili dalle pregevoli proprietà organolettiche e comunemente coltivati, presenta qualità nutrizionali e funzionali di notevole interesse. In particolare, il *Pleurotus eryngii* possiede un elevato contenuto in carboidrati, proteine e fibre alimentari, oltre ad un basso contenuto lipidico. Sono presenti tutti gli amminoacidi essenziali con prevalenza del glutammato, aspartato e arginina, mentre l'amminoacido limitante è la leucina. Zuccheri solubili quali il galattosio, sorbitolo e maltosio sono rintracciabili in quantità limitate. Il contenuto in sodio risulta particolarmente ridotto. Secondo quanto riportato in letteratura, sono presenti inoltre concentrazioni significative di vitamine (C, A, B2, B1, D e niacina). Come tutti i funghi commestibili, l'elevato quantitativo di fibre e steroli, oltre al basso contenuto lipidico, sodico e calorico, ne fanno un alimento strategico nella prevenzione della patologia cardiovascolare. Sono state dimostrate proprietà ipocolesterolemizzanti e ipoglicemizzanti. L'elevata quantità e varietà di fibre presenti possono contribuire alla eubiosi intestinale. Le proteine contenute nel fungo hanno un buon valore biologico e hanno un più alto quantitativo proteico (1,21 g / 100 g del peso fresco)

rispetto a *P. ostreatus*, *Lentinus edodes* e *Flammulina velutipes*. La composizione minerale dimostra un buon contenuto medio: risulta particolarmente concentrato e presente zinco (89,3 µg/g) , rame (22 µg/g), ferro (29,3 µg/g), sodio (240 µg/g) (Rodriguez Estrada a.e., 2007) etc.

5 Tuttavia, la vitamina D2 è quasi del tutto assente così come il selenio, ma in questo caso subentra la capacità del metodo secondo la presente invenzione. Infatti già l'assorbimento in natura di ioni metallici nei funghi varia in funzione della specie e dell'ecosistema in cui avviene lo sviluppo, in particolare in base alla sostanza acida e organica presente nel terreno (Gast

10 C. J. , 1988). Come si vedrà più avanti, miceli provenienti da ceppi di diversa origine sono in grado di assorbire da un mezzo liquido sintetico arricchito da diverse fonti inorganiche di selenio (Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 o SeO_2) a diverse concentrazioni (Baeza A., 2000, 2002, Stajic M., 2006) nonché di accumulare, più di ogni altro fungo tra quelli esaminati, concentrazioni

15 elevate di piombo nei basidiomi (Dogan HH, 2006) suggerendo la possibilità per il *P. eryngii*, di essere, oltre che un'ottima fonte alimentare di micronutrienti, anche un efficiente indicatore di inquinamento ambientale. Per quanto riguarda le proprietà farmacologiche, l'attività ipocolesterolemizzante è dovuta alla mevinolina (lovastatina), inibitore

20 dell'HMG-CoA reduttasi che ha buoni valori, da 120,9 mg a 150 mg per kg di peso secco nel corpo fruttifero (Chen SY, 2012). Il lavoro di Mizutani del 2008, è stato uno dei pochi lavori sull'uomo per valutare la riduzione dell'ipertrigliceridemia post-prandiale in due gruppi di giapponesi (29 persone) alimentati con un pasto ricco in grassi (40 g) ma, in uno dei due,

25 supplementato con *P. eryngii*, per non parlare degli effetti ipoglicemizzanti (De Silva DD, 2012; Chen J., 2009; Kim JI, 2010). Le fibre, sotto forma di polisaccaridi (beta-glucani), sia insolubili che solubili, come pre- e pro-biotici, contribuiscono all'eubiosi del microbiota intestinale (Synytsya A., 2009; Cheung PCK, 1998; Manzi P., 2000) fondamentali anche per la risposta

immunitaria. Una conformazione terziaria ad elica dei beta (1-3) glucani è ritenuta importante per la loro attività immunostimolante (Maeda YY, 1988) soprattutto contro i tumori. Ad esempio, i derivati di pleurano, un beta glucano isolato da varie specie di *Pleurotus*, hanno mostrato proprietà immunomodulatorie e antitumorali (Karacsonyi S., 1994; Paulik S., 1996; Rop O., 2009). Beta glucani altamente ramificati di *Pleurotus tuber-regium* e loro derivati solforati hanno mostrato potente attività antitumorale in vivo e in vitro (Tao Y., 2006). Alcuni alfa-glucani, isolati da micelio del fungo *P. ostreatus*, sono stati in grado di inibire la proliferazione di cellule tumorali del colon, attraverso l'induzione dell'apoptosi (Lavi I., 2006). Un estratto cloroformico di *P. eryngii* ha mostrato effetti inibitori su DNA topoisomerasi di mammifero; purificato e identificato come Ubichinone-9 è in grado di inibire, inducendo l'apoptosi, le cellule leucemiche U937 ma non i fibroblasti normali (Bae JS, 2009). Per quanto concerne le proprietà antinfiammatorie, un estratto di *P. eryngii*, si è dimostrato in grado di sopprimere in maniera significativa la degranulazione e il rilascio di istamina da parte delle mastcellule, nonché il rilascio e la sintesi di IL-4, che è una citochina capace di indurre la sintesi di IgE e lo sviluppo delle mastcellule, e le proteine di segnale attive nella risposta allergica, agendo sui meccanismi di segnale mediati da fattori di trascrizione NFAT, NF-kB, AP1 e recettore FcεRI (Nabeshima Y., 2005; Han EH, 2011; Jedinak A., 2011). Un estratto di *P. Eryngii* è stato impiegato con successo nel trattamento della dermatite atopica sperimentale su modello animale indotta da DNCB: l'azione inibitoria sull'allergia da contatto sembra avvenire attraverso la modulazione della risposta Th1/Th2 e tramite la riduzione dell'infiltrato infiammatorio nelle lesioni cutanee (Choi JH, 2013). Nel 2001 Wang et al. descrivono un composto molecolare di massa 11,5 Kda cui danno nome di Pleureryn con attività proteasica, in grado di esercitare effetti inibitori sulla sintesi proteica come sulla trascrittasi inversa del virus HIV-1. Gli stessi autori isolano un

peptide ad attività antimicotica di massa molecolare di 10 kDa a cui danno il nome di Eryngin ed una ribonucleasi termostabile, con massa molecolare di 10 kDa ad attività antivirale, immunomodulatoria e antineoplastica (Wang H., 2001, 2004.). Il *P. eryngii* potrebbe avere un ruolo importante nel metabolismo osseo: un composto estratto da basidiomi di *P. eryngii* ha aumentato l'attività della fosfatasi alcalina degli osteoblasti con aumento dell'espressione genica e della secrezione di osteoprotegerina e diminuzione delle aree di riassorbimento osseo (Kim SW, 2006). Dai basidiomi Ngai e Ng (2006) hanno isolato anche un'emolisina detta Eryngeolysin, monometrica, di massa 17 kDa, che mostra citotossicità nei confronti delle cellule leucemiche e attività antibatterica contro *Bacillus spp*, senza effetti antimicotici (Ngai PHK, 2006). In conclusione il potenziale antivirale di *P. eryngii* viene attribuito all'anticorpo xb68Ab (Fu M., 2003). Pertanto l'azione del *Pleurotus eryngii* è potente e variegata: agisce dal diabete all'ipercolesterolemia, sull'apparato cardiovascolare e sul metabolismo, ma, ciò che è più interessante e che può essere potenziato con il metodo dei funghi officinali secondo la presente invenzione, è l'attività immunomodulatoria e antivirale-antineoplastica, in particolare l'attività di stimolo all'apoptosi delle cellule leucemiche e dell'adenocarcinoma del colon.

Il metodo di produzione di funghi officinali è applicato in particolare al *Pleurotus eryngii*. Il prodotto ottenuto con il metodo secondo la presente invenzione verrà denominato *Pleurotus eryngii officinalis*, in termine abbreviato con *off*. Particolare attenzione va al substrato, un po' diverso rispetto agli altri *Pleurotus*, fatto maturare e sterilizzato a parte, costituito da paglia e residui legnosi, con aggiunta di segatura e mescolato in appositi miscelatori con carbonato di calcio, addizionato per il 5-10% con farina di semi di cotone allo scopo di stimolare il micelio (Uppadhyay, 1991). Il pH va mantenuto fra valori di 4,5 e 6. La bottiglia va riempita per la metà invece dei consueti 2/3 e subito dopo avviene la semina del micelio sul substrato e

dell'ammendante (Se, Ge, Cu, Zn in parti uguali al 1-2‰ del peso secco del substrato e sotto l'influenza dei CEM a bassa potenza - 10-20 mT per 10 min/die); per i primi venti giorni la temperatura è mantenuta a 18°C per poi essere elevata a 23°C nei quindici giorni successivi. Nel corso dell'incubazione l'umidità relativa è tra il 60 e 70% e la concentrazione di CO₂ è non superiore a 3.000 ppm. Al termine, da ogni bottiglia, è asportata meccanicamente la parte alta, e quindi più vecchia, del substrato per circa 1-2 cm. Per mantenere una corretta umidità alla superficie del composto e per favorire la formazione dei primordi, le bottiglie possono essere coperte oppure capovolte. Durante l'incubazione il micelio invade progressivamente il substrato, sino a permearlo fittamente, in forma di muffa che, in massa, è di colore bianco.

Quindi dopo un tempo di incubazione del *Pleurotus eryngii* di 35 giorni (nell'*off.* diminuisce di 1/3 grazie ai CEM), le bottiglie sono trasferite nelle stanze di coltivazione dove, previo riempimento con terriccio fino ad arrivare ai 2/3 consueti della bottiglia, sono tenute per 7-10 giorni ad una temperatura di 14-15°C con una umidità relativa di 80-90% e con una concentrazione di CO₂ inferiore a 2.000 ppm ed un'illuminazione di 50-200 lux. Allorché iniziano, sulla superficie del substrato, a differenziarsi i primordi, le bottiglie sono raddrizzate e le condizioni ambientali regolate a valori di 16-18°C di temperatura, a 75-90% di umidità relativa, a meno di 1.000 ppm di CO₂ e con un'intensità luminosa di 50-500 lux, e i CEM ad alta intensità (100 mT) per 5 minuti al giorno. Dopo circa 10-13 giorni i carpofori sono pronti per essere raccolti (diminuisce di 1/3 negli *off.*) e subito dopo sottoposti a trattamento tramite LP prolungato per ottenere 2.000 UI/die per porzione di fresco. La produzione è rappresentata da una sola volata. Il rendimento biologico, cioè il rapporto in peso fra funghi freschi e substrato secco, è superiore al 70%. La trasformazione in officinale del *P. eryngii* ha come obiettivo di implementare le già notevoli capacità antitumorali e antiossidanti

migliorando il tenore di vitamina D2 e di selenio carenti nel fungo di partenza, nell'ottica soprattutto preventiva. Viste le altre patologie di natura cronico degenerativa per le quali è indicato e la particolare gradevolezza e digeribilità come fungo edibile, il *P. eryngii* off. può essere indicato nell'assunzione di una porzione quotidiana di fresco, per tutta la popolazione, in particolare anziani e soggetti affetti da patologie cronicodegenerative e soprattutto nei soggetti già ammalati e a rischio recidiva o a rischio eredo-familiare di ammalare di cancro.

***Pleurotus ostreatus* off.**

Rappresenta il basidiomicete maggiormente coltivato al mondo e tra i più apprezzati per il gusto e consistenza. Le ricerche hanno dimostrato che molti altri tipi di funghi del genere *Pleurotus* hanno più o meno le stesse azioni, anche se la capacità di crescere in condizioni ambientali diverse e con diversi tipi di substrati che il *Pleurotus ostreatus* (*P. o.*) ha dimostrato di saper metabolizzare, ne fanno il fungo del genere *Pleurotus* con le maggiori potenzialità di trasformazioni benefiche attraverso il metodo dei funghi officinali. Dal punto di vista nutrizionale il *P.o.* contiene (in peso secco): proteine 10-30%, vitamina C 30-144 mg/100 g, niacina 109 mg/100 g, acido folico 65 mg/100g, elevata quantità di potassio, 306 mg/100 g. In particolare, del *Pleurotus ostreatus* viene sfruttata l'azione ipocolesterolemizzante dovuta ad una molecola dal comportamento simile alla Lovastatina (Gunde-Cimerman et al. 1993- 1995). In comune con il *Pleurotus eryngii* vi è la capacità di stimolare il sistema immunitario ed una notevole attività antitumorale. Da una proteina ed un polisaccaride è stata riscontrata la capacità di inibire lo sviluppo del sarcoma 180 induttore di tumori murini e di agire contro il tumore alla prostata dell'uomo (Zhuang et al., 1993; Zhang et al. 1994; Gu e Sivam, 2006). Gli studi sono stati eseguiti in animali di laboratorio su linee cellulari tumorali, anche se mancano riferimenti di studi clinici sull'uomo. Pertanto l'azione del *Pleurotus ostreatus*

off. sui tumori è generale sul sistema immunitario e, in particolare, può esserlo sul carcinoma alla prostata.

La metodica di coltivazione del *Pleurotus ostreatus off.* è molto più semplice di quella del *Pleurotus eryngii* prima menzionata, con alcuni accorgimenti come ad esempio la temperatura che durante l'incubazione deve essere mantenuta a valori prossimi a 30°C portata fino ai 25°C ai 35 giorni, essendo un fungo che cresce bene anche a basse temperature. Durante la produzione, il substrato deve avere un contenuto di umidità di circa 70-75% con umidità dell'aria attorno a 95-98%, ad una temperatura ottimale dei carpofori di 14-16°C. La produzione avviene in varie riprese o volate (2-3) intervallate da 10-20 giorni, esaurendosi nel giro di 60 giorni; nella produzione in bottiglia c'è una sola volata ma con i CEM è più veloce. La matrice del substrato deve essere ricca di cellulosa e lignina ed è un substrato povero con un rapporto C/N di 500. Possono essere utilizzati tutti gli elementi citati in precedenza (paglia finemente tritata, segatura, crusca etc) ma vanno aggiunti nella specificità del fungo additivi come nitrato di ammonio (2-3%), farina di soia (10%) e farina d'erba medica (10%), con un contenuto di azoto tra 0,8 e 1,5% interamente dato dalla polvere d'uovo. Al fine di ottenere un corretto pH alla massa viene miscelato 5-10% di carbonato di calcio con un pH ottimale di crescita che dovrà essere tra 6 e 6,5. Secondo l'invenzione il substrato viene arricchito di polvere d'uovo al 2-3% in contemporanea all'erogazione dei CEM a bassa potenza. I sali vengono inseriti nella bottiglia 2-3 giorni dopo la semina del micelio e l'inizio dell'incubazione e, vista la scarsa specificità di assorbimento di un singolo oligoelemento, l'ammendante minerale viene somministrato secondo la proporzione del 1-2‰ di massa secca con una percentuale equivalente di ognuno (Se, Ge, Cu, Zn) del 25%. Il processo produttivo segue la procedure standard (con l'esclusione dell'aggiunta di terriccio del *P.e.*) ivi compresa l'esposizione ai CEM ad alta potenza e la luce pulsata post-raccolta.

Partendo da un condizione di alta percentuale di vitamina C contenuta nel fungo, con la trasformazione in officinale si cerca di sfruttare con gli oligoelementi l'effetto sinergico antiossidante e stimolante l'immunità, ampliando a molte patologie degenerative l'uso analogamente a quanto già detto per il *P. e.* ma in più, considerato il buon dosaggio, senza la necessità di assumere integrazione di vitamina C (che lo rende ancora più antitumorale come complesso fitofungino) e con la consueta digeribilità e gradevolezza che lo rendono il fungo officinale da consumare anche in grande quantità da tutti e in tutti i giorni.

***Lentinus edodes* off.**

Il *Lentinus edodes* (Shiitake) rappresenta il fungo maggiormente utilizzato nelle medicina per i malati di cancro. Il polisaccaride lentinano è il più famoso ed utilizzato, anche in forma farmaceutica, dei composti con attività di modulazione di risposta biologica (BRM). Questo glucano è uno dei componenti della parete fungina e viene estratto sia dai corpi fruttiferi, con resa maggiore, che dal micelio. Il lentinano è un polisaccaride ad alto peso molecolare composto da monomeri di glucosio legati tra loro attraverso legami glucosidici Beta 1-3 e con la presenza di ramificazioni laterali B 1,6 ogni 5 residui lineari (Aoki, 1984). È estratto in acqua calda (90-95°C) per 12 ore e poi purificato. Il lentinano è in grado di ripristinare o aumentare la capacità del sistema immunitario dell'ospite, di rispondere a linfocine e citochine stimolando la proliferazione, il differenziamento e la maturazione dei linfociti come B e T e NK contro patogeni virali o tumori (Chihara, 1990). Gli estratti acquosi di *L. edodes* sono in grado di contrastare la proliferazione delle cellule di sarcoma 180 in vitro e anche in vivo (Chihara et al. 1969, Wasser e Weiss 1999 etc). Suga e coll. (1984) hanno dimostrato la capacità del lentinano di prevenire l'oncogenesi e inibire la formazione di metastasi (Suga et al., 1989). La somministrazione di lentinano induce anche il rilascio di composti attivi da parte delle cellule ospiti come il fattore di dilatazione

vascolare (VDHF), interleuchina 3 (IL-3) insieme ad altre IL ed il fattore stimolante la crescita cellulare (CSF). Queste molecole possono interagire con linfociti ed altre cellule per stimolare la risposta infiammatoria e immunitaria (Maeda et al., 1984). Mizuno e coll. nel 1995 hanno dimostrato in vivo il legame con linfociti T B e NK. I macrofagi attivati dal lentinano producono minori quantità di prostaglandine IL-10 e IL-6 mentre i linfociti T CD4 aumentano la produzione del fattore IFN e diminuiscono IL-4. Inoltre è stimolata dai macrofagi la produzione di ossido nitroso (NO). La somministrazione orale in vivo del lentinano ha indotto nei topi di laboratorio una forte attività antitumorale, dovuta all'aumento del livello di diverse linfocine (Yap e Ng, 2003). Altri studi indicano che il lentinano non solo è utile nella cura dei tumori associato alle cure tradizionali (CHT), ma protegge anche i cromosomi dal danno provocato dai chemioterapici (Hasegawa et al., 1989) o dalle micotossine (Ricordy et al., 2004). Dai carpofori è stato estratto un altro polisaccaride, L-II, un D-glucopiranosio, che stimola il sistema immunitario analogamente al lentinano (Zheng et al., 2005). Dall'estrazione in acqua del solo micelio si ottengono miscele di polisaccaridi detti LEM che possiedono attività antitumorali, immunostimolanti e antivirali (Wasser e Weiss, 1999). Uno dei componenti dei LEM, detto EP-3, possiede una struttura simile alla lignina (unica molecola del gruppo individuata in un fungo) in grado di inibire in vitro la replicazione di molti virus, compreso l'HIV (Jones, 1995). Nel micelio sono stati individuati composti antiossidanti come la tioprolina un amminoacido disattivatore di radicali nitrito che formano le nitrosamine come altri estratti che inibiscono le aflatossine e le micotossine implicate nello sviluppo di alcuni tumori (Fanelli et al., 2000, Ricelli et al. 2002, Reverberi et al., 2005). Contiene una buona quantità di ergosterolo e di vitamina D2 e l'amminoacido eritadenina che aumenta il metabolismo del colesterolo convertendo le LDL in HDL. Nella medicina popolare è suggerito il consumo di una tazza piccola al giorno di un estratto

strizzato in acqua fredda per una notte (10 carpofori freschi o 10 gr di secchi in 600 cc di acqua). In considerazione già della forte azione immunostimolante dovuta al lentinano, la forma officinale *Lentinus edodes* off. avrà un'azione ancora più accentuata di stimolo sul sistema immunitario, consigliandone l'uso come immunoadiuvante alla chemioterapia, come già viene utilizzato in Giappone, e/o in stadi avanzati tumorali e neoplasie che coinvolgono il sistema immunitario come linfomi e leucemie.

La composizione dello Shiitake è caratterizzata da un ridotto contenuto di sostanza secca, un valore medio di proteine e un basso contenuto degli altri elementi che fanno parte della sostanza secca se confrontato con *P. eryngii*. Nella frazione proteica sono presenti i principali amminoacidi quali acido glutammico, acido aspartico, alanina, leucina e serina. Nella composizione media la percentuale di sostanza secca è 7,66%, proteine 21,73%, grassi 1,66%, fibra 6,12%, ceneri 7,41%; il contenuto di chitina è basso (5,84%) ma comunque superiore al *P. ostreatus* (4,86%) e *P. eryngii* (4,77%). Alto contenuto espresso in mg/kg di sostanza secca (ss) per rame (40,7), ferro (40,6) e manganese (19,50), mentre è ridotta la quantità di potassio, fosforo e alluminio. Il contenuto di vitamina A (31,10 µg/kg di ss) è pari al valore medio contenuto nei funghi, mentre quello di vitamine B1, B2 e B6 è modesto come per tutti i funghi che vivono sul legno. Buono è il contenuto di vitamina C (94 mg/kg ss) come anche quello di vitamina D2 e D3 (rispettivamente 90,5 e 200,5 µg/kg ss) (Lelley e Vetter 2005).

Per la produzione vi sono delle peculiarità da evidenziare:

1) La preparazione del substrato: è possibile utilizzare segatura di legno fresco miscelata a residui di lavorazione del grano, mais etc. Ad esempio Stamets nel 2000 fornisce la seguente formula (segatura di legni duri 52%, trucioli 25%, crusca di riso o grano 20%, CaSO₄ 3%, umidità 60%), ma bisogna far fermentare in platea la segatura inumidendola e mescolata a intervalli periodici, controllando la temperatura, per diversi mesi al fine di

rendere uniforme la massa e per allontanare i composti volatili dannosi al micelio (Oei, 2003): nel carro miscelatore vanno aggiunti successivamente gli altri composti controllando l'umidità e il pH (fra 4,5 e 6). Nella fase finale prima dell'inserimento nelle bottiglie va miscelato con la polvere d'uovo (2-3%),
5 3%), compattato e finemente triturato e poi sterilizzato in autoclave su appositi cestelli a 121°C per 2-3 ore (Choi 2005).

2) Semina, della durata di 2-4 settimane: va effettuata con micelio (2-3% del peso umido del substrato) allevato prevalentemente su segatura, introdotto con apposita pistola alla parte alta della bottiglia e in condizioni di
10 perfetta asepsi, lasciando aperto il collo della bottiglia. In questa fase va anche effettuato l'inserimento degli ammendanti oligoelementi in parti uguali (2-3‰ del peso secco del substrato).

3) Incubazione, che va distinta in quattro fasi:

a) colonizzazione del substrato: il micelio invade il compost, mantenuto a
15 una temperatura media di 25°C, con debole illuminazione o buio ed elevata umidità all'interno delle bottiglie (90-95%).

b) Formazione di un plectenchima, della durata di 2-4 settimane: il micelio cresciuto con un aumento di CO₂ si organizza come tessuto compatto bianco.

20 c) Formazione dei glomeruli, causata da aumento di CO₂ e aumento di temperatura: il micelio forma piccoli ammassi di ife.

d) Imbrunimento, vale a dire ulteriore ispessimento della pellicola per ottenere una consistenza coriacea e colore bruno-marrone: si diminuisce la CO₂ e si formano i primordi. Le ultime due fasi durano 2-4 settimane.

25 4) Primordi e sviluppo dei basaliomi. Per la comparsa dei primordi è necessario un cambio delle condizioni ambientali. La temperatura deve scendere sotto i 20°C e deve essere mantenuta un'elevata umidità relativa (85-95%) ridotta con una opportuna ventilazione. La CO₂ deve essere inferiore a 1.000 ppm e deve venire applicata un'illuminazione di 500-2.000

lux (370-420 nm). Dopo 5-7 giorni la temperatura va aumentata sopra i 20°C con umidità tra 60-80%. Nel periodo di 7-14 giorni i funghi dapprima si accrescono in altezza, quindi il cappello si scurisce e si distende. Tale produzione varia dal 15 al 35% del peso umido del substrato (Oei, 2003) e con le bottiglie al massimo si potranno avere due volate di funghi. Questa tecnica con le bottiglie in plastica dagli anni 80 è utilizzata in Cina (Fan et al. 2005). Il processo può essere velocizzato, dimezzando i tempi, attraverso un'attenta scelta della varietà di Shiitake e regolando attentamente le bagnature, la ventilazione e la temperatura a valori a volte alternanti (15-20°C) consentendo di ridurre il ciclo produttivo a circa 3 mesi; ovviamente sarà necessario utilizzare attrezzature automatizzate e ambienti di coltivazione climatizzati. L'utilizzo dei CEM come di prassi (bassa intensità fino ai primordi e poi alta intensità) può ulteriormente diminuire i tempi del ciclo produttivo.

Il *Lentinus edodes* può subire il trattamento secondo il metodo della presente invenzione e diventare così *Lentinus edodes off*. E' molto più attivo grazie all'ergotioneina e per l'ammendante di minerali che sono carenti nel *Lentinus edodes*. Dovrà essere assunto ciclicamente per due settimane al mese e poi sostituito con altri funghi per l'intensa attività immunostimolante che non può essere protratta oltre le capacità fisiologiche dell'organismo.

Flammulina velutipes off.

L'interesse del Giappone attorno alle proprietà dei funghi, cosa che ha determinato il grande sviluppo proprio in quel paese del consumo e dell'utilizzo come alimenti funzionali dei funghi, in particolare nella prevenzione e trattamento delle patologie tumorali, è dovuto proprio alla *Flammulina velutipes (F.v)*. Infatti nella provincia di Nagano attorno agli anni 70 si è verificato che agricoltori che producevano e consumavano direttamente questi funghi, avevano una bassa incidenza di cancro allo stomaco al contrario del resto della popolazione del paese. Bisogna ricordare

che all'epoca (anni 70) il Giappone era il paese con la più alta incidenza al mondo di cancro allo stomaco. Forti di questa evidenza epidemiologica, le autorità sanitarie giapponesi cominciarono e incentivare il consumo dei funghi e le ricerche scientifiche hanno successivamente dimostrato la presenza in questo fungo di un polisaccaride denominato FVP che ha dimostrato effetti contro il sarcoma 180 del topo (Jiang et al., 1999), cosicchè nell'arco di poco più di un ventennio si è riportata l'incidenza del cancro allo stomaco nella popolazione giapponese a quella degli altri paesi industrializzati. Inoltre sono stati riportati effetti immunomodulatori dovuti a polisaccaridi e proteine isolate da *F. velutipes* (She et al., 1998, Wang Y.T. et al., 2004; Liao et al. 2006). Altre ricerche hanno individuato la presenza nel micelio di questo fungo di diverse proteine in grado di inibire la funzione dei ribosomi bloccando in questo modo la sintesi proteica (Ng e Wang, 2004), di impedire l'attività dell'angiotensina (Kim et al., 2002), di inibire le reazioni allergiche al cibo nei topi di laboratorio (Heish et al., 2003).

Questo fungo è diffusamente consumato in estremo oriente sia come fungo fresco che da nutraceutico, in occidente oltre a non essere note le proprietà non è consumato probabilmente per la scarsa consistenza della carne e per la viscidità del cappello. I contenuti nutrizionali sono variabili e fortemente influenzati dal substrato di crescita e questo ne fa uno dei funghi con i risultati più inaspettati per gli ammendanti aggiunti nel substrato di crescita; comunque in partenza le proteine crude variano dal 17 al 31%, i grassi dal 1,9 al 5,8% , fibre 3,7%, ceneri 7,4%.

I polisaccaridi della *F.v.* sono i componenti che stimolano l'immunità e che si sono dimostrati attivi nel cancro, il potenziamento nella forma officinale potrà essere utilizzata in tutti i tumori solidi ed in particolare in quello dello stomaco.

Per il substrato è preferibile utilizzare l'uso di segatura grossolana in quanto migliora la sofficità del substrato (80%) proveniente da essenze legnose a

foglia caduca (quercia e faggio) facendola fermentare, bagnandola e asciugandola ripetutamente nel corso di 4-5 settimane. Alla segatura si aggiunge il 20% di crusca di riso e 1-3% di CaCO_3 . L'umidità è regolata in un intervallo di 58-60% con pH di 5-6 (Oei, 2003).

5 Si possono distinguere le fasi seguenti:

1) Confezionamento e sterilizzazione. Dopo accurata miscelazione del substrato assieme alla polvere d'uovo aggiunta sempre nell'intervallo di 2-3% del peso secco, il substrato viene immesso nelle bottiglie in polipropilene con collo breve e largo e della capacità di 1.000 cc. Le bottiglie sono, quindi,
10 chiuse con un tappo provvisto di filtro per gli scambi gassosi e avviate alla sterilizzazione in autoclave a 121°C per 1-2 ore.

2) Inoculazione ed incubazione. Quando la temperatura del substrato ha raggiunto 20°C, il substrato è inoculato utilizzando micelio allevato su segatura, attraverso la nota pistola per una quantità nell'intervallo di 2-3%
15 del peso. Dopo una giornata, sempre tramite il metodo della presente invenzione, viene aggiunto l'ammendante minerale con le stesse proporzioni (25% x 4) e al 2-3‰ rispetto al peso secco. Gli oligoelementi sono aggiunti in una percentuale maggiore volendosi ottenere un maggiore effetto immunostimolante combinato con il polisaccaride per i tumori. Ovviamente si
20 inizia l'azione dei CEM come da prassi. Le bottiglie sono poi collocate su scaffali in un ambiente privo di luce e ad una temperatura di 20-25°C. L'incubazione si considera terminata quando il substrato è invaso quasi totalmente dal micelio generalmente dopo 20-30 giorni (meno con i CEM).

3) Produzione. Al termine dell'incubazione le bottiglie sono sistemate negli
25 ambienti di produzione dove è possibile controllare temperatura, aerazione e umidità. Qui vengono aperte e la parte superiore del substrato dove è presente l'inoculo, è asportata per favorire la formazione dei primordi in modo compatto e uniforme. La temperatura è ridotta a 10-12°C, l'umidità a 80-85%, in assenza di luce e in presenza di un'alta percentuale di CO_2

(2.000-4.000 ppm). In queste condizioni, dopo 10-14 giorni, si differenziano i primordi e per una crescita corretta si riduce di 3-5°C la temperatura per 5-7 giorni. Dopo che il gambo ha raggiunto circa 2 cm la temperatura è elevata a valori di 5-8°C, la percentuale di CO₂ è mantenuta alta e l'umidità a 60-75% con un'intensità di luce molto tenue, di appena 20-50 lux. Quando i carpofori sporgono dal bordo della bottiglia di 2-3 cm, a quest'ultima viene applicato un collare a forma di manicotto che favorisce l'allungamento dei gambi, la posizione eretta e l'accumulo di CO₂. Quando i carpofori raggiungono la lunghezza di 13-14 cm la produzione è pronta per essere raccolta e successivamente trattata con luce pulsata. Le volate sono di norma due per un totale di 160-220 g per bottiglia (Oei, 2003). Essendo un fungo invernale, i parametri (temperatura, umidità e CO₂) possono essere modulati anche verso basse temperature (10-16°C), elevata umidità (90-95%) e diminuzione di CO₂ (0,2-0,4%) consentendo un primo raccolto dopo appena 5-8 giorni.

Considerata la scarsa consistenza della carne con la bassa presenza di BRM e oligoelementi, è possibile che nell'officinale sia particolarmente attiva la parte minerale dell'ammendante che è aggiunta in una percentuale maggiore e insieme allo sviluppo di vitamina D, cosicché è ipotizzabile lo sviluppo di un fungo officinale con caratteristiche particolari e importanti. E' un fungo facilmente digeribile e la forma officinale consentirà un facile assorbimento dei modificatori di risposta biologica (BRM) e oligoelementi, tale da renderlo il fungo di riferimento per alcuni malati oncologici tra quelli officinali potendo essere assunto giornalmente.

Morchella conica off. (Parsons)

La *Morchella* è un ascomicete e nella prima fase, in più, c'è la necessità di formare gli sclerozi che rappresentano la forma germinativa vegetativa potenziale. Essendo un ascomicete, si sviluppa internamente, quindi alla prima fase di accumulo di nutriente (fase simbiotica) per la formazione del

bottone germinativo (sclerozio) su un substrato tradizionale formato da segatura di piante per il 70-80%, crusca di riso o grano o avena 20%, e CaCO_3 2% per la correzione del pH, 5,8-6,2. Al substrato va aggiunto il 2-3% di polvere d'uovo. Gli ascomiceti vanno immediatamente seminati su tale substrato; dopo 18-21 giorni gli sclerozi vanno rimossi e lavati e inseriti nelle bottiglie con un sottile strato di torba e terreno di cui sopra al 50% in presenza di ammendante minerale alle proporzioni consuete (25% x 4) con il rapporto del 2-3% del peso secco del substrato. In contemporanea si inizia trattamento con CEM. In 12-36 ore il micelio (fase saprofitica) si diffonderà nella bottiglia. A questo punto lo sviluppo del fungo avverrà a spese dello sclerozio crescendo in altezza laddove la fonte di luce sarà più intensa ed in opportune condizioni di umidità e temperatura e in 20-30 giorni per il completamento del carpoforo (la metà con i CEM). Essendo un ascomicete, la procedura con lampada a luce pulsata è possibile non dia i risultati in vitamina D2 sperati. Rappresenta un fungo non facilmente coltivabile, ma prelibato e con i seguenti contenuti nutrizionali: 20% di proteine, 4,8% di grassi, 8,7% di fibre, 64,4% di carboidrati.

Estratti alcolici di colture liquide del micelio di *Morchella esculenta* hanno mostrato attività antinfiammatoria, antitumorale e immunostimolante (Nitha et al., 2006). In particolare il fungo sembra avere la proprietà di abbassare gli acidi urici in eccesso (antigotta). La forma officinale potrà implementare le attività prima citate, in particolare quella antinfiammatoria motivo per cui viene aggiunta la polvere d'uovo in una percentuale maggiore.

Essendo un fungo povero in oligoelementi e di ergosterolo, è possibile che tale procedura implementi anche le proprietà antitumorali accanto a quelle antinfiammatorie e uricosuriche già elevate. E' considerato un ottimo fungo commestibile gustoso e digeribile e manterrà tali caratteristiche anche nella forma officinale.

***Auricularia auricula-judae* off. (L.:Fr.) Schroeter**

***Auricularia polytricha* off. (Mont.) Sacc.**

La coltivazione di *Auricularia* ha le sue origini in Oriente nel 500-600 a.c., dove veniva e viene apprezzata sia per i suoi impieghi culinari che terapeutici. I contenuti nutrizionali segnalano: proteine 8-10%; grassi 0.8-1,2%; ceneri 4-7%; carboidrati 84-87%; fibre 9-14%. Da notare l'alto contenuto di carboidrati. Le due tipologie di fungo sono sostanzialmente simili per quanto riguarda la coltivazione e le proprietà.

I substrati sono generalmente costituiti da semi di cotone, cereali, crusca o tronchi di legno di latifolia, generalmente si prediligono specie della famiglia delle Fagaceae.

I substrati possono essere compostati per qualche giorno o utilizzati direttamente dopo la miscelazione.

In entrambi i casi vengono inseriti in bottiglie di polipropilene termoresistente e sterilizzati per 60 min a 121°C.

La composizione del substrato compostato è la seguente: segatura (78%), crusca (20%), CaCO₃ (1%), saccarosio (1%). Il tutto viene miscelato, bagnato e sistemato in modo da formare un largo cumulo, che viene coperto con un telo di plastica e mescolato per due volte a intervalli di due giorni.

La composizione del substrato non compostato è la seguente: scarti di semi di cotone (93%), crusca di grano (5%), saccarosio (1%), CaCO₃ (1%).

In ambedue i funghi viene aggiunta la polvere d'uovo (2-3% del peso secco); viene inoltre aggiunta acqua fino a ottenere un'umidità del 60% e quindi il substrato viene messo all'interno di contenitori termoresistenti.

Dopo che il substrato si è raffreddato viene inoculato con micelio e incubato a 25°C±2°C per circa 28-30 giorni: in tale occasione viene inserito l'ammendante minerale in parti uguali (25% x 4) e con percentuale del 1-2‰. Subito dopo si espone a CEM a bassa e poi ad alta intensità.

Una precoce formazione di primordi può essere dovuta ad una esposizione a luce superiore a 500 lux durante l'incubazione.

E' un fungo che si presta molto bene alla trasformazione in officinale, eccetto per quanto riguarda la formazione di vitamina D che rimane molto scarsa.

Possiede proprietà anticoagulanti ed una frazione polisaccaridica ha effetti ipoglicemici su topi diabetici (Yuan, 1998). Considerato l'alto tenore in polisaccaridi si pensa che molte delle proprietà antitumorali dimostrate su Sarcoma 180 (Kio, 1991) e carcinoma di Ehrlich (Ying, 1987), siano riconducibili ad essi. Per la scarsa quantità di vitamina D prodotta, gioco forza l'implementazione delle proprietà antitumorali passa attraverso lo stimolo immunitario con un aumento di percentuale di ammendanti minerali e di polvere d'uovo. Anche la forma officinale, così prodotta, mantiene le caratteristiche di gradevolezza e l'indicazione nell'alimentazione di tutti i giorni.

***Tremella fuciformis* off.**

La *Tremella fuciformis* è un fungo ottimo commestibile che può essere consumato fresco oppure secco in infusioni utilizzando 15 g due volte al giorno (Hobbs, 2000). Il fungo, oltre a contenere molte vitamine e minerali, è ricco di rame perchè ha la capacità di accumulare il rame dal substrato di crescita. Il contenuto di nutrienti nel secco è 4,6% di proteine, 0,2% di grassi, 1,4% di fibre e 0,4% di ceneri. Nella medicina tradizionale cinese è utilizzato, forse per questo motivo, per emorroidi e tutti i tipi di sanguinamenti; in Europa per gli ascessi, dolori addominali, problemi cardiaci e deficit del sistema immunitario. Essendo anche ricco di adenosina è utilizzato per le trombosi vasali ed in generale per le malattie cardiovascolari anche per le azioni ipolipemizzante, anticoagulante e antiaggregante piastrinico. Sono riportati effetti antidiabetici in topi di laboratorio (Yuan et al., 1998; Takeujchi et al., 2004). Le capacità antitumorali (Misaki et al., 1981; Ukai et al. 1983) sono dovute a stimolazione dei leucociti e alla spiccata azione antiossidante per

antagonismo dei radicali liberi tramite l'attivazione dell'enzima superossido dismutasi (SOD) (Cu-Zn) a livello epatico e cerebrale. Sono quindi indicati per tali neoplasie in considerazione dell'alta concentrazione di partenza del rame (Cu) e dello zinco (Zn) aggiunto come ammendante; quindi aggiungere un minerale a base di rame al substrato mantiene alto il livello di attivazione del SOD, aggiungendo capacità antiossidante e di stimolo al Sistema Immunitario contro i tumori.

In natura cresce come saprofita sul legno di molte specie a legno duro, soprattutto in regioni a clima tropicale e sub-tropicale; la sua coltivazione non è molto diffusa, ma sta prendendo campo anche il suo utilizzo a scopo culinario, oltre che medicinale.

Può essere coltivato anche su tronchi naturali ma è molto diffusa la coltivazione su terreno sintetico, inoculato con una coltura mista in cui è presente anche un ascomicete *Hypoxylon archeri*, spesso associato in natura al legno in decomposizione. Il composto è costituito da segatura di piante (78%), crusca di riso (20%) e CaCO_3 (2%) per pH 5,8-6,2 con l'aggiunta di polvere d'uovo (2-3% peso secco).

Hypoxylon archeri aumenta la capacità di *T. fuciformis* nell'assimilazione dei nutrienti contenuti nel substrato, per cui influisce positivamente anche sulla resa. Il substrato supplementato viene messo nelle bottiglie e aperto il tappo superiore coperto con tessuto traspirante. Il substrato viene sterilizzato, raffreddato e inoculato con la coltura mista assieme all'ammendante minerale con percentuale del 2-3‰ del peso secco della bottiglia con un rapporto fra gli oligoelementi che privilegia lo Zn e il Cu che rappresentano il 70% dell'ammendante minerale totale. Alle bottiglie, all'occorrenza, sarà assicurata la ventilazione anche attraverso l'apertura del tappo traspirante inferiore. Si inizia l'esposizione ai CEM ai dosaggi secondo il metodo.

Dopo circa 30 giorni di crescita vegetativa ad una temperatura ottimale di 25-28°C ed un'umidità elevata (85-95%), il substrato viene esposto alle

condizioni favorevoli allo sviluppo dei primordi, create con un abbassamento di temperatura e umidità dell'ambiente, ed un aumento dell'esposizione all'aria ed alla luce (temperatura di 20-25°C, umidità 80-85%). I funghi sono raccolti dopo 35-40 giorni dall'inoculazione quando hanno un diametro di 10-15 cm. Con i CEM i tempi sono accorciati di circa 1/3. Con la luce pulsata l'aumento di vitamina D2 non è molto accentuato in considerazione della tipologia del fungo (ascomicete).

Nei funghi non trattati, i carpofori freschi hanno un contenuto di acqua molto alto (92-94%) ed il contenuto vitaminico è povero e così pure quello di elementi minerali (Chang e Hayes, 1978). Tali condizioni sono completamente capovolte in quello officinale nei quali pur permanendo alto il contenuto d'acqua i funghi si arricchiscono in oligoelementi ammendati, in particolare ioni Zn e Cu per l'azione sul Sistema Immunitario.

Le proprietà medicamentose di questo fungo sono attribuibili proprio all'alto contenuto di polisaccaridi, in particolare ad un etero polisaccaride acido chiamato glucuronoxilomannano. Tale polisaccaride esercita attività immunomodulante e antitumorale: da studi clinici è risultato che il fungo è efficace nella gestione della leucopenia in corso di chemioterapia e radioterapia (Smith, Rowan e Sullivan, 2002). In particolare viene stimolata la produzione di interleuchine (Ukai et al., 1972, Misaki e Kakatura 1995). Il noto effetto trofico sulla cute, per la quale è da molti anni utilizzato in estremo oriente in medicina estetica, è dovuto alla protezione delle cellule dell'endotelio vascolare che protegge dalle radiazioni come lo stimolo all'ematogenesi, ambedue utilizzate anche per i danni da chemioterapia e radioterapia (Stamets 2000). La trasformazione officinale stimola la già potente azione immunitaria mediata da leucociti e interleuchine tramite il complesso ergotioneina+oligoelementi (Zn+Cu).

***Agrocybe aegerita* off.**

La *Agrocybe aegerita* è un fungo tra i più apprezzati per il gusto e tra i più coltivati al mondo. E' noto comunemente come pioppino ed è una specie saprofita. Ha una buona quantità di vitamine, in particolare la D, e di oligoelementi.

La tecnica di coltivazione molto facile è sostanzialmente simile a quella dei pleuroti menzionata in precedenza, prevedendo la sterilizzazione del substrato in bottiglie di polipropilene in autoclave a 121°C per 2 ore.

Il substrato è quello del *Pleurotus*, formato da paglia di grano al 70-80%, crusca di grano 10%, integrati con CaCO₃ al 2%, nitrato di ammonio al 2%, e farina di erba medica o altra, 8-10%; miscela addizionata con polvere d'uovo nel rapporto del 2-3% del peso secco.

Dopo la sterilizzazione le bottiglie sono insemiante utilizzando un micelio allevato su cariossidi di grano ed il giorno successivo viene inserito l'ammendante minerale alla proporzione del 1-2‰ secondo un rapporto fra oligoelementi ammendanti equilibrato al 25% x 4. Dopodichè viene sottoposto ai CEM secondo metodo e lasciato in incubazione al buio, in ambienti climatizzati ad una temperatura di 25°C per 3 settimane. E' importante che al substrato in incubazione sia assicurata una percentuale di umidità del 70%.

All'inizio della quarta settimana la temperatura viene portata a 13-18°C con umidità dell'aria al 90-95% per la fruttificazione durante la quale il contenuto di CO₂ dell'aria deve essere inferiore a 1.500 ppm e deve essere applicato un ciclo di luce di 12h/die con una intensità di 500-1.000 lux. Dopo circa 30-35 giorni dalla inoculazione compaiono i primordi che saranno pronti per la raccolta dopo pochi giorni. I tempi con i CEM sono accorciati fino al 50% in meno per ciclo. Vista la già buona base di partenza per la vitamina D2 il processo di arricchimento tramite luce pulsata otterrà i risultati voluti di 2000 UI per porzione di fresco /die.

A. aegerita fino a pochi anni fa era considerato un fungo con scarse proprietà medicinali, ma studi recenti hanno individuato la presenza di lectina. La lectina è una classe di proteine capaci di legare domini carbossilici di glicoproteine che svolgono un ruolo nella risposta immunitaria, ma anche nel riconoscimento dei gruppi sanguigni e nella rimozione di glicoproteine tossiche in circolo; essa ha proprietà antitumorali e antivirali dimostrate contro i virus delle piante, denominata AAL (Zhao et al. 2003, Yang et al. 2005). L'azione antitumorale sembra dovuta alla stimolazione del sistema immunitario dell'ospite e in particolare alla stimolazione dei fattori della necrosi dei tumori (TNF) e interleuchina beta-1 (Wang et al., 2004, Yang et al., 2005). L'arricchimento ottenuto nell'officinale produce effetti contro tutti i tumori nell'innalzare la risposta immunitaria insieme a quella derivante dalla vitamina D antiproliferativa, mantenendo una buona digeribilità e ad un gusto delle carni che lo rende uno dei funghi officinali che può essere assunto costantemente da tutti i malati.

Pholiota nameko off.

Si tratta di un fungo di ottima qualità appartenente alla famiglia delle Strophariacee, molto gradito in estremo oriente ma sconosciuto in occidente, forse a causa della sua viscosità, dove non ha trovato interesse. E' consumato allo stato fresco o in barattoli sotto conserva.

E' un fungo molto interessante per la composizione. Infatti la sostanza secca presenta 20,8% di proteine, 4,2% di grassi, 66,7% di carboidrati, 8,3% di ceneri e 6,3% di fibra. Il contenuto di vitamine espresso in mg per 100 g di sostanza secca è notevole ed è rappresentato dalla tiamina (18,8), riboflavina (14,6) e niacina (72,9). Gli elementi minerali prevalenti sono il calcio, potassio e ferro (Stamets 2000). La buona carnosità e la ricchezza dei componenti menzionati, in primis aminoacidi solforati, ne fanno uno dei funghi dove l'addizionamento può avere gli effetti più insperati ed eclatanti, in particolare dell'ergotioneina.

La tecnica di coltivazione è analoga a quella della *Flammulina velutipes*. Uno dei substrati più utilizzati è quello formato da segatura e trucioli (52% e 25% rispettivamente) di piante idonee, crusca di grano o di riso (20%) e solfato di calcio (3%), con umidità al 70%, miscelato e addizionato a polvere d'uovo con una significativa variazione rispetto ai precedenti: 4-5% del peso secco. Tutto questo per trasformarlo nel fungo con più spiccate capacità di trasformazione officinale soprattutto detossificanti, antinfiammatorie e antiossidanti dovute all'ergotioneina, che esaltano quelle antifettive del fungo di partenza. Dopo confezionamento in bottiglie secondo l'invenzione e sterilizzazione del substrato, la semina è effettuata con micelio allevato su cariossidi di grano ed il giorno dopo con inoculazione dell'ammendante minerale alla proporzione del 2-3‰ e con un rapporto di parità tra i componenti (25% x 4). Quindi, dopo esposizione a CEM secondo metodica, è incubato al buio per circa 2-3 settimane ad una temperatura di 25-28°C. La produzione è ottenuta aprendo le bottiglie e mantenendo alta l'umidità relativa (98%) e abbassando la temperatura a 10-15°C per le varietà autunnali e a 18-22°C per quelle estive e fornendo un'intensità luminosa pari a 300-1.000 lux (Demas, 1989). Dopo circa una settimana compaiono i primordi e dopo qualche giorno sono pronti per la raccolta; con i CEM è sensibile l'accorciamento dei tempi. Una seconda volata è possibile raschiando il collo, inserendo eventualmente una membrana semiporosa, capovolgendo la bottiglia privandola del tappo di fondo e utilizzando per irrigazione il secondo rubinetto. Così facendo la produzione sarà pari al 30% del peso del composto.

Alcuni autori (Bianco Colletto, 1981) riportano effetti antibiotici contro *Bacillus subtilis* ed altri batteri. Stamets nel 2000 riporta risultati di alcuni autori cinesi di effetti antibiotici su batteri del genere *Staphylococcus* e attività antitumorale contro cellule di sarcoma 180 del topo.

Con la trasformazione in officinale, è già stato accennato, si tende a implementare le capacità antinfiammatorie antiossidanti e detossificanti dell'ergotioneina con possibile indicazione nei confronti di tumori da esposizione chimica ambientale o professionale, l'intossicazione relativa con degenerazione epatica ed anche in alcuni tumori della vescica, fegato e nasofaringeo.

***Hypsizygus tessulatus* off.(Bull.) Singer**

***Hypsizygus ulmarius* off. Bull.) Redhead**

Sono un gruppo di funghi molto noti ed apprezzati in estremo oriente in particolare coltivati in Giappone e molto simili per caratteristiche di crescita al genere *Pleurotus*. Appartengono alla famiglia delle *Tricholomataceae*. Hanno caratteristiche simili, anche di crescita, e vengono consumati freschi, secchi o in polvere. Non vi sono informazioni particolari circa la composizione.

La coltivazione in Giappone già avviene in bottiglie di polipropilene. Il substrato ha caratteristiche comuni con quello di altri funghi lignicoli: 52% di segatura, 25% di trucioli, 20% di crusca di grano, 3% di CaCO₃. La miscela viene inumidita al 63/65% e mescolata con polvere d'uovo al 2-3%.

Le bottiglie secondo l'invenzione sono riempite meccanicamente. Il substrato è compresso e viene applicato un foro sul fondo della bottiglia dove è seminato il micelio. Il giorno successivo sullo stesso foro ma più in alto viene inserito l'ammendante minerale alla proporzione del 1-2‰ con rapporto pari dei quattro oligoelementi; immediatamente viene esposto ai CEM come da prassi. L'incubazione dell'*H. tessulatus* è fatta in locali al buio, ad una temperatura di 20-25°C per circa 30-45 giorni. Al termine le bottiglie sono aperte e la formazione dei primordi è favorita dalla raschiatura della superficie del substrato, da un abbassamento della temperatura a 10-15°C, da un'umidità relativa alta (98-100%), da un contenuto di CO₂ inferiore allo 0,1%, da un'illuminazione di 500-1.000 lux per circa 7-12 giorni. Al termine

la temperatura è elevata a 13-18°C, l'umidità relativa poco ridotta, ma elevato il contenuto di CO₂ a 0,2-0,4%. Come per la *Flammulina v.*, per favorire lo sviluppo del gambo lungo viene applicato sul collo della bottiglia un colletto di 7-8 cm. La produzione è ottenuta in due volate pari a circa ¼ del substrato (Stamets 2000) e può essere accelerata dal CEM. Nella coltivazione di *H. ulmarius*, eliminando il colletto, si tende invece a favorire la crescita del cappello che è generalmente inversamente proporzionale alla lunghezza del gambo, ottenendo gambi più corti, tozzi e carnosì con cappelli più grandi. In questo modo le caratteristiche organolettiche del *H. ulmarius* risultano migliori sostanzialmente invariate quelle salutari.

Questo genere è correlato al genere *Pleurotus* e alcune proprietà medicinali sono comuni (vedi *P. ostreatus*). Stamets (2000) riferisce di studi giapponesi su una forte proprietà antitumorale di questi funghi. Alcuni studi riportano tecniche di ibridazione fra *Hypsizygus* e *Laetiporus sulphureus* per la produzione di medicinali contro la trombosi (Okamura et al., 2000).

Per la strategia terapeutica antitumorale dell'officinale, si rimanda a quanto già detto per il *P. ostreatus*. In particolare si punta all'implemento delle capacità antiossidanti, detossificanti e antinfiammatorie prodotte dall'ergotioneina in buona quantità.

***Grifola frondosa* off. "Maitake"**

Rappresenta il fungo commestibile più importante e più studiato per quanto riguarda le proprietà medicinali proprio per i tumori. È un fungo ricercato ed apprezzato in tutto il mondo per le proprietà organolettiche prima ancora che per quelle, seppur notevoli, antitumorali. La tecnica di coltivazione messa a punto alla fine degli anni 70 in Giappone, insieme ai risultati della ricerca in tutto il mondo sulle capacità antineoplastiche con le conseguenti ricadute mediche, ha consentito il rapido affermarsi di questo fungo nei mercati di tutto il mondo sia come alimento che come nutraceutico.

Ha nella composizione delle caratteristiche uniche come ad esempio un contenuto di umidità (80%) inferiore a quello comunemente presente nella maggioranza dei funghi (90%). Il contenuto proteico è molto elevato, pari a circa il 27% della sostanza secca, quello dei carboidrati è prossimo al 50%.

5 Il contenuto vitaminico in percentuale della sostanza secca è vitamina B1 1,5 mg, vitamina B2 1,6 mg., niacina 54 mg, vitamina C 63 mg e vitamina D 410 UI (raggiunge la dose giornaliera consigliata secondo l'OMS). Il contenuto di elementi minerali e metalli è magnesio 67 mg %, ferro 0,5 mg %, calcio 11 mg % e fosforo 425 mg (Stamets e Chilton, 1983).

10 La tecnica di coltivazione adottata è quella della sterilizzazione del substrato in bottiglie di polipropilene. La formula del substrato utilizzata è quella indicata per i funghi lignicoli: segatura 52%, trucioli 25%, crusca di grano 20%, carbonato o solfato di calcio 3%. L'umidità è portata al 60-65% ed il pH a 5,5-6,5. A questo va aggiunta la polvere d'uovo in un rapporto 2-3%
15 del peso secco della miscela. Gli elementi grossolani come i trucioli sono necessari per mantenere soffice ed aerato il composto. Il substrato dopo sterilizzazione in autoclave è seminato nelle bottiglie con micelio allevato su semi di grano o miglio. Il giorno successivo viene inserito nella bottiglia l'ammendante minerale (2-3‰ del peso secco alle stesse proporzioni)
20 relativamente distante dal micelio. E' applicato subito dopo il CEM con le consuete modalità. L'incubazione e la comparsa dei primordi avviene a contenitore chiuso, in locali al buio o debolmente illuminati, ad una temperatura di 20-25°C in presenza, all'interno della bottiglia, di elevate percentuali di CO₂ (20.000-40.000 ppm). Dopo circa 30-40 giorni il micelio
25 ha colonizzato tutto il substrato, compare un essudato giallastro ed un ispessimento del micelio in superficie e dopo altri 10-12 giorni compaiono i primordi in forma di masserelle grigiastre di 2,5-6 cm di diametro. I contenitori rimangono chiusi per altri 2-3 giorni poi è aperta la parte superiore della bottiglia e si riduce la temperatura a 16-18°C, l'umidità

relativa è mantenuta tra 80 e 95%, la luce a valori di 200-500 lux, il contenuto di CO₂ non superiore a 0,1%. Nell'arco di 18-25 giorni i carpofori sono pronti per la raccolta (può essere meno con i CEM). La produzione è pari a ¼ del peso di composto. Il trattamento con la luce pulsata fornisce immediatamente i risultati attesi (2000 UI per porzione di fresco pro die) considerata la già buona quantità in quello non trattato.

Grifola frondosa è uno dei funghi più studiati per le sue caratteristiche medicinali. Produce sostanze con effetti antitumorali, antivirali, antibatterici, antifungini, immunostimolanti, epatoprotettivi, antidiabetici, antipertensivi (Wasser e Weiss, 1999; Hobbs, 2000; Maywell, 2001). Estratti di *G. frondosa* hanno anche dimostrato diretti effetti antiossidanti contro alcuni radicali liberi (Mau, 2004), la cui capacità antiossidante sembra legata al contenuto fenolico del micelio. Comunque i composti più studiati sono i beta glucani (beta 1-3 e beta 1-6 glucani) di cui sono ricchi sia il micelio che il corpo fruttifero (Hobbs, 2000; Reshetnikof et al. 2001). Esistono chiare indicazioni che le condizioni colturali e il substrato di crescita possano influenzare notevolmente la quantità e la composizione dei polisaccaridi prodotti (Ohno et al., 1985, 1986, Mizuno e Zhuang, 1995). Generalmente un miglior effetto terapeutico si ottiene con gli estratti del corpo fruttifero, in cui è presente una maggior quantità di beta-glucani rispetto al micelio (Minato et al., 2001, Reshetnikof et al. 2001). Le modificazioni al substrato secondo l'invenzione, tese ad aumentare il contenuto di minerali, di oligoelementi, di vitamina D e di amminoacidi (ergotionenina) e proteine, possono avere una ripercussione sul contenuto e la qualità dei beta-glucani prodotti, raggiungendo l'azione potente dei beta glucani come la frazione D e MD di Maitake, presenti negli estratti purificati ed attivi contro il cancro partendo dal fungo officinale assunto quotidianamente come alimento. Tra l'altro la *Grifola frondosa* è uno dei funghi più digeribili e meno allergenici presenti sul mercato. E può essere assunto fresco, secco o conservato sott'olio.

Fino ad oggi sono state caratterizzate ventinove diverse frazioni di estratti di corpo fruttifero di *G. frondosa*, ventotto delle quali hanno dimostrato attività BRM (Mizuno et al., 1986, Zhuang et al., 1994). I beta glucani isolati presentano differenze nella composizione e struttura della catena polisaccaridica; alcuni sono glicoproteine, altri privi della componente proteica, ma tutti risentono, nel bene come nel male, delle condizioni di estrazione e dei procedimenti tecnologici utilizzati. Per questo il fungo in toto assunto come alimento rappresenta la miglior forma di assunzione di tali BRM. Comunque non si può non citare la frazione D (catena principale con legami beta 1-3 e ramificazioni beta 1-6) che in vitro ha dimostrato effetti antitumorali contro sarcoma 180 di topo e contro tumore alla prostata (Mizuno et al., 1986; Kurashige et al., 1997; Konno et al., 2002) per un effetto citotossico diretto sulle cellule del tumore prostatico oltre ad un effetto stimolante precoce sui linfociti NK ed un effetto inibitorio più a lungo termine dovuto al rilascio dei fattori IL-12 da parte dei macrofagi (Kodama et al., 2002, 2004) responsabili dell'eliminazione delle cellule tumorali. Più di recente è stata isolata un'altra frazione più pura di quella D, la frazione MD che, iniettata nell'animale, produce un maggior effetto antitumorale rispetto alla frazione D (Maywell, 2001). L'assunzione orale della frazione MD ha dato buoni risultati nella regressione dei tumori (Kodama et al., 2002) in Giappone quando sono stati trattate centosessantacinque persone affette da carcinomi al polmone, mammario ed epatico allo stadio avanzato (III-IV); è avvenuta una regressione significativa del tumore e/o miglioramento dei sintomi dal 50 all'80% dei casi di tumore mammario e polmonare, mentre altri studi hanno dimostrato che in quasi l'80% dei casi migliorava le condizioni generali; gli effetti della chemioterapia (CHT), poi, erano meno pesanti, e con le stesse percentuali (83%) c'era un miglioramento del sintomo dolore. L'uso della *Grifola frondosa* è stato studiato anche nella prevenzione della metastatizzazione tumorale. Cellule di epatocarcinoma

MM-164 sono state iniettate in tre gruppi di topi: il gruppo uno è stato alimentato con una dieta contenente il 20% di polvere di *G. frondosa*, al gruppo due è stata somministrata frazione D in 1 mg/kg e il gruppo tre di controllo è stato alimentato con una dieta normale. Dopo 30 giorni è stato valutato il numero di metastasi epatiche; con frazione D è stata inibita la metastatizzazione epatica nel 91,3% dei casi, con la polvere nell'81,3%. Bisogna rilevare l'ottimo risultato della polvere con molta meno sostanza della frazione D, che ha portato a ipotizzare che l'uso giornaliero alimentare del fungo possa ridurre dell'80-90% il rischio di metastatizzazione. Un effetto notevole di stimolo immunitario è stato riportato con l'estratto polisaccaridico-glicoproteico (eteroglicano legato a proteine) del grifolano MT-2 (beta 1-3 glucano con ramificazione 1-6) che attiva i linfociti NK e T e promuove il rilascio di interleuchina-1 e anione superossido da parte dei macrofagi (Adachi et al., 1987; Zhuang et al., 1993). Un'altra variante, il D-Grifolano, è stato studiato su linee cellulari di carcinoma prostatico non ormono dipendente (Fullerton et al., 2000). Nell'arco di 24 ore si è ottenuta la quasi completa morte delle cellule neoplastiche (più del 95%) con dosaggi di 500 mg/ml di D-Grifon. L'associazione con la vitamina C (200 mg/ml) ha consentito di ridurre drasticamente il D-Grifon (30-60 mg/ml), mantenendo la stessa efficacia. Questo fatto ha avuto la conseguenza di indicare come raccomandabile l'assunzione di vitamina C, in contemporanea al fungo, perchè agisce in maniera sinergica inducendo l'apoptosi delle cellule neoplastiche da danno per stress ossidativo.

Questa azione pro-apoptosica, che vale per tutti i funghi in campo oncologico, in particolare proprio per quelli officinali secondo l'invenzione, collega l'azione di immunostimolo dei beta-glucani a quella antiossidante della vitamina C. E' mediata, inoltre, dall'inibizione della gliossalasi I, un enzima di detossificazione vitale per la cellula. Il blocco di questo enzima porta all'accumulo del metil-gliossale che ha un effetto citotossico in

particolare sulle cellule neoplastiche che usano tipicamente la via della glicolisi anaerobica per produrre energia. L'effetto finale è quindi un blocco del metabolismo cellulare e la morte delle cellule neoplastiche, più fragili dal punto di vista biochimico, rispetto a quelle normali che infatti non risentono di questo blocco metabolico. I dosaggi della vitamina C sono assolutamente paragonabili a quelli indicati da Linus Pauling e, per questa ragione, entrano pienamente nel metodo dei funghi officinali. E' raccomandata un'assunzione quotidiana di supplemento di vitamina C da fonti naturali (Rosa canina etc.) variabile dai 300 mg ai 3 g a seconda del grado di malattia neoplastica.

Un altro composto, il GFL (N-acetilgalattosamina-lectina), ha mostrato citotossicità verso le cellule HeLa (linea tumorale delle cellule della cervice dell'utero umano utilizzate per studi in vitro) probabilmente per un'interazione tra la lectina e i domini carbossilici dei recettori delle cellule tumorali (Kawagishi, 1995).

Nel 1998 in USA la FDA autorizzò la fase due degli studi sulla potenzialità della frazione D nelle terapie dei tumori del seno e della prostata. Questi studi hanno dimostrato che l'effetto antitumorale è dovuto a diversi tipi di azione: protezione delle cellule sane, rallentamento o inibizione della crescita tumorale e un ruolo nella inibizione della formazione delle metastasi (Maywell, 2001).

Come già detto in precedenza, è ipotizzabile che l'effetto degli ammendanti della *G. frondosa officinalis*, porti ad azioni antineoplastiche simili a quelli degli estratti delle frazioni D e MD, stimolando l'apoptosi nei più comuni tumori come quello del colon-retto, del polmone, del fegato e della mammella, ed in particolare in quelli di derivazione ghiandolare ormono dipendenti quali gli adenocarcinomi mammari, prostatici e della cervice uterina.

***Agaricus brasiliensis* off.**

***Agaricus blazei* Murrill off.**

Fino al 2001 esistevano due funghi: *A. blazei* Murrill, in onore dello scopritore Murrill avvenuta in Florida nel 1945, e un altro blazei (Heinemann). Poi nel 2005 in Brasile nello stato di San Paolo fu rinvenuta un'altra specie simile, ma i tassonomisti sentenziarono che si trattava di una specie differente *A. brasiliensis*. Probabilmente molti studi sulle proprietà medicinali sono di ambedue le specie, essendo stati coltivati indifferentemente ceppi provenienti da varie regioni. Con il nome di AbM (*Agaricus blazei* Murrill) è indicato uno dei funghi medicinali più noti, studiati ed utilizzati per i malati oncologici, e per tale motivo viene inserito tra quelli officinali.

L'A. brasiliensis ha un elevato contenuto proteico, 37-48% della sostanza secca, il più alto tra i funghi coltivati, 40% di carboidrati, 3% di grassi e circa 7% di minerali di cui 2,5% di potassio, 1% di fosforo e 0,1% di magnesio. Ha un buon contenuto di vitamine del gruppo B e D e diversi elementi essenziali tra cui ferro, manganese, zinco e rame (Amazonas, 2005). E' commercializzato allo stato fresco, essiccato intero o in polvere e come estratto.

Questo fungo, analogamente al prataiolo a cui appartiene come famiglia, ha necessità di un substrato di crescita in parte già degradato da altri microrganismi. Per questo motivo gli elementi del substrato devono essere sottoposti ad un trattamento di fermentazione e pastorizzazione. Un semplice substrato (Stamets, 2000) è il letame dei bovini prodotto da non più di una settimana. E' consigliabile però utilizzare il seguente substrato: residui di allevamento della canna da zucchero (45%) o vari tipi di fieni (44%), crusca di soia (25%), urea (1%), solfato d'ammonio (1%), fosfato (0,5%), gesso (3%) e carbonato di calcio (3%). Ad esso vanno aggiunti in percentuale variabile dal 3% al 5% del peso secco la polvere d'uovo. La fase

iniziale è quella della fermentazione simile a quella *dell'A. bisporus*. Il contenuto ottimale di azoto del substrato deve essere elevato e l'umidità della miscela è portata ad un livello prossimo del 75%, il pH è basico (9-9,5), il rapporto C/N è 30/1, il contenuto di azoto della sostanza secca è
5 attorno al 2%. Nella prima fase fermentativa in presenza di corrette condizioni di umidità, temperatura e ossigeno, hanno inizio i processi di disgregazione e trasformazione del composto ad opera di microrganismi mesofili che utilizzano carboidrati della massa con aumento della temperatura e selezione di una popolazione di microrganismi termofili che si
10 accrescono in maniera ottimale a temperature superiori a 45°C; ma la temperatura nelle parti più interne del composto può raggiungere anche i 75-80°C. Pertanto deve essere completamente rimescolato per tre volte con una sosta di tre giorni. Quindi la fermentazione termina dopo 9 giorni, poi il substrato va pastorizzato per un giorno a 60-66°C, quindi condizionato per
15 due giorni a 49-52°C. Quando la temperatura è scesa sotto i 35°C, il substrato viene posto in bottiglie aperte e areate e avviene la semina, avendo l'accortezza di riempirle per $\frac{3}{4}$ di substrato. La temperatura va mantenuta a 25-30°C, con un'umidità di 80-85%, assicurando un lieve ricambio d'aria e l'esposizione a CEM. In queste condizioni la colonizzazione
20 avviene in 15-20 giorni. Quando il micelio ha invaso quasi tutto il substrato, è necessario aggiungere nella bottiglia uno strato di terreno di 3-5 cm di spessore formato da torba ammendata con il 10% di gesso previo autolavaggio, insieme agli oligoelementi al 2-3‰ del substrato alle medesime proporzioni. Per avviare la fruttificazione con la differenziazione
25 dei primordi è necessario abbassare la temperatura di poco sotto ai 25°C, ridurre tramite ventilazione la CO₂ a 400-800 ppm, mantenere l'umidità relativa su valori di 85-90% ed una leggera illuminazione (100-200 lux). Dopo circa 20-25 giorni per favorire lo sviluppo dei carpofori la temperatura è elevata a 24-27°C, sono applicati CEM ad alta intensità e la prima raccolta

è fatta dopo 4-8 giorni. E' possibile avere due o tre volate favorendone lo sviluppo rovesciando la bottiglia. In genere si ha una produzione pari al 10% del peso del substrato, con tempi ridotti grazie ai CEM.

Nella vasta letteratura sulle proprietà medicinali di questo fungo sono riportate quelle antitumorali, immunostimolanti, antibatteriche, epatoprotettive, la protezione del DNA dall'ossidazione e le proprietà antiossidanti in genere (Ker et al., 2005; Zhong et al., 2005; Benardshaw et al., 2005, 2006; Bellini et al., 2006; Grinde et al., 2006; Jin et al., 2006). Queste proprietà sono per lo più dovute al beta 1-3 glucano con ramificazioni beta 1-6, con la quantità di glucano superiore a quella di tutti gli altri funghi medicinali, potendo essa raggiungere il 14% dei polisaccaridi totali del fungo (Stamets, 2000). L'azione antitumorale degli estratti di *A. blazei* è dovuta sia ad un'azione indiretta che coinvolge la stimolazione della risposta immunitaria del paziente sia alla inibizione della neoangiogenesi che ostacola la formazione delle metastasi (Kimura et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Zhang et al., 2006). Inoltre gli estratti provocano l'apoptosi delle cellule tumorali ma non in quelle sane (Jin et al., 2006). Gli estratti di *A. blazei* inducono l'attività dei linfociti NK e stimolano la produzione di interferone gamma provocando in questo modo una più efficace eliminazione delle cellule tumorali dall'organismo (Benardshaw et al. 2005, Zhong et al., 2006). La risposta delle cellule dell'organismo ospite alla presenza degli estratti di *A. blazei* è mediata dai recettori cellulari del tipo toll like receptors (Kassai et al., 2004). Nell'AbM sono contenuti molti polisaccaridi citotossici e carcinostatici, isolati dal micelio, dal corpo fruttifero e dalle spore dai nomi più diversi (AB-P, ATOM, AB-FP) con un'azione, tra le altre citate, di promozione dell'attività della proteina p38 MAPK (Membrane Activate Protein Kinase) nella soppressione della linea cellulare HRA di carcinoma ovarico e nell'induzione dei processi di apoptosi come la traslocazione, dal citosol ai mitocondri, della proteina pro-apoptotica Bax,

accompagnata da rilascio di citocromo C e attivazione della caspasi 9. Molti di questi meccanismi biochimici implicano l'interazione tra le cellule deputate alla presentazione dell'antigene (APC-Antigen Presenting Cells), le cellule NK e i linfociti T citotossici con produzione di interferone gamma (citotossico e antiproliferativo) mentre specifiche interleuchine, come IL-12, sono responsabili dell'attivazione cellulare. Ma l'AbM ha la peculiarità dell'effetto antineoplastico non solo per i polisaccaridi, ma anche per quanto riguarda i lipidi e gli aminoacidi (proteine). Infatti l'AbM contiene il 3,6% di lipidi di cui il 73,2% sono fosfolipidi ad effetto antineoplastico (Wasser e Weiss, 1999) ed il suo alto contenuto di tirosinasi, enzima che catalizza la trasformazione dell'amminoacido tirosina in dopamina, consentendo all'organismo di produrre notevoli quantità di ubiquinone o coenzima Q, molecola fondamentale per il trasporto elettronico a livello mitocondriale, per il consumo di ossigeno e la produzione di energia. Nell'AbM è stata studiata l'attività antiangiogenetica dell'ergosterolo attraverso l'inibizione della neovascolarizzazione indotta da cellule di Lewis Lung Carcinoma (LLC) in topo attraverso contatto cutaneo e iniezione intraperitoneale a dosi crescenti: l'ergosterolo ha evidenziato un'azione di inibizione della neovascolarizzazione con modalità dose dipendente (Takaku et al., 2001). L'azione a livello immunitario dei polisaccaridi dell'AbM che consente anche un'azione citotossica sistemica antitumorale, si coniuga in maniera ottimale con quella dei lipidi che esercitano un'attività antitumorale diretta e specifica a livello cellulare, insieme a quella dell'ubichinone che attiva le capacità reattive delle cellule, ossigena i tessuti, stimola la depurazione tossinica. Secondo la letteratura scientifica l'effetto antineoplastico si esplica soprattutto nei confronti di: cancro solidi, cancro che si associano ad ascite (ovarico-epatico), cancro indotti da cancerogeni chimici. Vengono riportati successi terapeutici in pazienti con leucemia e linfomi soprattutto non-Hodgkin.

E' evidente come nell'officinale secondo l'invenzione l'arricchimento di quelle sostanze come amminoacidi e lipidi (ergosterolo) di cui è già portatore, non potrà che esaltare la sinergia con i beta-glucani di cui è il fungo più ricco, elevandolo a nutraceutico già nelle forma di alimento.

5 Per completezza è riportata nel micelio la presenza di un composto cancerogeno, l'agaritina, un'idrazina presente peraltro, ed in forma più concentrata, nel suo parente prossimo, l'*A. bisporus*. Ma si sottolinea che è nel micelio; comunque, il complesso biochimico nel corpo fruttifero contrasta efficacemente tale aspetto, facendo propendere per gli effetti anti
10 cancerogeni ben noti, essendo uno dei funghi anti cancro per eccellenza. Ma questo, unito alla segnalazione di effetti epatotossici fornito da medici giapponesi (Mukai et al., 2006), per il principio di precauzione, potrà indurre ad assunzioni cicliche soprattutto nei confronti di epatopazienti, analogamente a quanto già visto per lo Shiitake, prima dell'effettuazione di
15 ulteriori indagini cliniche ed epidemiologiche.

Altri funghi

Esistono altri funghi con proprietà medicinali utilizzabili nelle malattie oncologiche spesso non commestibili come *l'Inonotus obliquus*, *Fomes fomentarius*, *Cordyceps sinensis*, *Androdia camphorata*, etc. di cui, allo
20 stato attuale, sono insufficienti le informazioni circa le tecniche di coltivazione, i ceppi utilizzabili e le possibilità ed utilità degli ammendanti nella trasformazione a officinali secondo l'invenzione. Nella riserva di inserirli nell'elenco dei funghi officinali, insieme ad altri sulla base delle evidenze scientifiche, non si possono non inserire tre funghi non commestibili che
25 sono pietre miliari dei funghi medicinali per le malattie oncologiche: il *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*.

Per il fatto che sono privi di palatabilità e considerati funghi non commestibili secondo normative di vari paesi, l'assunzione di questi funghi può avvenire

solo sotto forma fungo secco/fresco, in infuso o nelle minestre, avendo l'accortezza di rimuoverli prima di consumare il pasto.

Ganoderma lucidum off.

Il Reishi, nome giapponese del *Ganoderma lucidum*, è forse il fungo tra quelli definiti "cinesi" per antonomasia più conosciuto e consumato al mondo per le virtù medicinali. Infatti pur avendo una consistenza duro-coriacea, pertanto non commestibile, risulta tra i funghi più consumati (e non solo negli infusi) proprio perché una sua assunzione quotidiana assicurava "lunga vita e buona salute", tant'è che è conosciuto come il fungo dei 3.000 anni o fungo degli imperatori cinesi.

Contiene: sali minerali (ferro, zinco, rame, manganese, potassio, magnesio, calcio, ma soprattutto germanio), vitamina B (folina), diciassette amminoacidi tra cui gli essenziali, polisaccaridi, steroli, sostanze ad attività antiistaminica (adenosina, triterpeni, acidi lucidenico, ganoderico etc).

Per la coltivazione solo recentemente si sono messe a punto tecniche automatizzate, anche se spesso la coltivazione è su base artigianale. I componenti del substrato sono segatura e trucioli di piante (88%), crusca di grano (10%), saccarosio (1%) e carbonato di calcio (1%) (Chiu et al., 2000). Dopo accurata miscelazione, previa aggiunta di polvere d'uovo al 1-2%, viene lasciato fermentare in un cumulo, più volte al giorno rivoltato, per 4-7 giorni, dopodichè è confezionato nelle bottiglie secondo l'invenzione e poi sterilizzato in autoclave a 121°C per due ore circa. In corrente d'aria sterile le confezioni sono aperte e seminate con micelio allevato su grano, aggiunto l'ammendante minerale alla concentrazione del 3‰ del substrato secco composto alla metà da sali di germanio, e quindi poste a incubare ad una temperatura media di 25°C al buio per 30 giorni. Viene quindi sottoposto ai cicli di CEM come di prassi. L'umidità ambientale deve essere alta (85-95%); la temperatura va dapprima abbassata (18-24°C) poi per due settimane finali per la fruttificazione va elevata a 25-28°C ed è necessaria

un'illuminazione pari a 750-1.500 lux per 12 ore al dì. Dopo la prima raccolta è possibile ottenere ancora un'altra produzione rovesciando la bottiglia e aprendo il tappo alla base, per un totale di circa 90 g di carpoforo da confezioni contenenti 700 g di composto. I CEM accorciano il processo di
5 circa 1/3 e permettono la saturazione in Ge.

Il *Ganoderma lucidum* è uno dei funghi più studiati dalla scienza ufficiale con oltre un migliaio di pubblicazioni, per le sue proprietà medicinali. Un gruppo complesso di polisaccaridi con proprietà immunostimolanti è stato isolato: tra loro ci sono beta-glucani, etero-beta glucani e chitino-xilo-
10 glucani; in studi su animali di laboratorio si sono evidenziati effetti antitumorali e antimetastatici dei polisaccaridi di questo fungo (Silva, 2004; Lu et al., 2004; Fan, 2005; Wang et al., 1997). In alcune linee cellulari dei tumori umani l'azione di questi composti sembra legata alla stimolazione dei macrofagi e linfociti T con la conseguente produzione di diverse citochine
15 come IL-1 e IL-6. Alcune glicoproteine stimolano la produzione delle cellule della milza, responsabili della maturazione dei linfociti, e produzione delle citochine (Hsu et al., 2004). In letteratura è riportata anche una proprietà antiossidante degli estratti di *G. lucidum* (Jones e Jenardhanan, 2000), evidenziata nella inibizione della perossidazione dei lipidi in alcuni sistemi
20 biologici e nella protezione dalla tossicità cardiaca acuta indotta da etanolo (Wong et al., 2004; Sun et al., 2004). Tale potente azione antiossidante, certificata da numerosi studi che dimostrano protezione da bronchiti e herpes, azioni pro-apoptotiche e antinfiammatorie insieme a quelle epatoprotettive, immunomodulatorie e antidiabetiche (Gao et al., 2003, Hsu
25 et al., 2004; Liu et al., 2004; Hong et al., 2004; Fan et al., 2005; Kim et al., 2005; Myojin et al., 2005; Li et al., 2005), è dovuta alla presenza di germanio in discreta quantità, il più potente antiossidante esistente in natura, che, secondo l'invenzione, viene concentrato con l'ammendante.

Tra le altre cose la presenza di germanio con la sua potente capacità antiossidante, è il motivo delle due uniche patologie oncologiche in cui è accertato un ruolo dello stress ossidativo e dove il *G. lucidum* è indicato: il carcinoma nasofaringeo e la leucemia mieloide cronica.

- 5 Sostanzialmente il *G. lucidum officinale* è un grande concentrato di germanio organico, pertanto l'ammendante potrà subire modifiche rispetto allo standard, aumentando il dosaggio proprio di germanio inorganico al 50%. L'attività antiossidante dovuta al germanio, metalloide idrosolubile, è collegata a quella anti-ossidante che perdura nel tempo dell'ergotioneina, risultando il Ge molto più attivo e potente anche nella forma di assunzione
10 raccomandata, tisana in acqua calda, che è quella che meglio si presta all'azione disciolta dell'oligoelemento con tropismo amplificato in tutte le patologie oncologiche dell'apparato respiratorio e gastrointestinali.

Coriolus versicolor off. super ed extra

- 15 Tra i funghi medicinali è quello più intensamente studiato per le sue molteplici proprietà e per l'azione anticancro, svolta da sostanze estratte dai carpofori e dal micelio. Questo basidiomicete appartiene alla categoria dei funghi che degradano la lignina. Da questa proprietà deriva gran parte dell'azione antineoplastica del *C. versicolor*. La lignina è un materiale
20 polimerico che rinforza la parete delle cellule vegetali fungendo da matrice per le microfibre di cellulosa. E' uno dei materiali più resistenti in natura che deve accoppiare resistenza agli agenti atmosferici e radiazioni ultraviolette con elasticità e plasticità. Le laccasi fungine, in particolare quelle del *C. versicolor* (Crisante, Università della Tuscia, 2013) sono le uniche che
25 possono degradare la lignina a composti dapprima monomerici, lignani, che ad idonee concentrazioni e assunti nei sistemi viventi, possono agire da metaboliti secondari, oppure arrivare ai costituenti base inglobati nei polisaccaridi, proteine o nei lipidi costituenti il fungo stesso. I monomeri lignani (due unità di 2-fenilpropano) derivati dal catabolismo fungino sono

enantiomericamente puri perché sono prodotti da un accoppiamento controllato stereochimicamente, e quindi attivi, ma la maggior parte dei lignani della dieta è fornita dai semi di lino che contiene in prevalenza secoisolariciresinolo (maggiore di 3,7 g/kg del peso secco). Ciò vale in particolare per il fungo *C. versicolor* e *P. ostreatus*. Sono noti gli studi recenti sull'azione dei semi di lino contro il cancro della mammella. Probabilmente le laccasi sono aidate dalle alte temperature prodotte nel substrato che si sviluppano durante il processo fermentativo e da qualche altro enzima. I processi di degradazione ossidativi della lignina, che avviene ad opera delle laccasi ma a temperature più basse, sono mediati da una classe di molecole chimiche dette mediatori che mediano allostericamente la reazione tra enzima, substrato molecolare e ossigeno per mantenere la reazione al basso potenziale redox delle laccasi. Il sistema O₂/laccasi/mediatore (Crisante, 2013) è stato impiegato per l'ossidazione della porzione benzilica delle catechine ottenendo composti ad attività chemiopreventiva e anticancro come le taxifoline e i precursori delle proantocianidine. Tutto questo per dire che durante il processo di degradazione fermentativo del substrato come in quello di incubazione e di sviluppo del micelio, ad opera delle laccasi, vengono prodotti metaboliti secondari aventi attività biologica (BAM) come i lignani e proantocianidine che già agiscono contro il cancro e alla fine molecole base componenti dei peptido-polisaccaridi, i più conosciuti anticancro del *C. versicolor* come il PSK (Polisaccaride K-Krestina) e il PSP (Peptide-polisaccaride).

Un metodo quindi per aumentare i lignani, le proantocianidine, il PSP e il PSK è aumentare le laccasi e questo si ottiene aggiungendo rame al substrato. Probabilmente in natura la quantità dei composti attivi è in relazione alla quantità di rame presente disperso nel terreno. Se si spinge la fermentazione ad alte temperature e basso tenore di ossigeno si ottengono più lignani e proantocianidine nel micelio e poi nel corpo fruttifero (*C.*

versicolor off. super). Se si arresta la fermentazione precocemente abbassando la temperatura e arieggiando il composto, si avrà una fruttificazione repentina e un carpoforo più ricco in PSP e PSK (*C. versicolor* off. extra).

- 5 Il substrato di crescita ottimale è formato da segatura e da un trinciato di numerose piante forestali con una composizione simile a quella del *Lentinus edodes*. Il substrato è inumidito al 65-70%, viene aggiunta polvere d'uovo al 2-3% del peso secco e lasciato fermentare per qualche giorno, dopodiché inserito nelle bottiglie secondo l'invenzione, quindi sterilizzato in autoclave.
- 10 La semina è fatta utilizzando micelio allevato su segatura e trucioli a cui va aggiunto contestualmente l'ammendante minerale ad una percentuale del 2-3‰ del peso secco, composto all'80% da composti minerali rameici. L'incubazione è svolta ad una temperatura di circa 25°C per circa tre settimane. Al termine le confezioni sono aperte superiormente per favorire lo
- 15 sviluppo dei basidiomi. Le condizioni necessarie nelle varie fasi di crescita dei funghi sono una temperatura di 18-25°C, un'elevata umidità, un buon ricambio d'aria (CO₂ a 500-1.000 ppm) ed un'illuminazione di 500-2.000 lux. Viene esposto anche ai CEM come di prassi. Dalla comparsa dei primordi alla maturazione intercorrono circa 40-50 giorni (20-30 giorni con i CEM e
- 20 inglobamento del Cu al 100%). Dopo la raccolta l'irraggiamento produce un discreto quantitativo di vitamina D₂. Le volate nel corso di più mesi possono essere due o tre con una produzione del 10-20% del peso secco della bottiglia.

- Il PSK è stato isolato in Giappone negli anni 60. Esso è composto per il 68% da polisaccaride e per il 32% da proteina. Il suo peso molecolare è 94-100
- 25 KDa. Il polisaccaride è composto dai monomeri di D-glucopiranosio legati nella catena principale con legami beta 1-4 e con legami beta 1-3 nelle catene laterali. Queste ultime, a loro volta, possiedono altre diramazioni laterali unite con legami beta 1-6 le quali legano il polisaccaride alla parte

proteica della molecola tramite legami O-N glucosidici. Nella parte polisaccaridica lo zucchero principale è il glucosio ma ne sono presenti anche altri. La parte proteica è ricca di amminoacidi come l'acido aspartico e l'acido glutammico (Kidd, 2000). Il PSK rappresenta in peso circa 1/3 dei polisaccaridi estratti dal micelio. I risultati in vitro e su animali da laboratorio dimostrano l'efficacia del PSK nel trattamento di alcuni tumori: adenosarcoma, fibrosarcoma, mastocitoma, plasmocitoma, melanoma, sarcoma, carcinoma mammario, polmonare e colon (Tsukagoshi et al., 1984).

Il PSP è stato isolato in Cina negli anni 80 ed ha un peso molecolare di 100 KDa. E' strettamente legato alla struttura del PSK e se ne differenzia perché i legami nella catena principale sono per lo più beta 1-3 alternati a qualche alfa 1-4; anche in questo caso lo zucchero principale è il D glucosio. Gli esperimenti su animali hanno dimostrato che il PSP stimola la proliferazione di cellule T e la produzione di gamma interferone e interleuchina 2 (Ng, 1998). E' stato dimostrato che il PSP è un composto non tossico con attività immunostimolante che migliora sia la qualità della vita dei pazienti affetti da tumore che la loro sopravvivenza (Jong e Yang 1999). Inoltre allevia gli effetti collaterali e previene la depressione del sistema immunitario in pazienti sottoposti a rischiamo uterino diagnostico terapeutico (RDT) e chemioterapia (CHT) (Ng, 1998). Il PSP ha dimostrato di avere un'azione diretta contro diversi tipi di tumore come quello dello stomaco e dell'apparato respiratorio, potenziata dalla sua capacità di indurre apoptosi nelle cellule tumorali ma non in quelle sane (Dong et al., 1996; Jong e yang, 1999; Heish et al., 2002; Chow et al., 2003; Tsang et al., 2003; Yang et al., 2005). Comunque, non tutti i tumori rispondono al trattamento (Dong, 1997). Anche il PSP possiede proprietà antimetastatiche per inibizione della neoangiogenesi (Ho et al., 2004).

Sia il PSK che il PSP sono ben assorbiti e tollerati oralmente e, considerata l'estrema tollerabilità, si possono utilizzare fino a 20 g di carpoforo essiccato al giorno per le tisane e fino a 5 g al dì nelle capsule.

La doppia tipologia di produzione, più lignani o più polisaccaridi, ottenuta ammendando il substrato con rame e modulando la fermentazione, garantisce un'importante presenza dell'enzima laccasi precoce o tardiva, che determina caratteristiche finali del fungo differenti per concentrazione di lignani o polisaccaridi PSP-PSK arrivando a due tipologie di *Coriolus versicolor officinalis*, la super o la extra che potranno essere utilizzate tanto in carcinomi diversi con più o meno compromissione immunitaria, quanto in fasi della stessa malattia oncologica con più o meno azione citotossica diretta o di inibizione neoangiogenesi/metastasi.

***Phellinus linteus* off.**

Il *Phellinus linteus* (*P.l.*), in inglese Meshima, è un basidiomicete appartenente alla famiglia delle poliporacee. E' un fungo molto utilizzato nella medicina popolare dell'estremo oriente, soprattutto nelle patologie gastrointestinali e nel diabete. L'attività farmacologica è dovuta ai polisaccaridi, di varia composizione, con capacità antiossidante, antidiabetica e antitumorale. Infatti il *P.l.* è uno dei funghi più importanti e studiati nel cancro, per le capacità di immunomodulazione, a partire dallo studio pubblicato e con ampio risalto mediatico sul British Journal of Cancer nel 2008 di Sliva et al., circa l'effetto inibitorio (AKT mediato) sulla crescita, angiogenesi e invasività delle cellule di cancro della mammella. Ma già dal 1969 Chihara et al., riuscì a dimostrare che estratti polisaccaridici del *P.l.* sopprimevano la crescita tumorale in vivo, più di recente composti furopiranonici hanno dimostrato attività nei confronti delle cellule del melanoma murino e di adenocarcinoma polmonare umano. Kim et al. nel 2006 dimostrarono che un complesso polisaccaridico estratto da *P.l.* incrementa enormemente la proliferazione dei linfociti B, la produzione di

citochine e di ossido nitrico dai macrofagi e soprattutto la citolisi delle cellule YAC-1 di linfoma in vitro. A quello studio ne seguirono altri che hanno dimostrato l'azione del *P.I.* di stimolo dei linfociti NK. Gli NK sono conosciuti per la loro abilità di lisare vari tipi di cellule tumorali dall'esocitosi di granuli
5 contenenti perforine che causano la lisi della cellula attraverso la "perforazione" della membrana cellulare. In più gli NK sono responsabili di effetti inibitori sulla crescita tumorale sia precoci che tardivi correlando il numero assoluto di linfociti NK sia sulla capacità di sopravvivenza dei pazienti con inibizione della progressione di malattia e sia nella risposta alla
10 CHT, in particolare nel cancro del pancreas (Davis et al., 2012) suggerendo che tali effetti indotti dal *P.I.* sull'immunomodulazione riguardano specialmente l'attività cellulare NK. Il potere immunomodulante del *P.I.* è stato confermato clinicamente nel 2013 (Chang et al.) sempre nell'adenocarcinoma del pancreas, dove un complesso polisaccaridico commerciale estratto da *P.I.* (Aclang) è stato utilizzato in uno studio
15 retrospettivo come adiuvante alla CHT su 103 pazienti dopo resezione chirurgica di adenocarcinoma duttale del pancreas, con risultati significativi sulle recidive per l'incremento dell'intervallo libero da malattia di quasi il triplo in quelli trattati con CHT+Aclang rispetto a quelli senza *P.I.*. Questi
20 risultati sul cancro del pancreas, uniti a quelli sul carcinoma del colon (Song et al., 2011, Li et al. 2011), cancro della mammella (Lu et al. 2009, Sliva et al., 2008), e carcinoma del polmone (Guo et al., 2007), rendono *P.I.* uno dei funghi più attivi contro il cancro per un'azione immunomediata che sposta l'equilibrio Th1-Th2 verso Th2 con attivazione citotossica diretta tramite i
25 linfociti NK con effetto di soppressione della crescita delle cellule cancerose, diminuzione delle recidive, di stimolo e rinforzo della CHT con riduzione degli effetti collaterali e del dolore, ed anche nella prevenzione del cancro. L'immunomodulazione prodotta dal *P.I.*, è presente anche per altre malattie come allergie e intolleranze alimentari, sindrome dell'intestino poroso e

artrite, nelle quali è rilevante l'azione anche della grande quantità di chitina del *P.I.*, un polisaccaride indigeribile che si comporta un po' da malta che tura le lesioni alle pareti dell'intestino e un po' da regolatore della flora batterica agendo sui linfonodi e sull'equilibrio immunitario locale.

5 Tra i componenti minerali il *P.I.* contiene oltre al rame anche germanio (varietà *rimosus e gilvus*, Chenghom 2010) e rappresenta una via di mezzo tra il *Coriolus versicolor* ed il *Ganoderma lucidum*.

Questo dato è confermato anche dalla tecnica di coltivazione in officinale che ricalca fedelmente quella descritta per il *Coriolus versicolor* con alcune
10 varianti *Ganoderma lucidum* dipendenti, con una sostanziale variante di concentrazione dell'ammendante minerale (2-3‰ del peso secco del substrato) sbilanciato tra le due componenti (Ge e Cu) che rappresentano parimenti il 70% del composto minerale. L'officinalità secondo la presente
15 invenzione potenzia le azioni fisiologiche delle sostanze presenti nel *P.I.* garantendone un buon assorbimento soprattutto sotto forma di tisana e tè, grazie all'estrazione in acqua calda dei minerali e polisaccaridi presenti, oltre all'ottimale e gradevole modalità di assunzione per la popolazione oncologica di riferimento.

Altri funghi considerati commestibili

20 ***Hericium erinaceus off.***

E' un fungo raro, commestibile, parassita che predilige gli alberi di quercia ancora vivi. Il corpo fruttifero assomiglia alla testa di una scimmia per cui in Asia è conosciuto con questo nome. Contiene su 100 g, 31,7 g di proteine, 4 g di grassi, 9,8 g di ceneri, 17,6 g di carboidrati, 30 g di fibre, 1,2 mg di sodio, 1,2 mg di fosforo, 20,3 mg di ferro, 1,3 mg di calcio, 4,46 mg di
25 potassio, 123 mg di magnesio, 5,3 mg di tiamina, 3,9 mg di riboflavina, 240 UI di ergocalciferolo, 18,3 mg di niacina, 381 mg di ergosterolo e tracce di zinco, germanio, e selenio. Contiene beta-glucani e vari polisaccaridi (ericononi, etc) ad effetto anticancro esofageo e gastrico (Ying, 1987) ed un

fattore (erinacina) stimolante la crescita nervosa (NGF) (Kawagishi 1991-94) potenzialmente utile per le demenze. Estratti acquosi polisaccaridici sono utili nelle malattie dell'apparato gastro intestinale come gastriti, ulcere, rettocolite ulcerosa etc. L'azione degli estratti polisaccaridici sul cancro gastrico ed esofageo è immunomediata.

La coltivazione in officinale è analoga a quella del *Lentinus edodes* (Shiitake): la fase di crescita del micelio su substrato addizionato di polvere d'uovo al 2-3% del peso secco, varia dai 10 ai 14 giorni ad una temperatura compresa tra 21 e 24°C con un'umidità relativa dal 95 al 100% e CO₂ da 5000 a 40000 ppm. I CEM dall'inizio saranno di bassa potenza. Attorno al 7° giorno si aggiungono nel contenitore i sali ad una proporzione del 1-2‰ con una preponderanza (70%) fra selenio e germanio ed il rimanente in parti uguali di Zn e Cu. L'obiettivo di questa supplementazione è dare una sferzata nell'officinale di antiossidanti. La formazione dei primordi si ottiene in 3-5 giorni (1-2 giorni con CEM) incrementando la ventilazione diminuendo così la temperatura a 10-15°C e la CO₂ a 500-700 ppm e soprattutto illuminando (500-1000 lux). Lo sviluppo dei carpofori, con il CEM ad alta potenza, avviene in poco tempo (4-5 giorni) innalzando la temperatura a 18-24°C e mantenendo stabili gli altri parametri. Possono esservi altre 1-2 volate.

Vista la già buona presenza di ergosterolo e di vitamina D2 nel fungo fresco, l'incremento tramite luce pulsata avrà un andamento esponenziale potendo raggiungere agevolmente le 2000 UI per porzione e pro die. Questo fungo rappresenta un buon compromesso per le capacità organolettiche come alimento e le proprietà implementate, ma non spinte all'esasperazione, come fungo officinale, dimostrando che si può ottenere un fungo realmente efficace sulle neoplasie, soprattutto gastro-intestinali, e che può esser assunto come alimento quotidianamente ed in vari modi ed infine anche gradevole al palato.

Poria cocos off.

E' un ascomicete associato alle radici di conifere, e lo sclerozio (considerato un tartufo) viene accanitamente ricercato e avidamente consumato in Africa e nel sud est asiatico. In oriente nella medicina popolare è utilizzato da
5 millenni come sedativo e diuretico. Da esso sono stati isolati polisaccaridi e triterpeni a cui è stata attribuita azione immunomodulante e antitumorale. E' spesso utilizzato, insieme a piante ed erbe, nel trattamento dell'epatite. Eteropolisaccaridi solubili isolati da *Poria cocos* hanno dimostrato proprietà antitumorali su linee cellulari di carcinoma gastrico e sarcoma 180. Alcuni
10 BAM isolati dallo sclerozio (ergosterolo perossido, acido tumulosico, ac. pachimico etc) e composti triterpenici hanno dimostrato forte effetto inibitorio su linee cellulari di carcinoma colo rettale e gastrico in vitro.

Le tecniche di coltivazione e di trasformazione in officinale derivano dalla prima fase (formazione sclerozio) di quella già descritta per la *Morchella*
15 *conica*.

Non conoscendosi appieno le potenzialità nelle malattie neoplastico/degenerative, si ritiene che l'officinalità implementi le capacità generiche immunomodulanti e antitumorali. Può essere assunto così come si fa per altri tuberi, potendo essere utilizzato anche come condimento per
20 paste alla stregua del tartufo per la riferita gradevolezza dell'aroma che lo ricorda.

I funghi così ottenuti e processati con concentrazione e standardizzazione di sostanze biologicamente attive nella prevenzione e trattamento del malato oncologico/degenerativo, raggiungono attività funzionale terapeutica a
25 quella salutistica di base già presente, potranno così aggiungere il suffisso di "off." (*officinalis, e*) al nome scientifico latino di specie.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo chimico-fisico di produzione di funghi arricchiti di sostanze biologicamente attive, ottenuti in contenitori di substrato pre-dosato nell'ambiente di una serra tecnologica, comprendente i passi di:

- isolamento e sviluppo pre-semenza del micelio della specie fungina desiderata,
- maturazione del substrato,
- semina del micelio,
- incubazione del micelio con sviluppo dei primordi fungini in condizioni controllate e assistite tramite macchinari e processori atti a regolare temperatura, umidità e irraggiamento,
- sviluppo dei carpofori,
- loro raccolta,
- loro trattamento con luce pulsata allo scopo di stimolare la produzione di vitamina D₂,

caratterizzato da:

- un trattamento fisico per esporre a campi elettromagnetici (CEM) detto ambiente durante tutti i passi precedenti la raccolta, al fine di migliorare la capacità metabolica del substrato promuovendo la produzione enzimatica di metaboliti attivi e l'organizzazione di oligoelementi inorganici per il miglioramento qualitativo e quantitativo dei funghi, e
- un trattamento chimico coll'aggiunta nel substrato di polvere d'uovo, e successivamente alla semina del micelio, di oligoelementi inorganici, con il risultato di ottenere funghi officinali, cioè dotati di capacità terapeutiche in particolare in campo oncologico ed in generale contrastanti la degenerazione cellulare in svariate malattie.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto CEM è di 15-25 mT per un intervallo di 10-20 min/die fin dal passo di isolamento e sviluppo pre-semenza del micelio e per tutte le fasi fino allo sviluppo dei primordi fungini,

successivamente è di 100 mT per un intervallo di 2-3 min/die fino alla raccolta, per un sensibile accorciamento dei tempi di produzione, in particolare durante l'incubazione e lo sviluppo dei carpofori dai primordi fungini.

5 3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la polvere d'uovo è aggiunta al substrato in un rapporto in peso compreso in un intervallo di 2 a 3% del peso secco del substrato nel contenitore, in maniera che il carpoforo sviluppi un quantitativo biologicamente attivo di ergotioneina.

10 4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detti oligoelementi inorganici comprendono un complesso di sali di selenio, germanio, zinco e rame.

5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui detti sali sono aggiunti in un rapporto in peso compreso fra 1 e 3‰ del peso secco del substrato nel contenitore.

15 6. Contenitore per la produzione di funghi arricchiti in sostanze biologicamente attive sotto forma di una bottiglia cilindrica con un asse longitudinale, in materia plastica, dotata di una bocca superiore (1) con un tappo superiore (3) e di un fondo, caratterizzato dal fatto che il fondo è dotato di una bocca inferiore (2) e dotato di un tappo inferiore (4), la
20 bottiglia essendo provvista di una coppia di beccucci (5, 6) chiudibili per il passaggio di liquido.

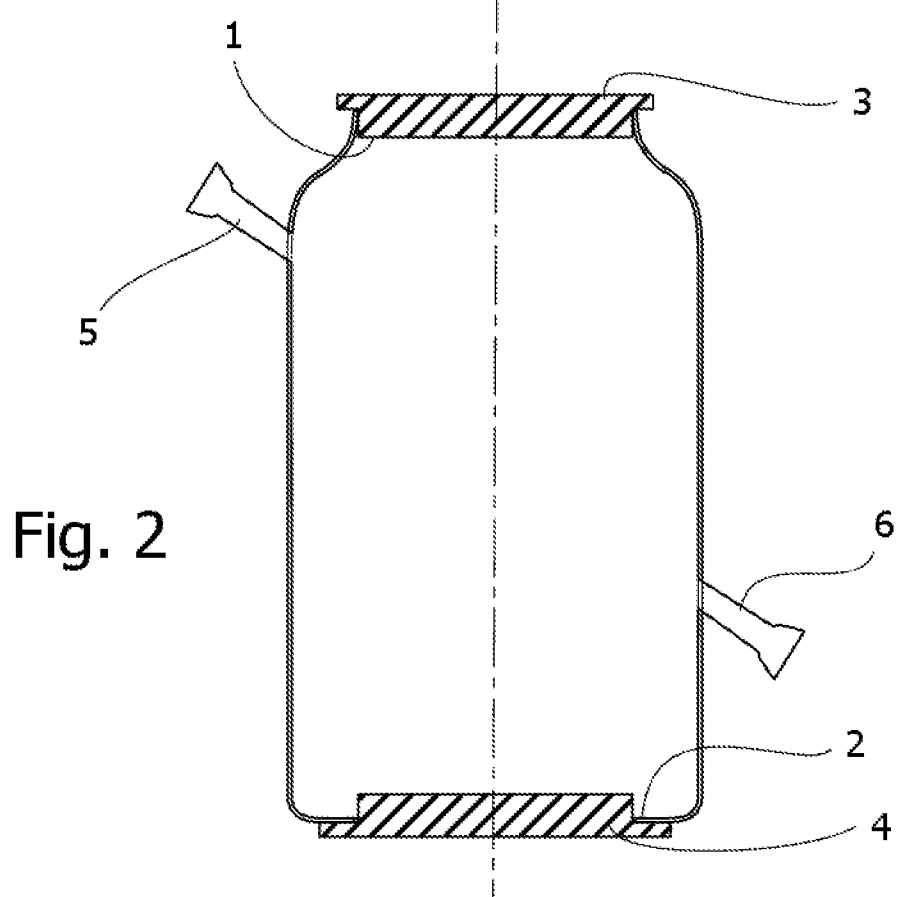
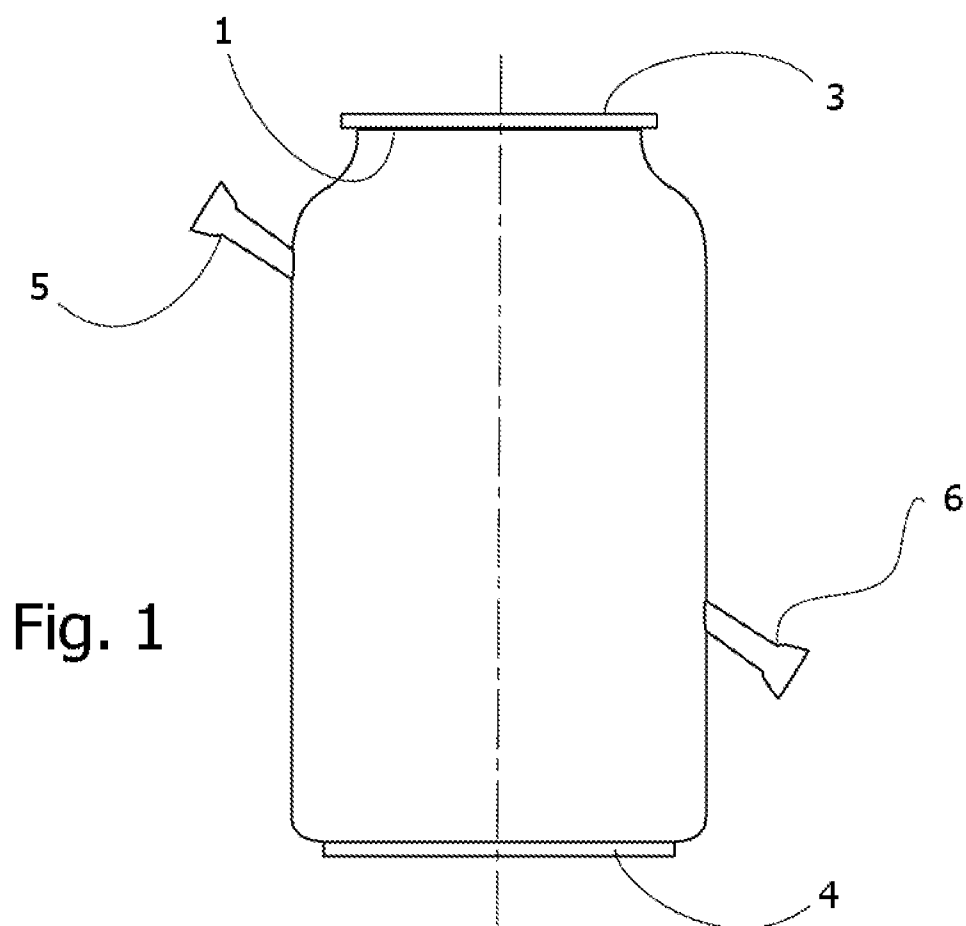
7. Contenitore secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che il contenitore ha un volume di un litro, riempito di substrato per circa $\frac{3}{4}$.

25 8. Contenitore secondo la rivendicazione 6, in cui i beccucci (5, 6) di detta coppia sono disposti in prossimità del fondo e della bocca superiore (1) angolati verso questi rispetto all'asse longitudinale della bottiglia, al fine di consentirne l'apposizione su cestelli inclinati nelle scaffalature di produzione in serra e la loro rotazione nel collegamento dei beccucci (5, 6) a tubi di irrigazione secondo le fasi di crescita previste per le specie di funghi.

9. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui le specie fungine vengono scelte dal gruppo comprendente: *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* "Shiitake", *Flammulina velutipes*, *Morchella conica* Parsons, *Auricularia auricula-judae* (L.:Fr.) Schroeter, *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., *Tremella fuciformis* Berk. Brand, *Agrocybe aegerita*, *Pholiota nameko*, *Hypsizygus tessulatus* (Bull.) Singer, *Hypsizygus ulmarius*, *Grifola frondosa* "Maitake", *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, *Hericium erinaceus*, *Poria cocos*.

10. Uso di funghi caratterizzato dal fatto che essi sono arricchiti di sostanze biologicamente attive e standardizzati, per essere destinati al consumo come alimento, sia freschi che secchi e sia interi che in polvere, nella prevenzione e trattamento delle malattie neoplastico-degenerative, in quanto dotati di attività funzionali e proprietà terapeutiche oltre alle loro capacità nutrizionali, distinguendosi dalla specie comune mediante il suffisso *officinalis*, e (abbrev. *off.*) da aggiungersi al nome scientifico latino di specie.

1/2



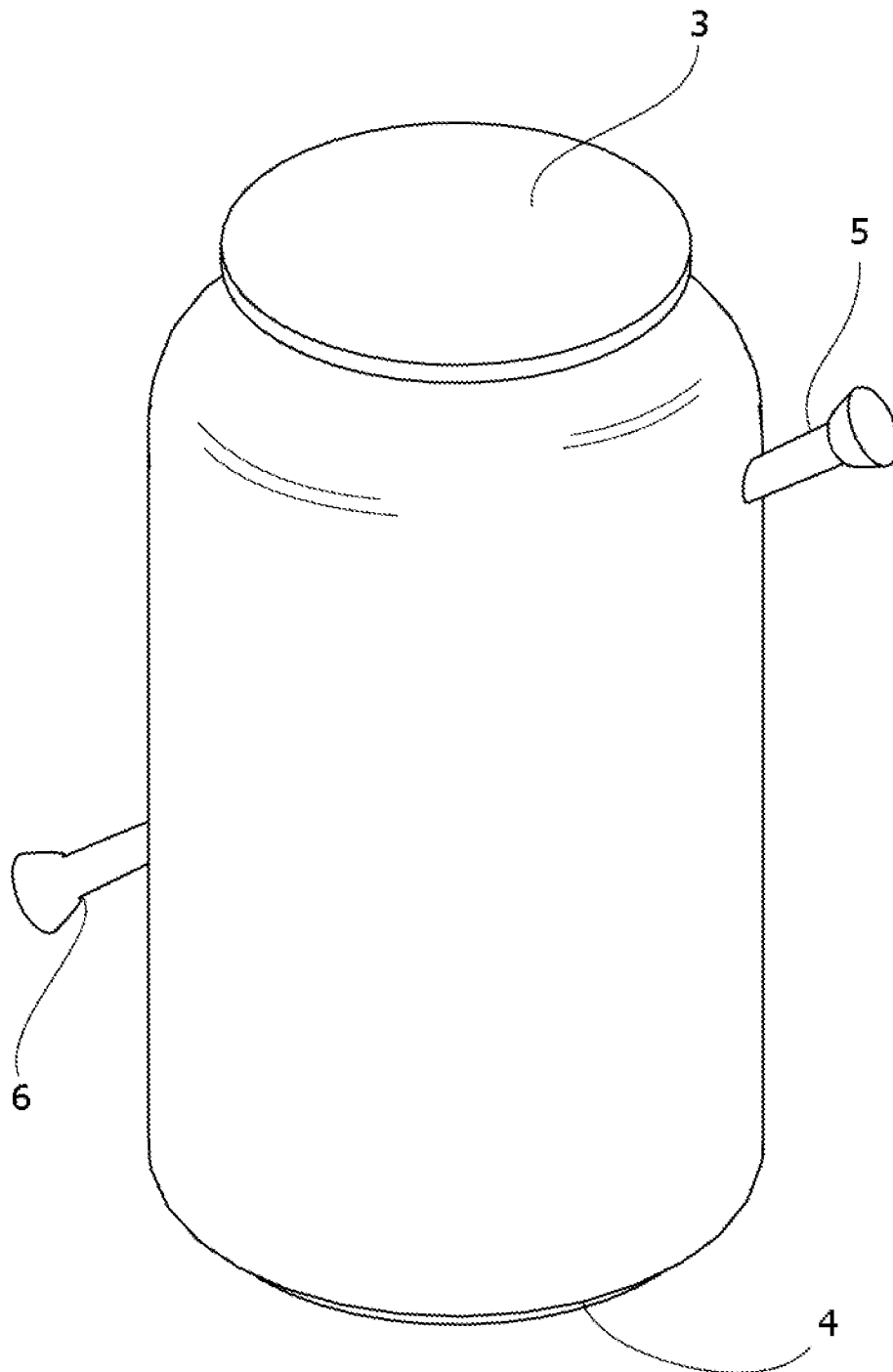


Fig. 3