

Politecnico di Milano
Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



POLITECNICO
MILANO 1863

**PROGETTAZIONE DI UN METODO PER LA CRESCITA E IL
CONDIZIONAMENTO MULTIMODALE DI MICETE PER
L'INGEGNERIA DEI TESSUTI BIOLOGICI**

Relatrice: Prof.ssa Sara Mantero

Tesi di Laurea Magistrale di:

Silvia Riviera 953641

Anno Accademico: 2021 – 2022

CONTENUTI

SOMMARIO.....	3
ABSTRACT.....	4
PREFAZIONE.....	5
1.0 INTRODUZIONE.....	6
1.1 OBIETTIVO	6
1.2 MEDICINA RIGENERATIVA E INGEGNERIA TISSUTALE	7
1.2.1 SCAFFOLD NELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI.....	10
1.2.2 BIOREATTORI	13
1.3 IL MICELIO	15
1.3.1 MATERIALI A BASE DI MICELIO	15
2.0 ANALISI DEI BREVETTI	17
2.1 MYCELOUM MATERIALS AND METHODS FOR PRODUCTION THEREOF	18
2.2 INCREASED HOMOGENEITY MYCOLOGICAL BIOPOLIMER GROWN INTO VOID SPACE.....	22
3.0 SVILUPPO DI UN MODELLO DI BIOREATTORE PER LA STIMOLAZIONE CONTROLLATA DELLA CRESCITA IFALE.....	27
4.0 RICERCA DI UN PROTOCOLLO DI CRESCITA OTTIMALE E DIREZIONATA DI PLEUROTUS OSTREATUS	30
4.1 INDIVUAZIONE DEL CEPPPO DI MICETE OTTIMALE PER IL NOSTRO SCOPO: IL PLEUROTUS OSTREATUS.....	32
4.1.1 INATTIVAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA.....	32
4.1.2 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA.....	33
4.1.3 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA.....	34
4.1.4 CARATTERIZZAZIONE IDRODINAMICA.....	35
4.1.5 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA.....	36
4.1.6 SAGGI DI BIOCAMPATIBILITA'	36
4.1.7 CRESCITA DIRETTA DI FIBROBLASTI UMANI PRIMARI SUL MICELIO....	37
4.1.8 CONCLUSIONI.....	38
4.2 LA RETE MICORRIZICA.....	39
5.0 CONCLUSIONI.....	41
6.0 BIBLIOGRAFIA.....	42

Sommario

La mia ricerca presso il Politecnico di Milano mira ad analizzare il micete, organismo vegetale ormai consolidato come possibile futuro biomateriale grazie alle sue incredibili qualità naturali. Il micelio, infatti, ha la capacità di crescere autonomamente, oltre ad avere delle ottime caratteristiche di biodegradabilità. Queste proprietà in particolare suggeriscono il suo possibile impiego all'interno di un vasto range di applicazioni appartenenti a diversi campi, tra cui quello biomedico, all'interno del quale si articola la mia analisi.

Essendo un argomento di frontiera è evidente che la mia base di studio oltre che la letteratura siano stati i brevetti. Il primo e fondamentale step è stata, infatti, un'analisi brevettuale volta alla comprensione di quali fossero, ad oggi, i traguardi raggiunti in merito al trattamento e potenziamento del micelio. Focalizzandomi poi unicamente sui brevetti che già avessero o che potenzialmente potessero avere risvolti in campo biomedico, ho potuto circoscrivere lo scopo della mia ricerca che assunse così la forma di progettazione di un metodo per la crescita e il condizionamento multimodale del micelio per l'ingegneria dei tessuti.

Traendo spunto dai vari brevetti analizzati ho così cercato di ideare in primis un nuovo concetto di bioreattore per la stimolazione miceliale, ovvero un bioreattore che potesse condizionare e direzionare la crescita ifale grazie al contributo sinergico di più stimoli fisici che fino ad ora venivano utilizzati singolarmente.

Procedendo poi con il mio studio ho identificato, tramite approfondimenti bibliografici – biomimetici, un possibile nuovo approccio anche dal punto di vista della composizione del medium migliore possibile per il micelio. Nello specifico ho cercato di comprendere a pieno quali fossero le dinamiche naturali a cui sottende il micelio e quali fossero le sostanze di cui necessita e che ricerca spontaneamente, andando ad approfondire soprattutto la rete miceliale naturalmente presente nel sottosuolo: la rete micorrizica.

Abstract

My research at Politecnico di Milano aims to analyze the mycelium, a plant organism now established as a possible future biomaterial due to its incredible natural qualities. Mycelium, in fact, has the ability to grow autonomously, as well as having excellent biodegradability characteristics. These properties in particular suggest its possible use within a wide range of applications belonging to different fields, including the biomedical field, within which my analysis is articulated.

Being a frontier topic, it is evident that my basis of study as well as the literature has been patents. The first and fundamental step was, in fact, a patent analysis aimed at understanding what milestones had been achieved to date with regard to mycelium treatment and enhancement. Focusing then solely on patents that already had or potentially could have implications in the biomedical field, I was able to circumscribe the scope of my research, which thus took the form of designing a method for multimodal mycelium growth and conditioning for tissue engineering.

Drawing from the various patents analyzed, I thus tried to devise first of all a new concept of a bioreactor for mycelial stimulation, i.e., a bioreactor that could condition and direct hyphal growth through the synergistic contribution of multiple physical stimuli that until now were used individually.

Proceeding then with my study, I identified, through bibliographic-biomimetic insights, a possible new approach also from the point of view of the composition of the best possible medium for the mycelium. Specifically, I tried to fully understand what were the natural dynamics underlying the mycelium and what were the substances it needs and spontaneously searches for, going deeper especially into the mycelial network naturally present in the subsoil: the mycorrhizal network.

Prefazione

La mia ricerca presso il Politecnico di Milano pone le radici all'interno di un terreno fertile come quello del Politecnico di Milano e quello della SMUSH Materials. Quest'ultima vincitrice della XIII edizione di Switch2Product|Innovation Challenge, programma che valorizza soluzioni innovative, nuove tecnologie e idee di impresa proposte da studenti e laureati, ricercatori, alunni e docenti del Politecnico di Milano, organizzato da Polihub, la SMUSH Materials si pone come obiettivo lo sviluppo di piattaforme di crescita circolare grazie al micelio, l'apparato vegetativo dei funghi.

Il Politecnico di Milano mi ha permesso nel corso degli anni di scoprire vere e proprie passioni più che materie, come quelle che mi hanno accompagnata anche nel percorso di questa mia tesi magistrale: in primis, l'ingegneria dei tessuti e la biomimetica. Sono profondamente convinta che il futuro stia nel passato, nel ritrovare quella che è la nostra vera essenza, nel reimparare dalla natura.

Un esempio chiave di tutto ciò è il protagonista di questo mio elaborato: il micelio.

Il micelio, come verrà approfondito di seguito, degradandosi, produce scarti organici trasformandoli in una nuova risorsa, utilizzabile per applicazioni nel capo del packaging, ponendosi come sostituto sostenibile delle risorse plastiche.

Il mio obiettivo principale all'interno di questa dimensione di ricerca, è stato quello di avvicinare il più possibile il lavoro portato avanti nella SMUSH Materials al mondo biomedicale: valutando opportunamente, attraverso l'analisi e lo studio dei brevetti ad oggi registrati, come e per cosa viene utilizzato il micelio, ho potuto comprendere meglio quali potessero essere le strategie implementabili per poter arrivare ad un metodo che permettesse di direzionare la crescita del micelio.

1. Introduzione

1.1 Obiettivo

Protagonista di questa tesi è la nuova famiglia di materiali auto-crescenti rappresentata dal micelio, il sistema vegetativo e locomotore di tutti gli organismi fungini, introdotto nel settore biomedico per prodotti e dispositivi e come biomateriale per la produzione di scaffold.

L'approccio tradizionale seguito nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria tissutale consiste nell'isolamento delle cellule e nella loro coltura su scaffold 3D porosi biodegradabili. Il costrutto viene poi inserito in un ambiente controllato, noto anche come bioreattore, per replicare una porzione di tessuto o organo in grado di sostituire il sito danneggiato o addirittura la parte mancante.

I materiali utilizzati per costruire l'impalcatura, ad oggi, sono generalmente polimeri biodegradabili che possono essere sintetici o naturali. I polimeri naturali possono essere ottenuti dopo un processo di estrazione, come la purificazione, da una fonte naturale: per questo motivo, sono noti anche come "materiali biobased". L'architettura dello scaffold deve soddisfare requisiti specifici per garantire l'integrazione dei tessuti e la rigenerazione finale. La struttura biocompatibile ideale deve essere regolata in termini di porosità, proprietà meccaniche e degradative per imitare la matrice extracellulare (ECM) del tessuto e promuovere la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

I processi di produzione degli scaffold attualmente sviluppati garantiscono un'elevata riproducibilità e processabilità a scapito dei tempi di lavorazione e dei costi.

Le tecniche di decellularizzazione rappresentano una valida alternativa all'ingegneria degli scaffold, in quanto prevedono diverse procedure di scissione di organi allogenic per eliminare i componenti cellulari dal tessuto e isolare la ECM, ambiente fisiologico perfetto per la crescita cellulare.

Negli ultimi anni, l'ingegneria tissutale si è concentrata sia sul miglioramento delle tecniche di fabbricazione degli scaffold esistenti, sia sull'esplorazione della possibilità di

utilizzare strutture naturali o bioispirate come scaffold, sfruttando la capacità unica di riproduzione degli organismi biologici, impossibile da duplicare. Così, alcune strutture disponibili in natura potrebbero essere utilizzate in campo biomedico attraverso un processo di purificazione minimo, mantenendo la loro architettura peculiare.

Il micelio è sicuramente un buon candidato per scopi biomedici e di ingegneria tissutale, mostrando caratteristiche uniche come biomateriale. Il micelio, la parte inferiore vegetativa dei funghi, rappresenta una nuova categoria di materiale composito naturale auto-crescente, biodegradabile, fibroso e con proprietà fisiche controllate. Il materiale miceliare può essere ottenuto a partire da una cellula di grani che colonizza un substrato energetico, formando una rete 3D filamentosa orientata in modo casuale.

Infine, l'organismo fungino viene disattivato termicamente fornendo il materiale finale. Il micelio come biomateriale presenta caratteristiche vantaggiose come l'elevata porosità aperta, dovuta al fatto che l'organismo stesso ne ha bisogno per sopravvivere (fornisce la diffusione di meta/cataboliti attraverso la rete), l'idrofobicità, il breve periodo di crescita (8-14 giorni) e un comportamento di crescita dipendente dal substrato: gli studi confermano che le caratteristiche meccaniche e chimiche sono strettamente influenzate dal substrato di crescita.

Negli ultimi anni sono state fatte alcune prove di biocompatibilità, che, dando risultati promettenti, hanno portato alla consapevolezza che il micelio possa essere un nuovo biomateriale utilizzabile in campo biomedico, per applicazioni quali: rigenerazione cutanea della pelle e del derma, rigenerazione ossea e cartilaginea, guarigione delle ferite, filtrazione di aria, cerotti e garze.

1.2 Medicina rigenerativa e ingegneria tissutale

La medicina moderna si avvale di diverse strategie terapeutiche per curare i pazienti che necessitano di una sostituzione parziale o totale di un tessuto/organo danneggiato o malfunzionante, per recuperarne la funzione. In ambito clinico, la sostituzione di un distretto corporeo può essere effettuata attraverso impianti protesici o il trapianto di un tessuto/organo prelevato da un donatore deceduto (trapianto di organi). È tuttavia

importante sottolineare che entrambe le tecniche presentano dei limiti: bisogna evitare il rigetto fisiologico del corpo estraneo (reazione immunitaria) e, se si sostituisce l'organo naturale con uno sintetico, si devono effettuare molteplici revisioni protesiche, che sono anche molto invasive. Inoltre, gli organi allogenici da donatori deceduti compatibili sono scarsamente disponibili, il che comporta lunghe liste d'attesa per i pazienti e il rischio di rigetto immunitario e la necessità di una terapia immunosoppressiva a vita in caso di trapianti allogenici.

La richiesta di tessuti e organi da trapiantare sta spingendo la scienza a trovare nuove frontiere della medicina. Una di queste è sicuramente rappresentata dalla medicina rigenerativa.

La medicina rigenerativa è una definizione ampia per le terapie mediche innovative bioingegnerizzate che consentono all'organismo di riparare, sostituire, ripristinare e rigenerare cellule, tessuti e organi danneggiati o malati. La rigenerazione si basa clinicamente sul concetto di sostenere e attivare la capacità riparativa intrinseca dell'organismo.

Una delle definizioni più recenti, attribuita a Mason & Dunnill, afferma che "la Medicina Rigenerativa sostituisce o rigenera cellule, tessuti o organi umani, per ripristinare o stabilire una funzione normale." Ci riferiamo all'ingegneria tissutale come a una branca della medicina rigenerativa che assembla costrutti funzionali che ripristinano, mantengono o migliorano i tessuti danneggiati o l'intero organo, combinando impalcature, cellule (preferibilmente autologhe) e molecole biologicamente attive (segnalazione cellulare) in tessuti funzionali (Fig. 1).

L'ingegnerizzazione di costrutti autologhi garantisce l'immunocompatibilità e supera le limitazioni legate ai sostituti allogenici sia sintetici che biologici.

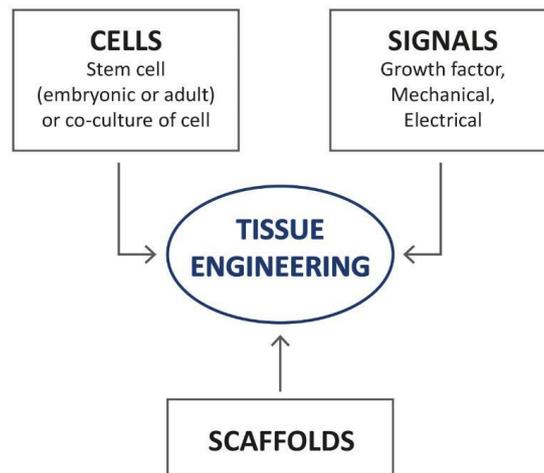


Fig.1 Schema generale – Ingegneria dei tessuti. Cellule, scaffold e segnali sono utilizzati sinergicamente all'interno di un bioreattore per produrre tessuto maturo.

L'ingegneria tissutale mira alla replica in vitro di un tessuto umano simile a quello fisiologico dei pazienti per struttura e funzione. La crescita avviene in un ambiente controllato (bioreattore) che imita le condizioni fisiologiche del corpo umano, al fine di migliorare l'integrazione del tessuto. Le fasi per ottenere un tessuto autologo sono elencate di seguito:

1. Produzione di supporti tridimensionali bioassorbibili (Scaffold).
2. Coltura ed espansione cellulare in vitro, in un terreno di coltura.
3. Semina di cellule Scaffold e coltura cellulare statica.
4. Proliferazione e differenziazione cellulare in coltura cellulare dinamica.
5. Condizionamento dei tessuti in un bioreattore.
6. Intervento di impianto di costrutti (cellule + scaffold).
7. Adattamento e adsorbimento del costrutto

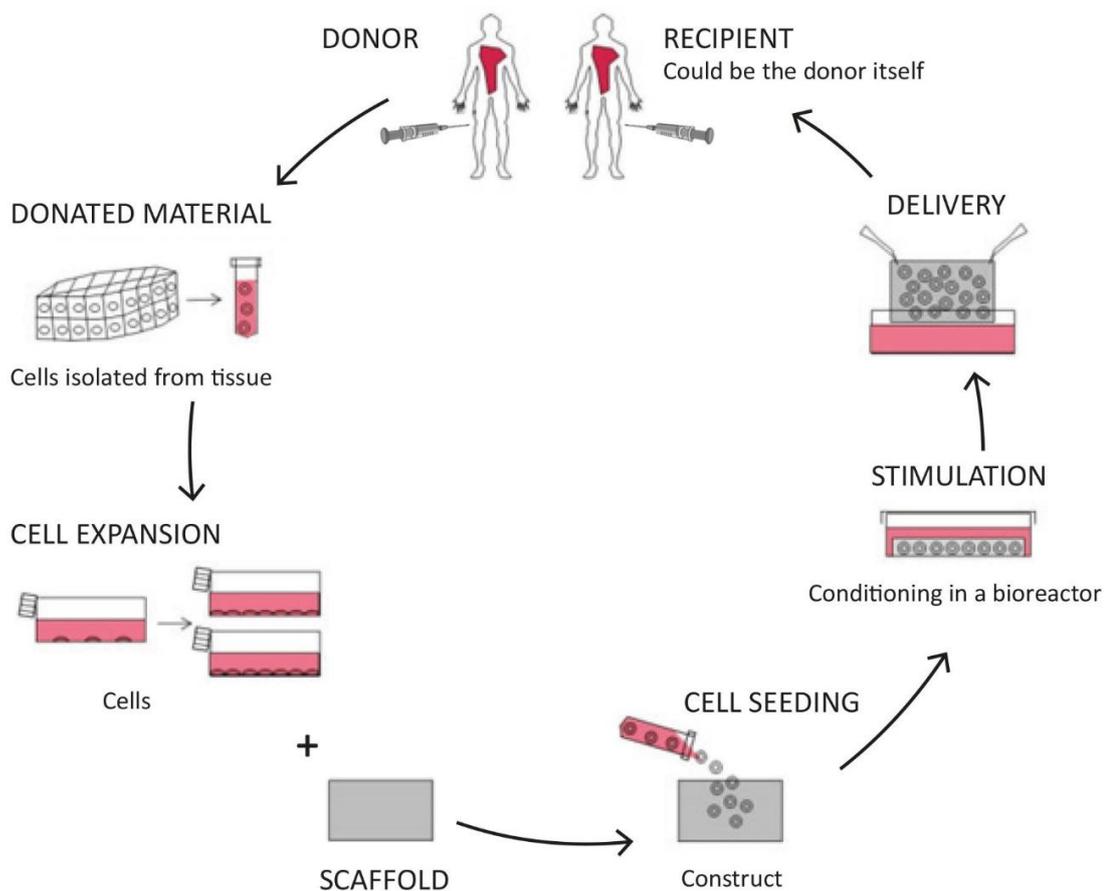


Fig.2 Generico diagramma di processo in una terapia rigenerativa

1.2.1 Scaffold nell'ingegneria dei tessuti

Uno scaffold è una struttura tridimensionale biorassorbibile portante progettata per sostenere e guidare la crescita cellulare, per ripristinare il tessuto in termini di caratteristiche biologiche, funzionali e morfologiche. Una volta isolate, le cellule vengono seminate e coltivate su questi componenti, formando il costrutto finale. La meccanica dell'impalcatura deve essere paragonabile all'ECM del tessuto, in modo da riprodurre le condizioni fisiologiche in vivo. [Un'impalcatura efficiente deve essere progettata con una porosità adeguata per garantire l'adesione, la proliferazione e la vitalità cellulare e con profili di degradazione adeguati, che assicurino il supporto meccanico durante la guarigione del tessuto (riassorbimento dell'impalcatura e deposizione di ECM). La

composizione morfologica e chimica della superficie della struttura deve essere regolata per migliorare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, esercitando la cosiddetta "guida di contatto". La guida al contatto si riferisce alla capacità delle cellule di percepire le caratteristiche geometriche tridimensionali e l'anisotropia del microambiente, modificando la propria forma e adottando l'orientamento appropriato.

Le matrici scaffold sono utilizzate anche come Drug Delivery Systems (DDS), per ottenere la somministrazione di farmaci con un elevato carico ed efficienza in siti specifici. Inoltre, la superficie può essere funzionalizzata con molecole specifiche per migliorare le caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità.

Uno scaffold ideale per l'ingegneria tissutale dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

- i. **Biocompatibilità:** capacità dello scaffold di funzionare in un'applicazione specifica senza evocare una reazione immunitaria o infiammatoria dannosa. Affinché uno scaffold interagisca positivamente con le cellule e con un'alterazione minima del tessuto circostante, deve avere una chimica di superficie adatta a consentire l'attaccamento, la differenziazione e la proliferazione cellulare
- ii. **Biorassorbibilità:** il materiale dello scaffold deve essere biodegradabile e i suoi prodotti di degradazione non devono essere tossici e devono essere eliminati dall'organismo attraverso vie metaboliche fisiologiche. Il tasso di degradazione dello scaffold deve essere regolato in modo da corrispondere al tasso di rigenerazione del tessuto, fornendo un supporto durante l'integrazione dello scaffold.
- iii. **Proprietà meccaniche:** le proprietà meccaniche dello scaffold devono essere progettate per soddisfare le caratteristiche specifiche del tessuto da rigenerare nel sito del difetto.

Lo scaffold deve fornire sia l'integrità strutturale al tessuto ingegnerizzato sia un profilo meccanico adatto alla degradazione e all'integrazione del tessuto. La struttura funge da scudo per le cellule da forze di compressione o trazione dirompenti, senza inibire le indicazioni biomeccaniche appropriate.

- iv. Superficie che favorisce l'adesione: gli scaffold devono fornire l'adesione all'interfaccia, permettendo l'adesione cellulare e la successiva migrazione e proliferazione. La maggior parte dei tipi di cellule dei mammiferi è dipendente dall'ancoraggio, il che significa che la loro vitalità è strettamente legata al successo dell'adesione.
- v. Guida e segnalazione: la microstruttura deve guidare la crescita cellulare, trasmettendo le indicazioni chimiche e fisiche essenziali per garantire una crescita adeguata del tessuto.

L'architettura dello scaffold più efficiente presenta un elevato rapporto superficie/volume, adatto all'attaccamento delle cellule.
- vi. Porosità: La microstruttura porosa definisce l'interazione e la guida ottimale delle cellule, nonché l'efficienza di semina e la diffusione dei soluti all'interno dello scaffold. L'architettura dei pori è caratterizzata dalle dimensioni e dalla forma dei pori, dall'interconnettività dei pori e dalla loro diffusione. grado di porosità. La dimensione adeguata dei pori deve essere selezionata tenendo conto del tipo di cellula utilizzata nella terapia specifica, al fine di fornire un'elevata densità ed efficienza di semina cellulare. [L'interconnettività dei pori rappresenta una caratteristica importante nell'ingegneria degli scaffold: favorisce la migrazione delle cellule e la diffusione di meta/cata-boliti all'interno della struttura.[5] Inoltre, la migrazione delle cellule è determinata da un elevato grado di porosità (> 90%), ideale per far interagire e integrare lo scaffold con il tessuto ospite.
- vii. Specifico per la propria applicazione
- viii. Processabilità: Lo scaffold deve essere relativamente facile da lavorare e deve poter essere prodotto in modo sterile.
- ix. Scalabile: possibilità di aumentare o diminuire il sistema in scala in funzione della necessità e della disponibilità.
- x. Adeguata durata di conservazione e di scaffold: le caratteristiche della struttura devono essere mantenute dopo la lavorazione, dalla produzione dello scaffold alla sua applicazione, per tutto il periodo di conservazione. Lo stato dell'arte

dell'ingegneria degli scaffold si concentra sulla risoluzione delle limitazioni relative a: - Distribuzione delle cellule all'interno dello scaffold - Vascolarizzazione e scambi metabolici - Fattibilità delle co-colture cellulari - Miglioramento della microstruttura dello scaffold - Migliori materiali ingegnerizzati (in termini di degradazione controllata)

1.2.2 Bioreattori

Un bioreattore è un dispositivo che trova applicazione per lo sviluppo e il condizionamento in vitro di costrutti bioingegnerizzati (scaffold con seme cellulare). Questi dispositivi consentono il verificarsi di processi biologici/biochimici, lavorando in condizioni ambientali monitorate (sensori), controllate (feedback) e automatizzate. L'obiettivo principale è quello di sviluppare un costrutto ingegnerizzato in modo automatizzato, per diminuire il rischio di un'infezione e di contaminazione da parte dell'operatore e migliorare la riproducibilità del processo.

I bioreattori devono essere in grado di applicare al costrutto stimoli di diversa natura: condizionamento meccanico, chimico, elettrico e fluidodinamico. Il tipo di condizionamento effettuato all'interno del bioreattore è strettamente legato alla tipologia di tessuto ingegnerizzato che si vuole ottenere.

In particolare, la creazione di modelli di flusso all'interno del terreno di coltura può simulare, insieme agli stimoli meccanici, le condizioni fisiologiche del tessuto, mantenendo le diverse concentrazioni chimiche e aumentando la diffusione di gas/nutrienti dal terreno di coltura al costrutto.

Il condizionamento fisico deve essere effettuato in concomitanza con il condizionamento biochimico, ottenuto scegliendo diverse composizioni del terreno di coltura. I fattori biochimici in grado di influenzare il destino cellulare (in termini di commitment lineage) sono: Fattori di crescita (GF), fattori di trascrizione (TF), ormoni, farmaci e proteine. L'obiettivo è simulare, in vitro, l'ambiente fisiologico in cui il costrutto sarà collocato in vivo o l'habitat embrionale in cui si generano i tessuti durante lo sviluppo fetale. L'obiettivo è simulare, in vitro, l'ambiente fisiologico in cui il costrutto sarà collocato in vivo o l'habitat

embrionale in cui si generano i tessuti durante lo sviluppo fetale. I bioreattori sono anche applicati come sistemi di semina cellulare per aumentare l'efficienza di semina in una coltura dinamica in perfusione, come modelli in vitro (organoidi) per studiare particolari malattie o strutture anatomiche (barriera ematoencefalica o podociti renali), o nell'industria biotecnologica come strumenti per la produzione su larga scala di cellule e batteri (o di composti da essi sintetizzati). Un bioreattore deve essere progettato in modo da poter misurare e controllare la temperatura, il pH e la concentrazione di ioni inorganici (Na, K, Ca) e altre sostanze chimiche.

Un bioreattore ideale dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

- i. Promuovere il trasporto gas/nutrienti dal terreno al costrutto
- ii. Il condizionamento fisico durante lo sviluppo del costrutto consente la deposizione omogenea di ECM e la corretta differenziazione delle cellule staminali.
- iii. Materiali cito-compatibili: tutti i materiali che si interfacciano con le cellule o il terreno di coltura devono essere atossici.
- iv. Affidabilità.
- v. Sterilizzabile: qualsiasi superficie deve essere sterilizzata e deve mantenere la sterilità per tutto il processo di coltura.
- vi. Compatibilità con le buone pratiche di fabbricazione (GMP): facilità di assemblaggio e pulizia.
- vii. Versatilità: il dispositivo deve essere in grado di funzionare per scopi diversi. - Assenza di contaminazione incrociata: possibilità di coltura simultanea di diversi tipi di cellule o scaffold.
- viii. Semina automatica.
- ix. Risparmio di spazio: ridurre al minimo il volume del terreno di coltura e la superficie di contatto. Si preferiscono soluzioni modulari.
- x. Automatico e controllato: mantenimento dei parametri di coltura entro intervalli fisiologici.

- xi. Stand-Alone: il dispositivo deve essere in grado di operare autonomamente senza supervisione.

1.3 Il micelio

Per micelio si intende la parte vegetativa e la struttura radicale degli organismi fungini. Il micelio è una struttura filiforme, composta da unità tubolari filamentose chiamate ife, ed è vantaggioso per i funghi in quanto assorbe le sostanze nutritive dal terreno ed è utile per la loro riproduzione. In genere le ife, che consistono in cellule allungate, presentano diametri dell'ordine di 0,6-30 μm , a seconda della specie e dell'ambiente di crescita, e lunghezze che vanno da pochi micrometri a diversi metri. Il micelio cresce a partire da una spora attraverso l'espansione della punta apicale delle ife che, dopo una fase di crescita isotropa, inizia una ramificazione casuale formando colonie frattali ad albero. Il risultato è un organismo a rete interconnesso che si estende sotto il suolo e completa il suo ciclo vitale germogliando in corpi fruttiferi verso la superficie.

Il micelio è considerato l'"internet della natura" per la sua capacità di colonizzare l'ambiente circostante, attenuando il trasferimento multidirezionale di nutrienti tra le piante con effetti benefici sull'intero ecosistema.

1.3.1 Materiali a base di micelio

La ricerca scientifica si è recentemente concentrata sul micelio come nuova risorsa naturale per lo sviluppo di una classe innovativa di materiali biobased. L'originalità risiede nella possibilità dei materiali a base di micelio di essere auto-crescenti e disponibili in breve tempo.

Il processo di fabbricazione dei materiali a base di micelio richiede due caratteristiche fondamentali: il ceppo di funghi e un substrato di alimentazione. Il ceppo di funghi viene inizialmente inoculato attraverso uno specifico metodo di inoculazione all'interno del substrato e il processo viene preferibilmente eseguito utilizzando uno stampo per ottenere la forma desiderata. Le ife del fungo colonizzano quindi l'intero volume disponibile e formano una rete filamentosa tridimensionale intrecciata attraverso il

componente di alimentazione, digerendo contemporaneamente i suoi nutrienti e legando il substrato stesso. Una volta raggiunta la colonizzazione del substrato desiderata, l'organismo viene ucciso a caldo attraverso un trattamento termico che disattiva le ife e arresta il processo di crescita.

La grande variabilità delle combinazioni di ceppi e substrati potrebbe portare alla produzione di un ampio assortimento di materiali a base di micelio, ognuno dei quali presenta qualità diverse. Inoltre, esistono substrati non completamente degradabili e quindi necessari per le caratteristiche o le funzioni del materiale. All'interno del substrato di alimentazione possono essere inseriti anche componenti inerti per esplicare funzioni specifiche.

Il risultato è un materiale composito fibroso auto-crescente e biodegradabile.

In base alle sue proprietà principali di essere auto-crescente, biodegradabile e ottenibile attraverso una procedura rapida e a basso costo (5-10 giorni), il micelio è destinato a essere un materiale competitivo rispetto sia ai materiali sintetici "tradizionali" sia ai polimeri ottenuti da fonti naturali, che potrebbero risolvere i problemi ambientali nonostante il loro costoso e lungo processo di estrazione. Inoltre, diversi rifiuti organici industriali sono adatti come substrati di alimentazione funzionali per la fase di crescita del materiale, per cui il micelio consente uno sviluppo sostenibile del prodotto, contribuendo al passaggio verso un'economia verde e circolare, considerata una delle sfide attuali della società.

Il micelio cresce in una relazione simbiotica con la componente nutritiva ed è possibile personalizzare e sintonizzare le proprietà del materiale finale scegliendo opportunamente il substrato nutritivo, rendendolo utilizzabile in varie applicazioni su scala. Le reti di ife ramificate costruiscono una struttura porosa con pori interconnessi, essenziali per garantire una diffusione omogenea dei nutrienti e gli scambi con il suolo e le piante.

La maggior parte dei materiali a base di micelio presenta caratteristiche di resistenza al calore/incendio, elevata idrofobicità con un angolo di contatto con l'acqua (WCA) $> 120^\circ$,

elasticità e stabilità termica con una degradazione che inizia a temperature superiori a 220 °C.

Sfruttando le caratteristiche sopra descritte, i prodotti a base di micelio potrebbero trovare applicazione in diversi settori. I materiali fungini sono oggi utilizzati nella produzione di imballaggi, nell'industria automobilistica, nell'industria tessile, nell'abbigliamento come sostituti della pelle, nella cosmesi, nel design e nell'architettura come pannelli isolanti o pavimenti.

2.0 Analisi Brevetti

Per comprendere a pieno quali fossero i risultati, ad oggi, ottenuti nella comprensione delle migliori metodiche con le quali trattare il micelio e i suoi possibili utilizzi, in comune accordo con la professoressa, è stato deciso che il primo step obbligatorio fosse l'analisi di tutti i brevetti esistenti che comprendessero l'utilizzo di micelio.

Lo scopo dell'analisi iniziale è stato quello di comprendere, come detto, quali fossero i protocolli di trattamento ad oggi implementati per l'utilizzo di micelio, quali fossero gli obiettivi raggiunti nella produzione di materiali di micelio e, di conseguenza, quale potesse essere un varco di azione possibile nello studio e nell'utilizzo di questo materiale.

La prima fase nell'analisi è stata necessaria per poter selezionare quali fossero i brevetti che potessero avere valore anche in ambito biomedico oltre che nel campo, ad esempio, di packaging o della costruzione.

Dopo questo primo approccio, la mia analisi ha cominciato ad assumere una forma più netta: lo scopo della mia ricerca sarebbe stato quello di comprendere se ci fosse la possibilità di ottenere un metodo grazie al quale poter direzionare più precisamente la crescita ifale.

Al fine di comprendere al meglio quale potesse essere il miglior approccio per il raggiungimento di questo obiettivo, ho deciso di focalizzarmi su due brevetti che mi

sembravano, e sembrano, i più completi e dettagliati soprattutto dal punto di vista della metodica:

- [Mycelium Materials, and Methods For Production Thereof] – American Porters
- [Increased Homogeneity of Mycological Biopolimer Grown Into Void Space] – Ecovative Design

2.1 Mycelium Materials and Methods For Production Thereof

In questa realizzazione di American Porters vengono forniti i metodi di produzione per la realizzazione di materiali a base di micelio composito con qualità meccaniche ed estetiche migliorate.

Con materiale di micelio coltivato ci si riferisce ad un materiale che include una o più masse di micelio coltivato, o esclusivamente un unico micelio coltivato.

In questo lavoro, il micelio viene coltivato in un processo liquido internamente ad un bioreattore. (Fig.3)

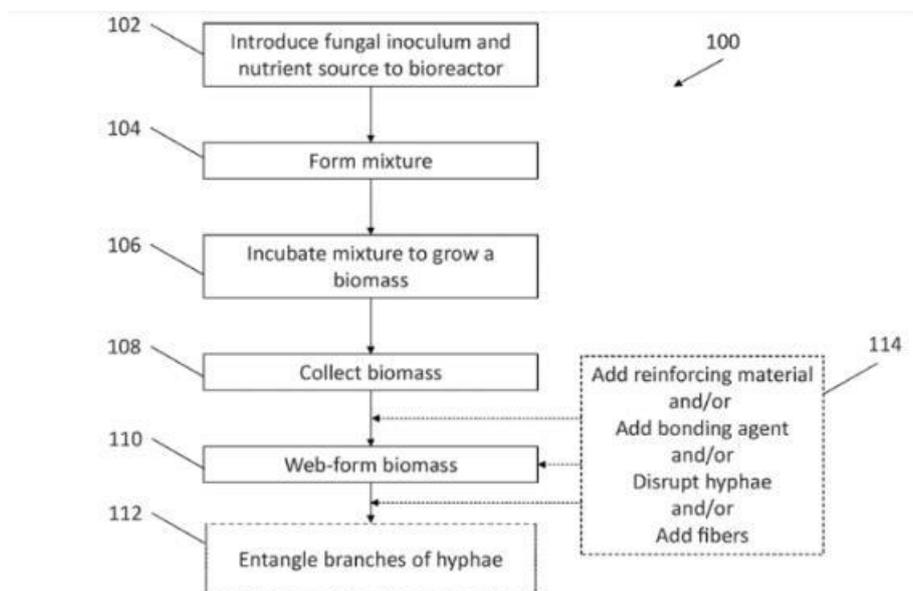


Fig.3 Schema esplicativo dei passaggi eseguiti per la realizzazione del processo di trattamento del micete di cui tratta il brevetto preso in analisi

Tale metodo di produzione include:

1. Introduzione di un inoculo fungino e una fonte di nutrienti in un bioreattore
2. Formazione di una miscela all'interno del recipiente del bioreattore
3. Incubazione della miscela per fare crescere la biomassa
4. Raccolta della biomassa coltivata di micelio
5. Biomassa a rete che porta alla formazione della rete ifale

L'inoculo fungino può essere: una soluzione di spore o un micelio vivo che viene aggiunto al vaso del bioreattore. La soluzione di spore che viene aggiunta al recipiente del bioreattore contiene spore fresche: Il termine "fresco", quando usato per descrivere le spore in una soluzione di spore o in un inoculo fungino, si riferisce a una soluzione contenente spore che sono state coltivate, raccolte e utilizzate per inoculare un recipiente in un processo di crescita liquido senza essere conservate in una temperatura di 4°C o meno tra il processo di raccolta delle spore e il processo di inoculo delle spore nel vaso.

È stato riscontrato che l'introduzione di un **inoculo fungino fresco** che non è stato congelato o refrigerato nel recipiente, possono facilitare la crescita di una biomassa di micelio avendo le caratteristiche morfologiche desiderate. La conservazione della soluzione di spore o del micelio vivo a una bassa temperatura prima dell'inoculazione può comportare una biomassa di micelio con caratteristiche indesiderate (ad esempio, agglomerazione, bassa dispersione) e/ o un tasso di crescita più lento.

Il processo esemplificativo per la preparazione di una soluzione di spore fresca per l'inoculazione del recipiente del bioreattore può includere flaconi di semina contenenti un mezzo idoneo e materiale di crescita a base di specie fungine.

Il periodo di incubazione e la temperatura per la coltura delle spore fungine per produrre un numero desiderato di spore per la fase di inoculazione possono variare a seconda della specie fungina.

La specie *N. crassa* può essere seminata e incubata a circa 30 ° C per 3 giorni, dopodiché i flaconi di semi vengono trasferiti a temperatura ambiente (circa 25 ° C) e lasciati fermi per

circa una settimana per consentire la formazione di conidi. (I conidi o conidia sono spore fungine prodotte per conidiogenesi ed utilizzate per la riproduzione asessuale, sono chiamate anche mitospore).

Una volta che appare una quantità adeguata di grumi o catene di conidi visibili, i conidi possono essere raccolti dai flaconi di semi e opzionalmente filtrati attraverso una rete sterile per rimuovere grossi pezzi di micelio (p. es., 40 µm di rete sterile). La soluzione di spore raccolta può essere concentrata, diluita e/o combinata secondo necessità per fornire una soluzione di spore che formi un inoculo fungino avente una concentrazione desiderata per l'inoculazione del vaso.

Viene indicata poi successivamente come la **miscela** nel recipiente di reazione possa includere componenti oltre all'inoculo e alla fonte di nutrienti. Ad esempio, la miscela può includere facoltativamente:

- una fonte di carbonio: glucosio, xilosio e lattosio
- una fonte di azoto: nitrato di ammonio, solfato di ammonio, cloruro di ammonio, amminoacidi
- un modificatore di pH: qualsiasi tampone adatto che faciliti il mantenimento della miscela al pH desiderato (Il pH o l'intervallo di pH della miscela possono essere selezionati per promuovere la crescita in base alle specie fungine specifiche). Il modificatore di pH può essere selezionato per facilitare il mantenimento del pH o dell'intervallo di pH desiderati durante la successiva fase di incubazione 106.
- tracce di minerali: possono includere ferro (p. es., solfato di ferro ammonio (II) esaidrato), zinco (p. es., solfato di zinco eptaidrato), rame (p. es., solfato di rame pentaidrato), manganese (p. es., solfato di manganese monoidrato), molibdeno (ad es. molibdato di sodio diidrato) e loro combinazioni
- tensioattivi: includono polietilenglicoli, polisorbato 80

- e/o un integratore nutritivo: selezionato in base alle specie fungine specifiche e può includere una o più vitamine, tra cui biotina e tiamina.

All'interno dello stesso brevetto si riporta anche come possa giocare un ruolo fondamentale l'aggiunta di un **tensioattivo** al recipiente di reazione con le spore. Il tensioattivo può essere un componente del mezzo all'interno del quale le spore sono sospese o un componente separato aggiunto al recipiente di reazione. Il tensioattivo può essere una macromolecola polimerica comprendente almeno una unità monomerica di ossido di etilene e/o ossido di propilene; esempi non limitativi includono polimeri di ossido di propilene, copolimeri a blocchi di ossido di propilene, copolimeri a blocchi di ossido di propilene/ossido di etilene, polieterepolioli, polipropilenglicole e loro combinazioni.

È stato riscontrato che i tensioattivi di macromolecole polimeriche della presente divulgazione comprendenti almeno unità monomeriche di ossido di etilene e/o ossido di propilene inibiscono la formazione di grumi associati ai componenti del recipiente di reazione (ad esempio agitatore, alberi, pareti del recipiente, ecc.), che si ritiene inibiscano la crescita di una biomassa avente la morfologia desiderata. Questo può facilitare la produzione su larga scala di quantità sufficienti di materiale di biomassa avente le caratteristiche morfologiche desiderate.

La miscela nel recipiente di reazione può includere una fonte di nutrienti contenente una quantità iniziale di almeno un nutriente, come ad esempio il glucosio, che viene consumato man mano che la biomassa cresce. Una volta consumata una porzione predeterminata della quantità iniziale della o delle sostanze nutritive, una o più sostanze nutritive aggiuntive possono essere alimentate nel recipiente di reazione in modo intermittente e/o a una velocità costante per facilitare la crescita continua della biomassa. La porzione predeterminata della quantità iniziale di nutriente/i utilizzata per determinare l'apporto di nutrienti aggiuntivi può corrispondere alla totalità della quantità iniziale del nutriente (vale a dire, il 100% della quantità iniziale di nutriente) o a una quantità inferiore a un la totalità della quantità iniziale del nutriente.

La quantità iniziale dei nutrienti, la quantità di nutrienti aggiuntivi aggiunti, il programma di aggiunta e/o il tasso di fornitura di nutrienti aggiuntivi possono essere basati almeno in parte sulla specie di fungo. Il consumo della quantità iniziale di nutrienti può essere determinato sulla base di un picco osservato di ossigeno disciolto e un calo del tasso di evoluzione del carbonio (CER) e può essere avviata la fornitura di nutrienti aggiuntivi.

La miscela così formata all'interno del recipiente del bioreattore viene incubata per promuovere la crescita della biomassa del micelio. Le condizioni del bioreattore possono essere selezionate per promuovere la crescita di una biomassa di micelio avente una pluralità di rami di ife aventi caratteristiche morfologiche desiderate.

La fase di incubazione può includere un **profilo di agitazione** che include una fase iniziale avente una bassa velocità di agitazione (ad esempio, 200 giri/min) per un periodo di tempo predeterminato, seguito da una fase di rampa durante la quale la velocità di agitazione è aumentata. Facoltativamente, il profilo di agitazione può includere il mantenimento della velocità di agitazione a una velocità elevata predeterminata dopo la fase di rampa, maggiore della velocità di agitazione iniziale (ad esempio, 1000 rpm), fino alla fine della fase di incubazione. Parametri della fase di rampa, come poiché il tempo di inizio della fase di rampa, la velocità di aumento dell'agitazione e/o la fine della fase di rampa possono essere determinati almeno in parte sulla base di dati in tempo reale provenienti dal recipiente di reazione e/o dati sperimentali.

2.2 Increased Homogeneity Mycological Biopolimer Grown into void space

Ecovative Design in questa realizzazione presenta varie forme di realizzazione all'interno delle quali approfondisce in primis il contributo sinergico di due stimoli nella crescita ifale: il flusso d'aria e l'umidità.

Un ambiente umido è generalmente necessario per una crescita aggressiva dei funghi. Umidità e contenuto di soluto nel mezzo di crescita sono direttamente correlati alla densità del materiale da coltivare. Maggiore è il contenuto di umidità, minore è la densità del materiale coltivato. La capacità delle cellule fungine di riempire lo spazio vuoto dipende dall'acqua e dai soluti disponibili per l'organismo durante la crescita. Più acqua è

disponibile, più l'organismo può espandersi in modo aggressivo, causando una diminuzione della densità del materiale (un contenuto di umidità del 65% sul substrato di stufato di mais ha prodotto densità di 1,7 PCF e un contenuto di umidità del 55% ha prodotto densità di 2,7 PCF).

Il flusso d'aria impiegato per la crescita del biopolimero micologico è finalizzato a fornire un'omogeneizzazione costante dell'ambiente di incubazione senza variazioni localizzate, con parametri sufficientemente controllati, in modo tale che il micelio non si possa differenziare in un fungo.

- a. Nella seconda forma di realizzazione presentata all'interno del suddetto brevetto, umidità e i soluti vengono distribuiti sulla superficie in crescita del mezzo di crescita utilizzando un bagno d'acqua dotato di un "disco umidificante" che atomizza l'acqua in vapore o nebbia. Un "disco di umidificazione" è un umidificatore ad ultrasuoni che produce goccioline di bassa qualità, ad alto contenuto di liquidi di dimensioni comprese tra 5 e 22 micron. La goccia d'acqua liquida, opposta al vapore, è importante in quanto la goccia può trasportare un soluto. Lo stesso vale per spray o gorgogliatori, ma non può essere ottenuto con il vapore. Il vapore può essere utilizzato per regolare l'umidità, ma non come sostituto dell'acqua che trasporta i soluti. È stato prototipato e testato un progetto di sistema che consente la deposizione controllata di nebbia sul materiale in crescita senza l'uso del flusso d'aria impiegando la camera di incubazione di Fig. 5A. Questo prototipo di sistema di nebulizzazione ha distribuito uniformemente un volume equivalente di nebbia sul materiale in crescita come sistema di controllo del flusso d'aria elevato.
- b. La terza forma di realizzazione dell'invenzione prevede la crescita di un biopolimero micologico attraverso una tela o una matrice non substrato con loft che è a diretto contatto o elevata al di sopra della superficie di crescita del substrato e cresciuta in un contenitore senza l'uso di un coperchio.

In questa forma di realizzazione, la matrice non-substrato a tela o loft è di natura organica o inorganica e offre una porosità sufficiente in modo tale che il micelio

possa infiltrarsi nel materiale. La matrice di tela o loft non-substrato è posizionata sopra o sopra il substrato nutritivo e l'intero è incubato. La tela o materiale loft serve da rinforzo al micelio, un mezzo per orientare e dirigere la crescita dei tessuti, un metodo per rimuovere costantemente il tessuto cresciuto dal substrato nutritivo, o una loro combinazione.

- c. La quarta forma di realizzazione utilizza la fluttuazione dell'umidità percentuale in periodi di crescita per tutta la durata del ciclo al fine di indurre un materiale a densità più elevata di maggiore omogeneità. Un ambiente umido è generalmente necessario affinché i funghi crescano in modo aggressivo. Quando si incontra un ambiente essiccante, molte specie di funghi hanno sviluppato metodi per proteggersi dalla perdita di umidità. Per le ife aeree, è necessario un ambiente localizzato ad alta umidità per consentire la continua espansione e prevenire il collasso delle ife verso la superficie di crescita. La fluttuazione dell'umidità nella camera di crescita può essere utilizzata per innescare risposte fisiologiche dell'organismo a un ambiente essiccante, nonché per manipolare la crescita ifale aerea al fine di ottenere le caratteristiche materiali desiderate. L'umidità relativa è mantenuta ad una percentuale elevata durante il periodo di induzione aerea del micelio, che può iniziare tra il giorno 0 e il giorno 5 di crescita. Una volta indotta, l'umidità viene ridotta a meno del 98% per un periodo da 4 a 72 ore per indurre una densificazione del tessuto apicale. L'umidità può quindi essere nuovamente elevata per indurre una nuova crescita differenziata per fornire una gamma di densità, morfologia dei tessuti e orientamento attraverso la sezione trasversale del prodotto. Questo può essere ripetuto tutte le volte necessarie per ottenere le variazioni desiderate nelle prestazioni attraverso la schiuma micologica.
- d. Una quinta forma di realizzazione utilizza portate d'aria specifiche per ottenere una gamma di densità del micelio aereo e varie prestazioni meccaniche.

In questa forma di realizzazione, il flusso d'aria può essere impostato a una velocità costante, in modo tale che la velocità del flusso d'aria sia modulata passivamente alla crescita del tessuto, oppure la velocità può essere regolata nel corso

dell'incubazione per fornire una velocità costante sul tessuto in crescita. Portate d'aria più elevate hanno dimostrato la produzione di tessuti più densi, mentre portate d'aria più basse si traducono in una maggiore quantità di tessuto che è meno denso una volta essiccato.

Tutte queste forme di realizzazione permettono di ottenere uno spettro di valutazione su come effettivamente la crescita ifale sia condizionata dall'utilizzo di flussi d'aria. Il flusso d'aria impiegato per la coltivazione del biopolimero micologico ha lo scopo di fornire un'omogeneizzazione coerente dell'ambiente di incubazione senza variazioni localizzate e con parametri sufficientemente controllati (ad esempio: elevata anidride carbonica) in modo che il micelio non possa differenziarsi in fungo.

Inoltre, la velocità del flusso d'aria fornisce una forza diretta che modula la struttura del micelio aereo, influenzandone la densità. In camere di crescita, il flusso d'aria è indiretto e parte di un sistema di ricircolo per l'umidificazione dell'ambiente.

Nello specifico:

Un flusso d'aria di 100 piedi cubi al minuto a un RH costante > 99% ha prodotto un tessuto con una densità secca di 1,98 PCF ed una resistenza alla trazione di 17,5 psi. Questi pannelli hanno mostrato un elevato grado di consistenza.

b. Un flusso d'aria di 100 – 175 piedi cubi al minuto e umidità relativa scesa al 96% per un periodo di 48 ore hanno dato come risultato un tessuto con una densità secca di 1,45 pcf e una resistenza alla trazione di 13,6 psi. Questi pannelli hanno prodotto comunque un alto grado di consistenza.

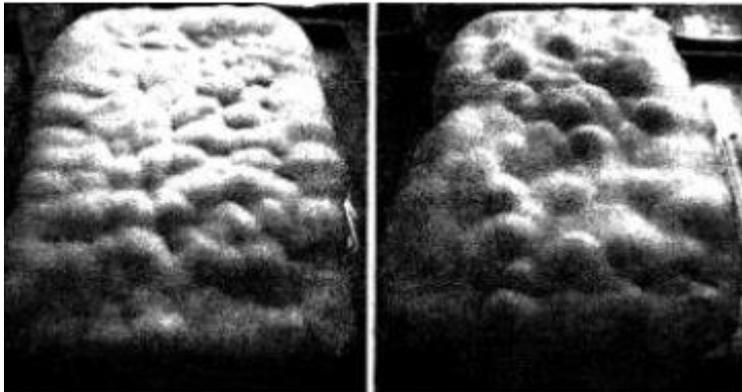
c. Un flusso d'aria di 300-350 piedi cubi al minuto con un RH costante >99% hanno prodotto un tessuto con densità secca di 3,32 pcf e una resistenza a trazione di 31,2.

Le coppie di pannelli cresciuti in un ambiente senza flusso d'aria sono state caratterizzate da un tessuto altamente differenziato e da una ridotta crescita aerea.

Possiamo vedere come, grazie al contributo di flussi d'aria direzionati lateralmente, si ottenga:

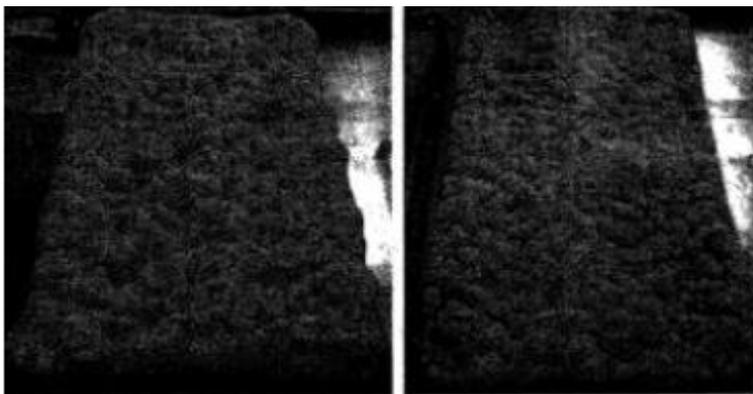


Superfici superiori di pannelli cresciuti in un ambiente con alto flusso d'aria diretto con una minima differenziazione morfologica.



Superfici superiori di pannelli cresciuti in ambiente con basso flusso d'aria indiretto con un tessuto altamente differenziato.

Il tessuto connettivo è minore e si traduce in una prestazione estetica omogenea ma eterogenea, ovvero le prestazioni meccaniche possono variare in base alla sezione della parte.



Superfici superiori di pannelli cresciuti in un ambiente a flusso d'aria nullo, conseguentemente il tessuto sarà altamente differenziato e con una ridotta crescita aerea.

Un altro caso studio interessante, sempre all'interno del medesimo contesto di analisi, è quello relativo all'utilizzo di flussi d'aria direzionati perpendicolarmente rispetto al micete in crescita.



In questo caso vediamo che il biopolimero è caratterizzato da una concentrazione di micelio al di sotto del dispositivo di flusso d'aria poiché l'aria veniva aspirata sulla superficie di crescita come vediamo in figura. Dove il dispositivo di flusso d'aria tirava l'aria verso l'alto da una regione centrale del mezzo di crescita, il micelio in crescita si andava a concentrare nella regione centrale del pannello.

Possiamo quindi concludere che: il movimento dell'aria può essere utilizzato per modellare e strutturare il materiale in forme e modelli particolari durante la crescita per un prodotto finale che viene modellato utilizzando il flusso d'aria. La vicinanza del dispositivo del flusso d'aria e il modello del flusso d'aria generano modelli di tessuto che imitano il flusso.

3.0 Sviluppo di un modello di bioreattore per la stimolazione controllata della crescita ifale

L'analisi strategica dei brevetti relativi alla coltivazione del micelio ha fornito alla mia ricerca una panoramica dello specifico settore tecnologico, delle attività di concorrenza, dei traguardi raggiunti e degli obiettivi possibili da prefissarmi.

Di comune accordo con la professoressa, ho deciso di tendere la mia analisi alla ricerca di un modello di bioreattore che condensasse le varie stimolazioni utilizzate e consolidate per il trattamento della crescita del micelio: uno strumento che permettesse di ottenere una crescita ifale direzionata grazie al contributo sinergico di tutti gli input fisici utilizzati ad oggi nei vari brevetti.

Al fine di ottenere ciò sono partita dai requisiti base da rispettare per la progettazione di un bioreattore (elencati prima nel paragrafo dedicato) per poi andare a ricostruire da essi un possibile un nuovo concetto di bioreattore dedicato alla coltivazione controllata del micete.

Chiaramente, non essendo coinvolte colture cellulari, alcuni dei requisiti non sono stati individuati come immediatamente necessari nell'iter di ideazione del progetto. In un primo momento, infatti, si è deciso di concentrarsi sulle seguenti specifiche:

a. Biocompatibilità del materiale

Tutti i materiali a contatto con il nostro organismo e il medium presenti all'interno del nostro sistema devono essere biocompatibili.

Generalmente sappiamo essere utilizzati i polimeri in quanto i ceramici, immediatamente riconoscibili come non idonei, risultano troppo fragili mentre i metalli non sono trasparenti e sono soggetti a processi di corrosione.

Anche in questo caso, i polimeri vengono individuati come opzione migliore per la costruzione dell'utensile a contatto con medium e micete.

È necessario, infatti, in primis valutare come costruire l'utensile in cui collocare la coltura. Tale oggetto deve definire una cavità ed essere dotato di coperchio che sigilli i bordi dell'utensile con un'apertura che crei uno spazio vuoto.

Lo strumento deve essere di forma rettangolare in policarbonato: individuato come il più ottimale in quanto sufficientemente rigido e non reattivo, biocompatibile e sterilizzabile tramite raggi gamma e ossido di etilene. L'eventuale coperchio viene invece realizzato in plastica di polietilene, anch'esso materiale biocompatibile e sterilizzabile tramite raggi gamma o ossido di etilene.

Facendo sempre riferimento al brevetto [Increased Homogeneity Mycological Biopolimer Grown into void space] ho compreso come, in questo caso specifico nel quale l'organismo principe è il micete, la camera di incubazione può essere semplicemente costruita come una serie di ripiani ricoperta da teli: una sorta di recinto di crescita, dotato di ventilatori o apparecchiature per lo spostamento dell'aria.

Il flusso d'aria è collegato alla camera per dirigere i flussi d'aria lateralmente attraverso la camera da un lato all'altro come indicano le frecce nel prototipo d'esempio in figura. Il sistema di flusso può comprendere anche un collettore (indicato come: M) nella parte superiore per distribuire aria umidificata attraverso la camera.

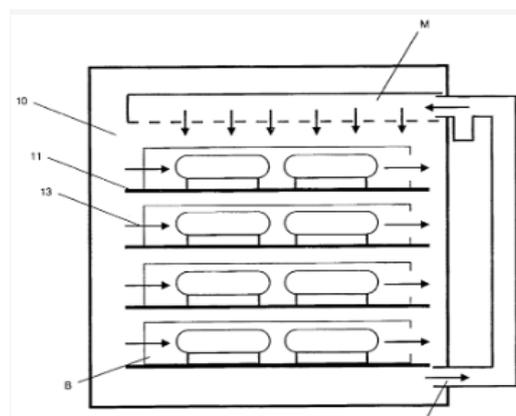


Fig.2 Schema della possibile struttura base del bioreattore

b. Stimolazione fisica

Il secondo obiettivo è sicuramente quello più importante: la ricerca del miglior metodo per riuscire a stimolare la crescita del micelio in una specifica direzione tramite il contributo sinergico di più stimoli fisici.

Sono stati individuati tre possibili contributi:

- Pressione uniassiale

Facendo riferimento ad un terzo brevetto ovvero [Method For Forming Directional Mycelium Fibers] di Emergy, posto in analisi per quanto riguarda il possibile contributo dello stimolo pressorio, si è compreso come l'applicazione di una pressione uniassiale, con valore compreso tra 25 e 300 psi, possa coadiuvare il processo di direzionamento della crescita miceliale.

Secondo le mie valutazioni, sarebbe interessante valutare sia:

- i. Pressione uniassiale statica: un blocco statico da posizionare al di sopra del micelio in crescita su di un substrato
- ii. Pressione uniassiale dinamica: un follower più una pressa.

In entrambi i casi, la pressione sarebbe uniassiale e, indipendentemente dal metodo scelto, andrebbe ad agire sulla superficie superiore del micelio, lasciando così libera la porzione laterale per i flussi d'aria.

- Flusso d'aria

Il secondo contributo che è stato pensato è quello dato dall'utilizzo di flussi d'aria. Questi possono essere diretti parallelamente o perpendicolarmente tramite ventilatori o apparecchiature per spostare l'aria. In genere si tratta di portate d'aria comprese tra i 5 e i 10.000 CFM generate da ventole da pc.

Per il nostro scopo sono state individuate come miglior opzione delle ventole che generano flussi d'aria con portata di 1000 CFM.

Idealmente ciascuna ventola sarebbe posta lateralmente in corrispondenza di ciascun ripiano adibito alla crescita del nostro micelio.

- Umidità

Altro parametro fondamentale è la gestione del livello di umidità nostro ipotetico bioreattore di nuova generazione.

Al fine di poter controllare la deposizione di umidità all'interno della nostra cultura si è pensato di utilizzare un igrostato, ovvero un controller che permette di gestire sia umidificazione che deumidificazione di un ambiente tramite semplici ed intuitive manopole.

c. Sensorizzazione

Il terzo ed ultimo requisito valutato in sede di prima ideazione della nuova tipologia di bioreattore dedicato alla crescita del micete, è la sensorizzazione del tutto.

Arriviamo quindi al terzo ed ultimo obiettivo prefissatoci, ovvero la ricerca di plausibili sensori che si potessero utilizzare per il monitoraggio dei seguenti valori:

- Ossigeno disciolto
- pH
- Livelli di Anidride Carbonica
- Umidità
- Temperatura

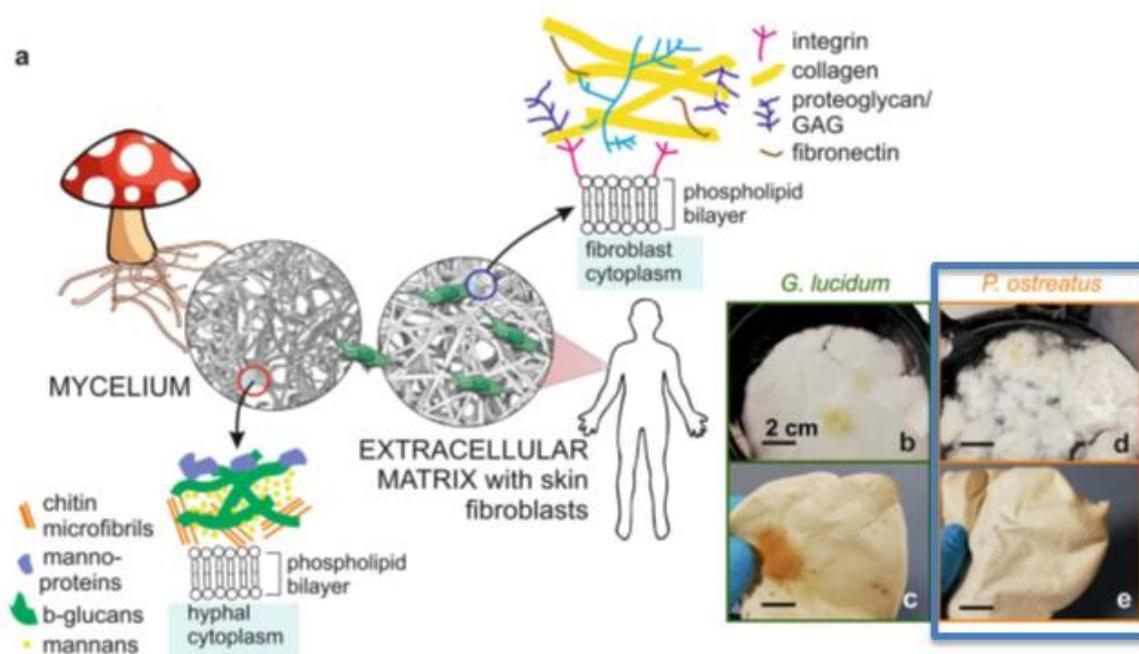
Al fine di monitorare questi valori, sono stati individuati sensori mininvasivi già presenti sul mercato e di cui dotarsi per la costruzione del bioreattore posto in analisi.

4.0 Ricerca di un Protocollo di Crescita Ottimale e Direzionata di *Pleurotus Ostreatus*

4.1 Individuazione del ceppo di micete ottimale per il nostro scopo: Il *Pleurotus Ostreatus*

L'articolo [Advanced mycelium materials as potential self-growing biomedical scaffolds] pubblicato su Nature nel 2021 pone le basi di quella che è l'idea di protocollo di crescita del nostro micete di riferimento: il *Pleurotus Ostreatus*.

Infatti, in questo articolo, vengono analizzate due tipologie di micelio: il *Ganoderma Lucidum* e il *Pleurotus Ostreatus*. Dai risultati ottenuti dalle loro analisi, si evince come, mirando all'ottenimento di uno scaffold di micete, le caratteristiche del *Pleurotus Ostreatus* siano nettamente migliori.



Nell'articolo vengono riportate anche passo per passo tutte le tecniche da loro utilizzate per l'ottenimento dello scaffold.

Riporto sinteticamente di seguito passaggi chiave del processo di trattamento del micete:

- Per la crescita ciò che utilizzano è una Petri e il PDB quindi il brodo di destrosio di patate come medium.
- Un pezzo di micelio cresciuto a 20 giorni è stato inoculato in piastre da Petri di 100 mm contenenti 30 mL di PDB a 24 g/L in acqua.
- I terreni di coltura vengono sterilizzati in autoclave.
- Poi i miceli vengono incubati al buio a 27 gradi, con un'umidità relativa del 78%.
- Quando la superficie poi viene del tutto ricoperta viene raccolto, pulito dal substrato con spatola e acqua deionizzata.
- L'inattivazione del micelio viene eseguita solitamente tramite trattamento termico.
- I miceli sterilizzati tramite autoclave vengono poi essiccati sotto cappa laminare e illuminati con luce UV per circa 100 minuti.

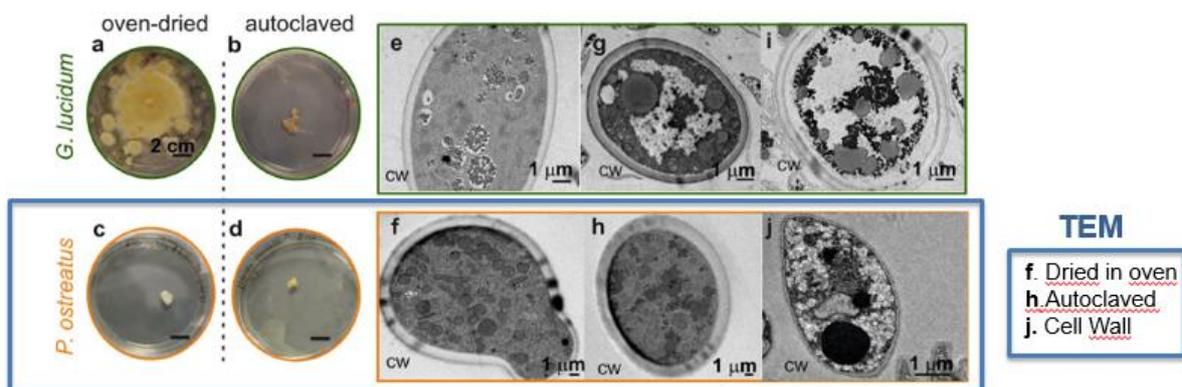
4.1.1 Inattivazione dell'attività biologica

Successivamente, in un esperimento di controllo i pezzi di micelio essiccati in forno venivano rimessi a contatto con PDB e si è visto che il ganoderma occasionalmente ricresceva a differenza del nostro *Pleurotus* quindi il trattamento nel secondo caso era sufficiente per ottenere una configurazione stabile. La scelta del trattamento durante il percorso svolto in questo articolo quindi è ricaduta sull'autoclave in quanto valida per entrambi i ceppi.

L'indagine al microscopio a trasmissione (TEM) ha mostrato che dopo il trattamento in forno l'organizzazione cellulare interna era paragonabile al controllo mentre dopo la sterilizzazione in autoclave il contenuto delle cellule ifali cambia drasticamente: all'interno delle cellule appaiono queste grandi aree bianche a causa probabilmente della plasmolisi e vacuoli come conseguenza di shock termici e pressione. La parete cellulare (CW) rimane intatta in entrambi i miceli anche se leggermente ridotta nel *Pleurotus*.

Il diametro delle cellule era comparabile tra miceli essiccati in forno e quelli sterilizzati in autoclave. Quindi non avviene il restringimento cellulare solitamente segnalati per funghi sottoposti a forte trattamento termico.

Ulteriori analisi sono state eseguite solo sui campioni autoclavati.

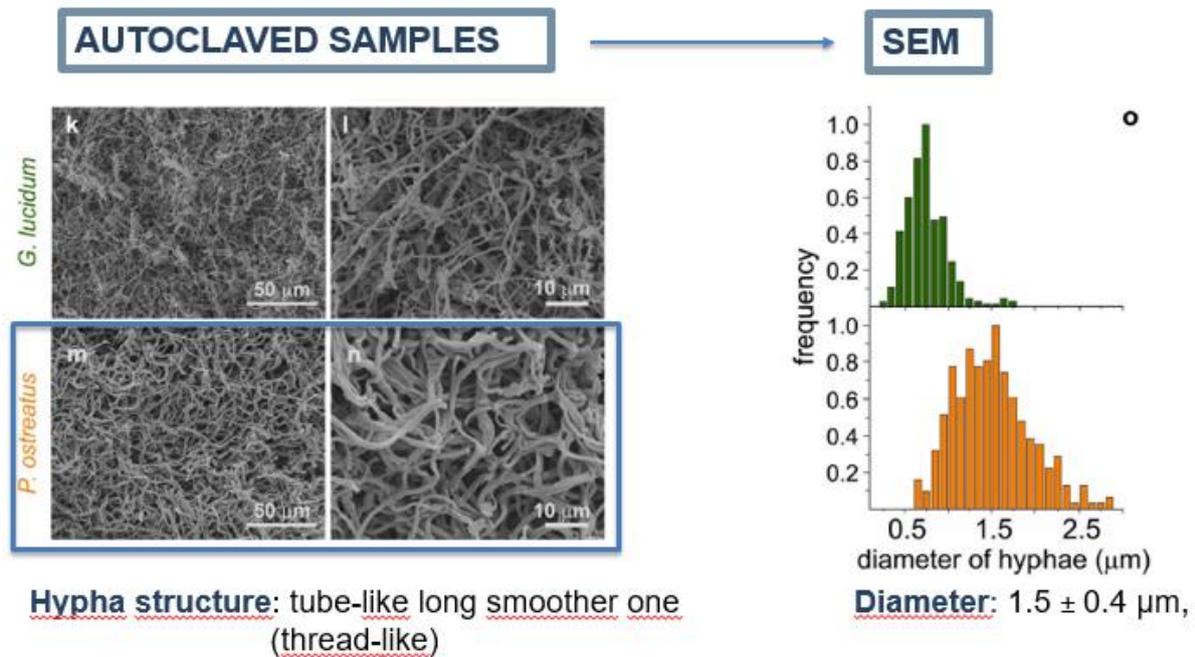


4.1.2 Caratterizzazione Morfologica

L'indagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) dei miceli post autoclave ha consentito l'osservazione della struttura ifale e del calcolo del relativo diametro. Parametri chiave per la realizzazione di uno scaffold biomedico.

Le fibre sono orientate in modo casuale e presentano differenze morfologiche. Il *Pleurotus* presenta una struttura ifale di un unico tipo ovvero quella filiforme quindi

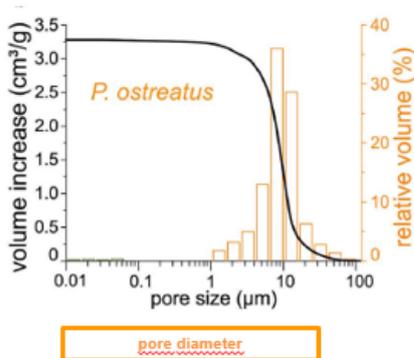
lunga e liscia con un diametro in media di 1,5 più o meno 0,4 micrometri. Sia l'arrangiamento del network di fibre che le dimensioni della rete sono risultati adatti all'attaccamento cellulare.



Tramite porosimetria per intrusione di mercurio viene valutata sia la porosità totale che la distribuzione della dimensione dei pori. La rete di Pleurotus è risultata più densa con un valore di circa 1,48 grammi su centimetro cubo con una porosità sempre più alta di circa 85%. Per quanto riguarda la distribuzione della dimensione dei pori si è visto che la maggior parte del mercurio nel Pleurotus è stata intrusa nei pori di dimensioni che variano dai 7 ai 20 micrometri.

Questi risultati suggeriscono la potenziale capacità delle due diverse reti miceliali di ospitare specifici tipi cellulari a seconda della loro architettura ifale e della porosità. In particolare, considerato lo scopo di questa indagine, i fibroblasti sono più inclini ad infiltrarsi in scaffold che presentano pori con dimensioni che vanno dai 20 ai 100 micrometri ma si dice che pori più piccoli favoriscano l'adesione delle cellule, la formazione di ponti e la produzione di ECM.

MIP



Porosity: 85%

3D network density: 1.48 ± 0.03 g/cm³

Pore size distribution: 7 – 20 µm

≠ mycelial networks host ≠ cell types

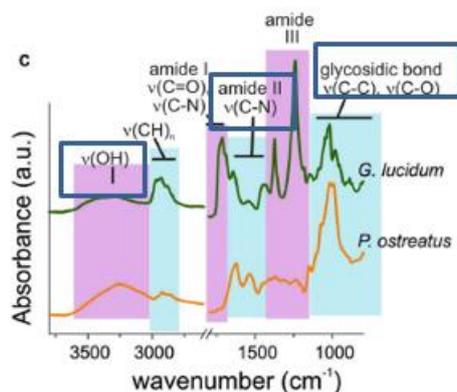
🔍 Fibroblasts better infiltrate scaffolds pores from 20 to 100 µm, but smaller pores are reported to favor cells adhesion, bridging and ECM production 🔍

4.1.3 Caratterizzazione Chimica

Le cellule preferibilmente si attaccano a frazioni di carboidrati e proteine, in particolare interagendo con i proteoglicani e le proteine presenti nella ECM.

In particolare: i gruppi carbossilico, solfato e idrossile esibiti dai GAG e i motivi amminoacidici RGD presenti sulle proteine ECM (collagene e fibronectina) sono i responsabili dell'adesione cellulare.

Le analisi ATR – FTIR rivelano come i gruppi idrossile, carbossilico e ammidico siano presenti in entrambi i ceppi dato che polisaccaridi, lipidi e proteine compongono la parete cellulare fungina. (Presentano diversi range di allungamento per il diverso contenuto di chitina che influenza le caratteristiche anche di idrofobicità e resistenza meccanica).

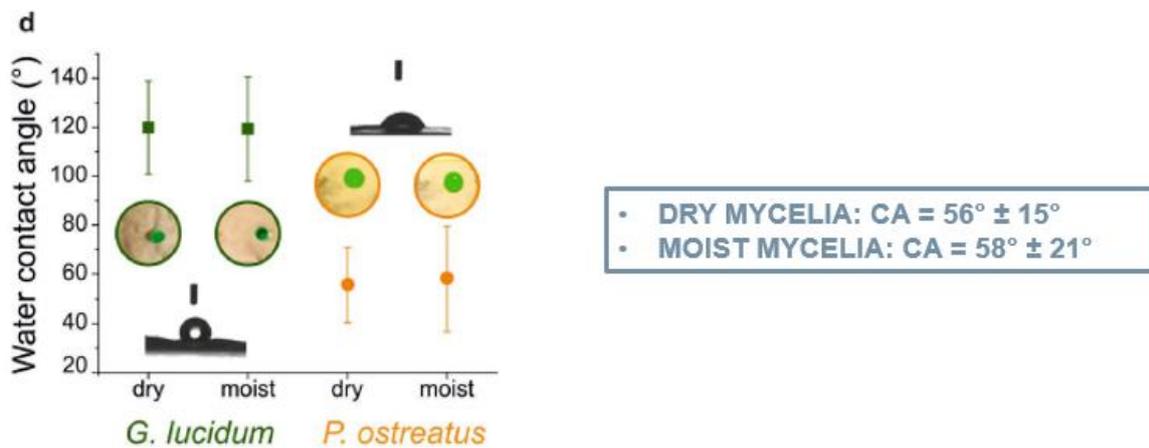


4.1.4 Caratterizzazione Idrodinamica

Il comportamento idrodinamico viene analizzato tramite il calcolo dell'angolo statico di contatto con l'acqua (CA) e dalla capacità di assorbire umidità dell'acqua in una atmosfera d'acqua saturata.

L'angolo di contatto è stato misurato per 24h e i substrati del micelio sia in ambiente asciutto che umide (applicazione biomedicale prevede applicazioni in un mezzo contenente acqua).

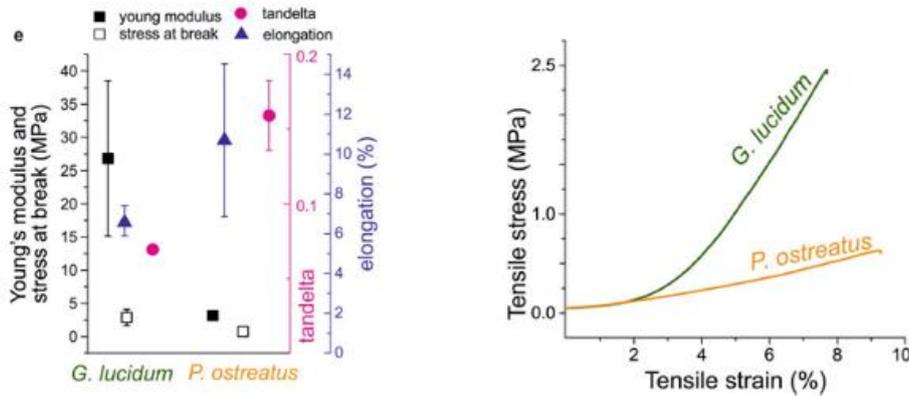
Il CA presenta un angolo statico di 56 gradi per i miceli secchi e 58 per quelli umidi. L'angolo di contatto dipende sicuramente dalla composizione chimica e dalla porosità ma anche fortemente dalla topografia superficiale. In generale si ritiene che superficie più idrofile favoriscano l'attaccamento cellulare.



4.1.5 Caratterizzazione Meccanica

Viene poi svolta un'indagine sulle proprietà meccaniche sia tramite prove di trazione che tramite DMA (analisi meccanica dinamica). Dato che le applicazioni sono previste in un ambiente umido i miceli sono stati prima condizionati in un'atmosfera umida al 100%.

Nel complesso, la rigidità del micelio è paragonabile ai valori riportati per gli altri materiali impiegati nell'ingegneria dei tessuti, in particolare per l'imitazione della pelle.



- YOUNG MODULUS: 3.2 ± 0.1 MPa
- ELONGATION: $10.7 \pm 3.8\%$
- STRESS BREAK: 0.7 ± 0.3 MPa

4.1.6 Saggi di Biocompatibilità

Per prima cosa è stato fatto un test per valutare la citotossicità di un estratto di terreno di coltura cellulare dell'intero micelio.

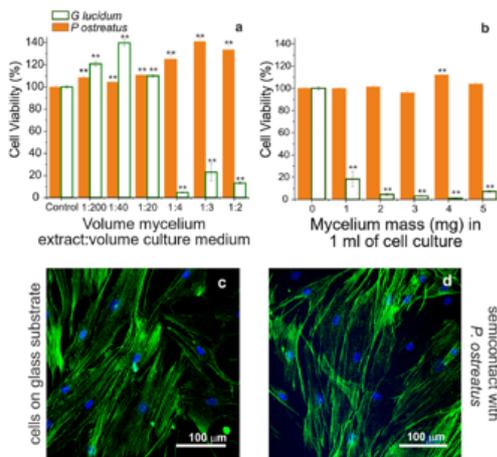
Sono stati utilizzati delle cellule adulte di fibroblasti dermici umani primari e la vitalità delle cellule in presenza degli estratti del mezzo di coltura del micelio è stata valutata tramite saggio MTS. (nuovo metodo per il dosaggio MTS che utilizza un nuovo tipo di colorante tetrazolio, avviene sempre una riduzione del colorante tramite aggiunta di substrato).

Inoltre è stato condotto un esperimento di "semi - contatto" in cui i fibroblasti si attaccavano sul fondo di piastre e coltivati in presenza di un pezzo di micelio tenuto a galleggiare sopra di esse.

Dagli esperimenti eseguiti con il *Pleurotus* è stata registrata una vitalità massima per ciascuna condizione testata e i fibroblasti hanno mostrato la stessa morfologia delle cellule di controllo.

È stata infine condotta un'analisi UPLC-MS per valutare i metaboliti del micelio e si è visto come per il *Pleurotus* i principali metaboliti sono gli acidi grassi idrossilati che sono risultati innocui per le cellule primarie.

- Primary human dermal fibroblast adult cells (HDFa)



• Pleurotus → maximum viability in both condition

High – resolution UPLC-MS

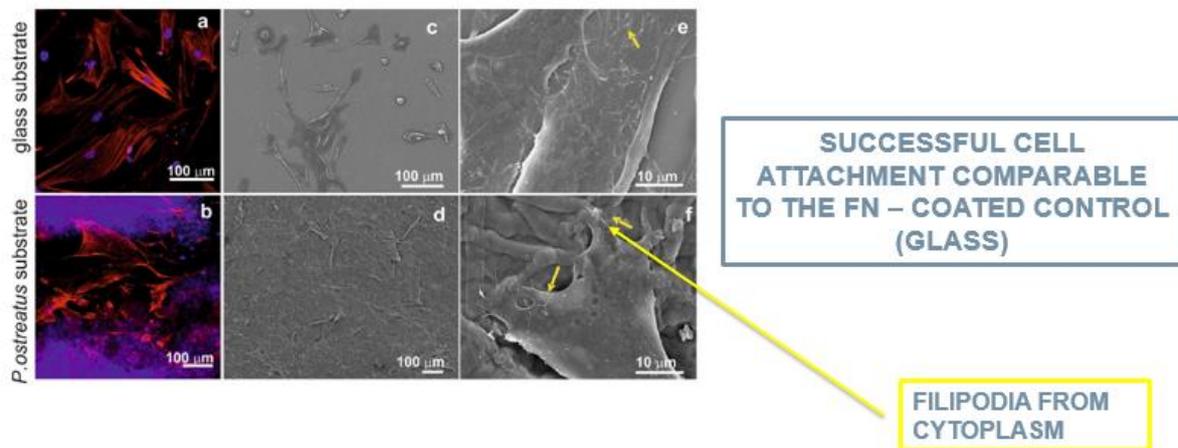
Major metabolites: hydroxylated fatty acids
→ harmless for the primary cells

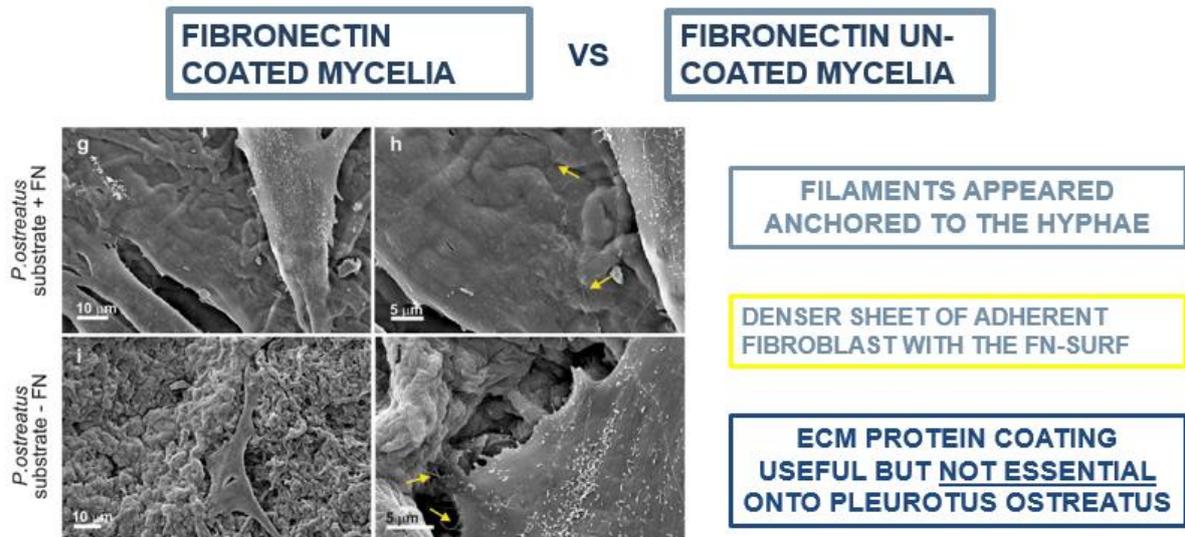
4.1.7 Crescita diretta di fibroblasti umani primari sul micelio

Considerando i risultati della valutazione della biocompatibilità, l'attaccamento dei fibroblasti primari sono stati testati solo sul micelio di Pleurotus. L'esperimento è stato condotto su substrati rivestiti con fibronectina per valutare se è necessario utilizzare questa proteina per mediare l'interazione tra substrato e cellule e quindi favorire l'adesione. Tramite SEM si è visto che l'attaccamento cellulare ha avuto successo, abbiamo l'adesione dei fibroblasti alla matrice 3D di micelio.

Interessante è notare che l'indagine al SEM ha rilevato la presenza dei filamenti citoplasmatici (filipodi) ancorati alle ife. Come previsto, quando utilizziamo il rivestimento di fibronectina è stato osservato un foglio più denso di fibroblasti aderenti quindi il rivestimento proteico non è essenziale ma utile per la promozione dell'attaccamento.

FIBRONECTIN COATED GLASS VS FIBRONECTIN COATED MYCELIA





4.1.8 Conclusioni

In conclusione, miceli di funghi filamentosi, non patogeni aventi una tridimensionale spontaneamente formata rete biopolimerica costituisce scaffold biocompositi auto-crescenti ideali per la crescita cellulare.

Viene dimostrato per la prima volta che il micelio di *Pleurotus ostreatus* può essere utilizzato direttamente come scaffold per la crescita delle cellule, determinando l'attaccamento di fibroblasti umani primari con eccellente vitalità e morfologia paragonabile a quella osservata nei campioni di controllo.

L'unico trattamento era un processo di sterilizzazione in autoclave semplice e veloce eseguito sul biomateriale composito auto-cresciuto, con il duplice scopo di inattivare completamente le spore fungine e sterilizzare l'impalcatura tramite un metodo standardizzato. Per quanto ne sappiamo, questo è il primo rapporto di cellule umane primarie direttamente placcate su un'impalcatura miceliare non modificata e non funzionalizzata.

I risultati ottenuti con un altro fungo filamentoso, *Ganoderma lucidum*, hanno mostrato che la completa inattivazione di le cellule ifali sono necessarie ma non sufficienti per garantire la biocompatibilità, in quanto il suo estratto d'acqua conteneva picomolari concentrazioni di acidi organici (acido ganoderico V e oleandrina), che sono risultate dannose per l'HDFa sopravvivenza delle cellule.

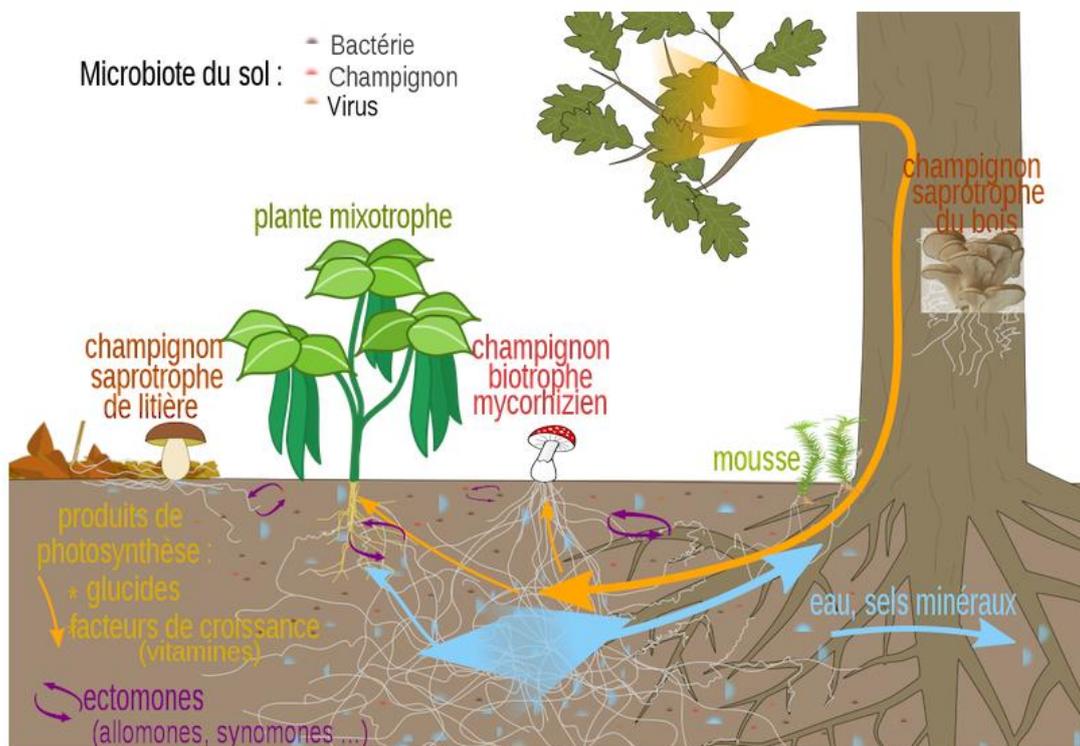
4.2 La rete micorrizica

In vista dell'obiettivo primario della mia analisi, ovvero la stimolazione controllata della crescita miceliale tramite l'ottimizzazione del protocollo di crescita di riferimento, ho deciso di provare a comprendere a pieno come il micelio cresca autonomamente nel sottosuolo, che cosa effettivamente lo porti naturalmente al suo miglior sviluppo.

Mi sono quindi concentrata sulla piena comprensione della rete micorrizica ovvero la rete che nel sottosuolo permette il collegamento tra varie piante e lo scambio di nutrienti. Una resiliente rete di funghi che con i suoi ricchi filamenti riveste e compone le radici delle piante. Un reticolato capace di misurare 100 chilometri nello spazio di un nostro semplice passo. È la rete micotica dei funghi, che abbracciando le radici delle piante crea quel filato che similmente al nostro internet (World Wide Web), funge da sistema di raccolta e smistamento di risorse e informazioni.

Di Wood Wide Web si inizia a parlare verso la fine degli anni novanta. Sarà l'ecologa forestale canadese, ricercatrice ed insegnante presso l'Università della Columbia Britannica, Suzanne Simard, a darne una prima sensazionale prova.

Con il suo studio, Simard mostra come il cuore della vita vegetale si espliciti in quel labirinto di radici e di chilometriche ife dei funghi, capaci di creare un polo connettivo essenziale per la vita di innumerevoli specie vegetali. Dopo Simard, molti altri ricercatori muovono il loro sguardo verso questo tema.



Rete micorrizica con evidenziati gli scambi di nutrienti tra i vari attori della rete

È evidente dunque che negli organismi vegetali risieda un'intelligenza che va oltre l'immaginario comune. La loro, è una comunicazione attiva ed efficiente per l'intero ecosistema. Connettendosi, anche a grandi distanze, le piante possono costantemente fronteggiare i cambiamenti climatici, accedendo ai limitati nutrienti presenti nell'atmosfera. E ci si chiederà forse il perché della complessa interdipendenza che unendo, offre mutuo reciproco soccorso a piante e funghi.

Ebbene i funghi, non potendo compiere la fotosintesi, hanno bisogno delle piante. Dal canto loro però, imbattibili nell'esplorare il terreno, intercettano tutte le vitali sostanze e informazioni tanto preziose per gli alberi ad essi connessi. Da qui le origini di quello che sembra l'accordo di collaborazione sancito tra le due creature: da un lato i funghi offrono l'acqua, i minerali e le sostanze chimiche necessarie agli alberi, ottenendo in cambio gli zuccheri ed il carbonio frutto della fotosintesi. Non solo. Essi si offrono quali attenti ricettori dei messaggi di allarme nei casi di attacco da parassiti. Certo, anche questa interazione mutualistica soffre la minaccia di specie che tendono ad infiltrarsi in tali collegamenti per rubare risorse o danneggiare qualche rivale.

Grazie a questo approfondimento, Ho quindi capito come la direzionalità nel sottosuolo sia data dal tentativo del micelio di trovare un secondo nucleo organico a cui collegarsi: a questo rilascerà carbonio se necessario o lo utilizzerà come serbatoio, dipende dalle condizioni reciproche tra il primo e il secondo albero.

Si forma così la rete micorrizica, da un primo nucleo generalmente situato alle radici di un albero (come se fosse il corpo neuronale) e le varie ife che si estendono a mettere in comunicazione più piante tramite segnali chimici e, secondo recenti studi, anche elettrici.

Da questo tipo di conclusione ho tratto due diverse proposte di approccio per incentivare il direzionamento della crescita ifale anche con una stimolazione chimica oltre che fisica:

- Tracciare sentieri di glucosio in sede di coltura: questa sostanza, come appena approfondito, non è prodotta autonomamente dal micelio ma gli è necessaria quindi si potrebbe formare una serie di sentieri o una raggera di glucosio al fine di incentivare in quelle specifiche direzioni la sua spontanea crescita.
- Porre due diversi ceppi di micelio ai margini di una stessa petri e vedere se, spontaneamente, questi sono incentivati ad unirsi al fine di creare una prima rete miceliale, come nel sottosuolo.

Da ciò che evince dalla letteratura, questi due diversi ceppi dovrebbero, infatti, tendere l'uno verso l'altro al fine di creare un link per il flusso di sostanze e informazioni utili.

5.0 Conclusione

In conclusione, grazie allo studio dei brevetti incentrati nell'impiego del micelio a scopi biomedicali e non, è stato possibile trovare un perimetro d'azione in cui collocare la mia ricerca.

Nello specifico l'analisi volge alla comprensione e ideazione di un modello di bioreattore e di protocollo per l'incentivo di una crescita ifale controllata e direzionata.

Dal punto di vista tecnologico, lo studio brevettuale mi ha permesso di comprendere e, successivamente, condensare in un unico modello di bioreattore, quelli che sono considerati gli stimoli più proficui per il trattamento e il condizionamento della crescita ifale: la pressione, i flussi d'aria e la deposizione controllata di umidità.

Dal punto di vista chimico, l'analisi portata avanti nell'articolo [Increased Homogeneity Mycological Biopolimer Grown into void space] posto al centro della ricerca in merito, ha permesso la piena comprensione di quella che fosse la specie più indicata allo scopo biomedicale, il *Pleurotus Ostreatus*, e quali fossero i valori da settare in coltura per un risultato migliore dal punto di vista della crescita.

Infine, lo studio della rete micorrizica, quindi di come autonomamente il fungo sia incentivato a crescere in una specifica direzione, ha reso possibile una comprensione più netta delle dinamiche che portano allo sviluppo della rete miceliale nel sottosuolo e quindi alla valutazione di una integrazione biomimetica nell'implementazione di protocolli di crescita del micete, come l'utilizzo di glucosio o il porre in siti diametralmente opposti ma nella stessa petri due diversi ceppi di micelio.

BIBLIOGRAFIA

- [1] “M.T. Raimondi/G.B. Fiore (Politecnico di Milano), ‘Course of Technologies for regenerative medicine’ 2019.”
- [2] C. Mason and P. Dunnill, “A brief definition of regenerative medicine,” *Regen. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–5, 2008, doi: 10.2217/17460751.3.1.1.
- [3] C. D. C. Get, N. I. H. Nih, and N. I. H. Only, “Tissue Engineering and Regenerative Medicine What are tissue engineering and regenerative,” pp. 1–7, 2020.
- [4] “S. Mantero (Politecnico di Milano), ‘Corso integrato di Applicazioni biotecnologiche e Bioreattori, parte di Bioreattori’ 2018.”
- [5] “S. Faré (Politecnico di Milano), ‘Corso di Bioingegneria Chimica’ 2016.” .
- [6] “S. Faré (Politecnico di Milano), ‘Corso di Strutture bioartificiali e biomimetiche’ 2018.”
- [7] “M.E. Antinori ‘Advanced mycelium materials as potential self-growing biomedical scaffolds’ in “Nature” a. 2021 n. 12630”
- [8] [Method for making dehydrated mycelium elements and product made thereby] Ecovative Design | EP2702137 A1
- [9] [Methods for forming directional mycelium fibers] – Emergy | WO2021163216 A1
- [10] [Mycelium materials, and methods for production thereof] – Bolt Threads | WO2021124164 A1
- [11] [Method for creating a stiff, rigid mycelium-based biocomposite material for use in structural and non-structural applications] – Okom Wrks Labs Pbc | US20220098545 A1
- [12] [A composite material, and methods for production thereof] – Bolt Threads | EP3973055 A1
- [13] [Increased homogeneity of mycological biopolymer grown into void space] – Ecovative Design | EP3709791 A1
- [14] [Growth media for improved growth and yield of fungus using treated lignocellulosic biomass] – Lusbio | EP3780941 A1

- [15] [Method for producing a product from one or more biological materials or mixtures thereof, product produced according to said method and use of such a product] – Luya Foods | EP3923741 A1
- [16] [A method for the production of fungi] – Grodania | EP-824303 A1
- [17] [Preparation method of environment-friendly packaging material] – Zhou Peihao | CN108864723A
- [18] [Process for manufacturing a composite material based on natural fibres seeded with mycelium and part obtained with such a process] – Menuiserie Elva | EP3003663 A1
- [19] [Mycelium growth bed] – Mycoworks | EP3866579 A1
- [20] [Method for cultivating mushrooms and substrate used for carrying out said method] – Unlait | EP-387233 A1
- [21] [Biocomposite material and method for forming a biocomposite material] – Nike | WO2020150164 A1
- [22] M. Haneef, L. Ceseracciu, C. Canale, I. S. Bayer, and J. A. Heredia-, “Advanced Materials From Fungal Mycelium : Fabrication and Tuning of Physical Properties,” Nat. Publ. Gr., no. December 2016, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1038/srep41292.
- [23] G. Botrnj-, “Chemistry and Architecture of the Mycelial Wall of *Agaricus bisporus*,” 1971.
- [24] R. R. Lew, “How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi,” Nat. Rev. Microbiol., vol. 9, no. 7, pp. 509–518, 2011, doi: 10.1038/nrmicro2591