

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΣ ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΥ - ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, M.Sc.

ΑΘΗΝΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΙΧΑΗΛ ΚΩΜΑΪΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ (Επιβλέπων)

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΓΓΕΛΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ (Μέλος)

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΦΙΛΙΠΠΟΥΣΗΣ

ΤΑΚΤΙΚΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ (Μέλος)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΙΧΑΗΛ ΚΩΜΑΪΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ (Επιβλέπων)

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΓΓΕΛΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΦΙΛΙΠΠΟΥΣΗΣ

ΤΑΚΤΙΚΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΘΝΙΚΟΥ ΜΕΤΣΟΒΙΟΥ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΕΡΒΑΚΗΣ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΥΤΙΝΑΣ

ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Αφιερώνεται

στην ιερή μνήμη του πατέρα μου Τάσου, Γεωπόνου ΑΓΣΑ

ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G. and Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167: 536-551 (IF 1.94).

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Katsarou, E., Komaitis, M., Aggelis, G. and Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167: 1890-1906 (IF 1.94).

ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Philippoussis, A. and **Diamantopoulou, P.** (2011). Agro-food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. *Proceedings of the 7th Int. Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*, pp. 344-356.

Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Papanikolaou, S., Aggelis, G. and Komaitis, M. (2011). Screening strains of seven medicinal basidiomycetes genera for biomass and exopolysaccharides production in liquid state cultures. *1st Medicinal Crops Int. Conference (Medicrops '11)*, Athens, Greece, 2011, Book of Abstracts, pp. 73.

Διαμαντοπούλου, Π., Παπανικολάου, Σ., Κωμαϊτης, Μ. Αγγελής, Γ. και Φιλιππούσης, Α. (2011). Κινητική μελέτες της παραγωγής βιομάζας, κυτταρικών λιπιδίων και πολυσακχαριτών των εδώδιμων μυκήτων *Pleurotus pulmonarius* και *Flammulina velutipes*. Πρακτικά 4^{ου} Συνέδριου της Επιστημονικής Εταιρείας Μικροβιόκοσμος: Αόρατη Πηγή Ζωής. 21-23 Οκτωβρίου, Ιωάννινα, σελ. 84-85.

Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Papanikolaou, S., Aggelis, G. and Komaitis, M. (2010). Effect of agitation on the production of biomass, polysaccharides and lipids during the cultivation of medicinal, edible fungi strains in liquid cultures. In the *Proceedings of the 3rd Congress of Microbiokosmos*, 16-18 December, Athens, Greece, pp. 38-39.

ΑΛΛΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Philippoussis, A., **Diamantopoulou, P.**, Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G. and Papanikolaou, S. (2011). Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (2): 285-297. (IF 1.082)

Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., **Diamantopoulou, P.**, Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou M. and Aggelis, G. (2011). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110 (5): 1138-1150. (IF 2.098)

André, A., **Diamantopoulou, P.**, Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products* 31: 407-416. (IF 2.103)

Papanikolaou, S. **Diamantopoulou, P.**, Chatzifragou, A., Philippoussis, A. and Aggelis G. (2010). Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy and Fuels* 24: 4078-4086. (IF 2.319)

André, A., Chatzifragkou, A., **Diamantopoulou, P.**, Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2009). Biotechnological conversions of bio-diesel-

- derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences* 9 (6): 468-478. (IF 1.24)
- Philippoussis, A., **Diamantopoulou, P.** and Israilides, C. (2007). Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59 (3): 216-219. (IF 2.252)
- Manolopoulou, H., Philippoussis, A., Lambrinos, G. and **Diamantopoulou, P.** (2007). Evaluation of productivity and post-harvest quality during storage of five *Agaricus bisporus* strains. *Journal of Food Quality* 30, 646-663. (IF 0.600)
- Chrysayi-Tokousbalides, M., Kastanias, M.A., Philippoussis, A. and **Diamantopoulou, P.** (2007). Selective fungitoxicity of famoxadone, tebuconazole and trifloxystrobin between *Verticillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection* 26 (4): 469-475. (IF 1.331)
- Diamantopoulou, P.**, Philippoussis, A., Kastanias, M.A., Flouri, F. and Chrysayi-Tokousbalides, M. (2006). Effect of famoxadone, tebuconazole and trifloxystrobin on *Agaricus bisporus* productivity and quality. *Scientia Horticulturae* 109: 190-195. (IF 1.197)
- Chrysayi-Tokousbalides, M., Kastanias, M.A., Coward, S., Philippoussis, A. and **Diamantopoulou, P.** (2006). Residue evaluation of famoxadone and trifloxystrobin in cultivated mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health, part B-Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 41 (5): 571-583. (IF 1.128)
- Kastanias, M.A., Chrysayi-Tokousbalides, M., Coward, S., Philippoussis, A. and **Diamantopoulou, P.** (2006). Residue evaluation of the azole fungicides prochloraz and tebuconazole in the white mushroom *Agaricus bisporus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77: 149-154. (IF 0.992)
- Philippoussis, A., **Diamantopoulou, P.** and Zervakis G. (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 551-557. (IF 1.082)
- Vekiari, S.A., Philippoussis, A., Vitiniotis, S. and **Diamantopoulou, P.** (2002). Evaluation of different mushroom strains on the basis of water content, protein concentration and tyrosinase activity. *Acta Horticulturae* 579: 107-122.
- Philippoussis, A., Zervakis, G. and **Diamantopoulou, P.** (2001). Bioconversion of lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (2): 191-200. (IF 1.082)
- Philippoussis, A., **Diamantopoulou, P.** and Zervakis G. (2001). Calcium chloride irrigation influence on yield, calcium content, quality and shelf-life of the white mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (15): 1447-1454. (IF 1.386)
- Diamantopoulou, P.** and Philippoussis, A. (2001). Production attributes of *Agaricus bisporus* white and off-white strains and the effect of CaCl₂ irrigation on productivity and quality. *Scientia Horticulturae* 91 (3-4): 379-391. (IF 1.197)
- Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S. and **Diamantopoulou, P.** (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* 46 (3): 231-234. (IF 1.034)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μ. Κωμαίτη.

Τα πειράματα που περιλαμβάνονται στη διδακτορική διατριβή έλαβαν χώρα ως εξής: (α) οι καλλιέργειες υγρής και στερεής κατάστασης των μακρομυκήτων και ο προσδιορισμός της βιομάζας και των μεταβολικών προϊόντων τους πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΕΘΙΑΓΕ (νυν ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ), με υπεύθυνο τον Τακτικό Ερευνητή Δρ. Α. Φιλιππούση. Το εν λόγω εργαστήριο μέχρι το 2010 ανήκε στο Ινστιτούτο Γεωργικών Μηχανών και Κατασκευών (ΙΓΕΜΚ) και σήμερα ανήκει στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΙΤΕΓΕΠ); (β) οι αναλύσεις των λιπιδίων που αφορούσαν τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα (χρήση GC και GC-MC) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ, με υπεύθυνο τον Καθηγητή Μ. Κωμαίτη; (γ) οι αναλύσεις της σύστασης των πολυσακχαριτών σε απλά σάκχαρα (χρήση HPLC) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ, με υπεύθυνο τον Επικ. Καθηγητή Σ. Παπανικολάου; (δ) οι αναλύσεις ταυτοποίησης των φωσφολιπιδίων (χρήση HPLC) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, με υπεύθυνο τον Καθηγητή Γ. Αγγελή.

Φθάνοντας στο τέρμα μιας μακρόχρονης, επίπονης αλλά και υπέροχης πορείας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν στην εκπόνηση της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Καταρχήν θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή Μ. Κωμαίτη για την ανάθεση του θέματος, την συμπαράστασή του στην εκπόνηση του διδακτορικού, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Δρ. Α. Φιλιππούση, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, μέντορά μου στη συναρπαστική επιστήμη των μανιταριών, αλλά κυρίως φίλο μου κάθε στιγμή, για την μακρόχρονη εποικοδομητική συνεργασία μας στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων, την παρότρυνσή του να ξεκινήσω την εκπόνηση του διδακτορικού, την ποικιλότητα βοήθεια και συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας, τις πολύτιμες συμβουλές και λύσεις του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς και τη σημαντική συνεισφορά του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη τελική διαμόρφωση του κειμένου της διατριβής.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστώ τον Καθηγητή Γ. Αγγελή, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την ουσιαστική του υποστήριξη, τις υποδείξεις του στη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής και την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερα θέλω να τον ευχαριστήσω για τις εύστοχες παρατηρήσεις του στο κείμενο της διατριβής και τις αντίστοιχες εργασίες, αλλά και για τη διαρκή προθυμία του για επιστημονικές (και όχι μόνο) συζητήσεις που με οδήγησαν σε ορθότερο τρόπο σκέψης όλα τα χρόνια της γνωριμίας μας.

Θα ήθελα επιπρόσθετα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής κκ. Γ. Ζερβάκη, Επικ. Καθηγητή ΓΠΑ, Α. Κουτίνα, Λέκτορα ΓΠΑ, Δ. Κέκο, Καθηγητή ΕΜΠ και Δ. Χατζηνικολάου, Επικ. Καθηγητή ΕΚΠΑ, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της προσπάθειάς μου, το ενδιαφέρον που έδειξαν και το χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη της διατριβής μου, καθώς και τα σχόλια-παρατηρήσεις τους που με βοήθησαν στη τελική διαμόρφωσή της.

Ιδιαίτερα, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον σύζυγό μου και Επικ. Καθηγητή ΓΠΑ Σ. Παπανικολάου, για την αδιάκοπη επιστημονική (και όχι μόνο) συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης του διδακτορικού, το οποίο επίμονα με παρότρυνε να ξεκινήσω και ποικιλότητα με βοήθησε να ολοκληρώσω. Τον ευχαριστώ ακόμη για την φιλοξενία του στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ, την πολύτιμη συμβολή του στην απρόσκοπτη ολοκλήρωση της μελέτης μου και την ευσυνειδησία με την οποία εργάστηκε για τον εμπλουτισμό και την κριτική διόρθωση της διατριβής.

Θα ήταν παράλειψή μου στο σημείο αυτό να μην εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στη Δρ. Αφροδίτη Χατζηφράγκου και στον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Σαρρή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ, στη Δρ. Αυγή Γαρδέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του ΓΠΑ και τέλος στη Δρ. Άννα Μακρή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, για την εποικοδομητική και φιλική τους συνεργασία και το χρόνο που μου διέθεσαν για την πραγματοποίηση των αναλύσεων των δειγμάτων μου, αλλά και για το μοίρασμα κοινών ανησυχιών και προβληματισμών μας.

Επίσης ευχαριστώ τις άλλοτε προπτυχιακές φοιτήτριες και νυν συναδέλφους γεωπόνους του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ κες Μαρία Καπότη, Δήμητρα Κοντογιάννη και Ελένη Κατσάρου που εργάστηκαν μαζί μου στην διεξαγωγή των πειραμάτων καλλιέργειας των μακρομυκήτων, καθώς αποτέλεσαν για μένα πολύτιμοι βοηθοί και συνεργάτες.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω ακόμα μου στον πρώην Διευθυντή μου Δρ. Γ. Παρισόπουλο (ΕΘΙΑΓΕ - ΠΕΜΚ) για την ηθική και οικονομική του στήριξη στην προσπάθειά μου και την απλόχερη εξασφάλιση των αναγκαίων μέσων και αδειών για την απρόσκοπτη διεξαγωγή της μελέτης μου. Ακόμη, ευχαριστώ τη συνάδελφο στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων Ιωάννα Κοντογιώργη για την κάθε είδους βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε και τη συμβολή της στη διόρθωση και διαμόρφωση του κειμένου της διατριβής.

Τέλος, αμέριστη ευγνωμοσύνη εκφράζω στην οικογένειά μου που αποτέλεσε τον αναγκαίο και ουσιαστικό σύμμαχό μου σε αυτή μου την προσπάθεια που έγινε ευκολότερη τόσο με την υπομονή, την κατανόηση και το ενδιαφέρον του συζύγου μου Σεραφείμ, όσο και των παιδιών μου Τιμόθεου και Αναστασίας. Ιδιαίτερα ευγνώμων αισθάνομαι για την μητέρα μου Νταίζη, αναφορικά με την πολύ μεγάλη στήριξη και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια κατά την πολύωρη απουσία μου από το σπίτι. Οι άνθρωποι αυτοί, όπως φυσικά και ο εκλιπών αγαπημένος μου πατέρας Τάσος, αποτέλεσαν και αποτελούν πηγή δύναμης για μένα και τους ευχαριστώ για όλα όσα μου έχουν προσφέρει. Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στα αγαπημένα μου αυτά πρόσωπα.

Σάντη Διαμαντοπούλου,
Αθήνα, Ιούλιος 2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκαν οι φυσιολογικές παράμετροι της μικροβιακής αύξησης και μελετήθηκαν η παραγωγή μυκηλιακής μάζας, η κατανάλωση σακχάρων, η συσσώρευση και (σε κάποιες περιπτώσεις) η αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων και η έκκριση εξωπολυσακχαριτών (EPS) σε στελέχη εδώδιμων και φαρμακευτικών μακρομυκήτων καλλιεργούμενων κυρίως σε υγρές ζυμώσεις, με την έμφαση να δίνεται στις μελέτες για το μύκητα *Volvariella volvacea*. Ενδελεχής διερεύνηση της βιβλιογραφίας έδειξε σχετική έλλειψη συγκριτικών δεδομένων όσον αφορά στην φυσιολογική συμπεριφορά και τη βιοσυνθετική ικανότητα εδώδιμων και φαρμακευτικών μακρομυκήτων σε συνθετικά υγρά θρεπτικά μέσα.

Σε ένα πρώτο επίπεδο, αξιολογήθηκαν 9 βασιδιομύκητες: *Ganoderma lucidum*, *G. applanatum*, *Auricularia auricula-judae*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, *V. volvacea* και 2 ασκομύκητες: *Morchella elata*, *M. esculenta* και μελετήθηκε συγκριτικά η ικανότητά τους για παραγωγή μυκηλιακής μάζας, EPS και λιπιδίων σε υγρές αναδεδυόμενες και μη-αναδεδυόμενες καλλιέργειες, σε διάφορα θρεπτικά μέσα με βάση τη γλυκόζη. Υψηλές τιμές ξηράς μυκηλιακής μάζας (~14-19 g/l), EPS (~1,0-1,3 g/l) και λιπιδίων (έως 22,0%, κ.β. επί ξηράς μάζας) αναφέρθηκαν για αρκετά από τα υπό μελέτη στελέχη. Η ανάλυση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων των μακρομυκήτων έδειξε υψηλές συγκεντρώσεις του λινελαϊκού οξέος για τα περισσότερα από τα στελέχη που μελετήθηκαν. Έτσι, επιλέχθηκαν τα 6 πιο ενδιαφέροντα είδη (*P. pulmonarius*, *G. applanatum*, *F. velutipes*, *A. aegerita*, *V. volvacea* και *M. esculenta*) στα οποία πραγματοποιήθηκε ενδελεχής μελέτη της αύξησης και βιοσύνθεσης εξω- και ενδο-πολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων. Επέκταση του χρόνου της ζύμωσης είχε ως αποτέλεσμα να επιτευχθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας σε σχέση με το αρχικό πείραμα (μέγιστες τιμές μέχρι ~20-22,5 g/l), ενώ και ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς την αναλωθείσα γλυκόζη ($Y_{X/Glc}$) ήταν σε αρκετές περιπτώσεις πολύ υψηλός (0,6-0,9 g/g). Επιπλέον, καταγραφή των μέγιστων τιμών των παραγόμενων EPS έδειξε μεγάλη διακύμανση ανάλογα το στέλεχος και την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης. Ακόμα, παράχθηκαν σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις IPS (π.χ. 5,8-10,9 g/l), η σύσταση των οποίων σε απλά σάκχαρα μεταβαλλόταν σε συνάρτηση με το χρόνο της ζύμωσης και χαρακτηριζόταν κατά κύριο λόγο από γλυκόζη και σε μικρότερα ποσοστά από φρουκτόζη, μαννιτόλη και ξυλιτόλη. Σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων (σε % κ.β. επί ξηράς μυκηλιακής μάζας) καταγράφηκαν στα πρώιμα στάδια του αυξητικού κύκλου (μέχρι τη 12^η ημέρα καλλιέργειας), φτάνοντας το 20,0-22,5%, κ.β. ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε αποικοδόμησή τους. Η σύσταση των λιπιδίων, με κύριο λιπαρό οξύ το λινελαϊκό (ποσοστό >50%, κ.β.) και ακόλουθα τα ελαϊκό (έως 40%, κ.β.) και παλμιτικό (10-30%, κ.β.), εμφάνισε διαφοροποιήσεις σε σχέση με το χρόνο ζύμωσης και την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης, με το προφίλ των λιπαρών οξέων να σημειώνεται πιο κορεσμένο στους *M. esculenta* και *V. volvacea*.

Σε άλλη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε εκτενέστερα η φυσιολογία του μύκητα *V. volvacea*, με συγκριτική αξιολόγηση της ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου τεσσάρων στελεχών του είδους (188, 190, 191 και 192) που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri και σε υγρές ζυμώσεις, προκειμένου να αξιολογηθεί

η παραγωγή μυκηλιακής μάζας για τα τέσσερα στελέχη. Ανάλυση του κυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για όλα τα στελέχη έδειξε μη-αμελητέα ύπαρξη χαμηλομοριακών και υψηλομοριακών κορεσμένων λιπαρών οξέων (π.χ. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0), υποδεικνύοντας ότι αυτού του είδους το προφίλ λιπαρών οξέων είναι χαρακτηριστικό για το είδος *V. voluacea*. Ποσοτικοποίηση των κλασμάτων των παραγόμενων λιπιδίων έδειξε σχετικά υψηλότερη περιεκτικότητα του ουδέτερου κλάσματος (NL) από ό,τι το κλάσμα των γλυκολιπιδίων και σφιγκολιπιδίων (G+S), ενώ σε πολύ μικρότερα ποσά ανιχνεύτηκαν τα φωσφολιπίδια (PL). Ανάλυση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα έδειξε ως πιο κορεσμένο κλάσμα αυτό των φωσφολιπιδίων. Στη συνέχεια, το στέλεχος 190 καλλιιεργήθηκε σε αναδεδόμενες και στατικές συνθήκες και τόσο η κατανάλωση της γλυκόζης, όσο και η παραγωγή βιομάζας, IPS και EPS ήταν σχεδόν ταυτόσημες για αμφότερες τις καλλιέργειες. Μόνο η παραγωγή λιπιδίων (σε % κ.β. επί ξηράς μάζας) εμφάνισε σχεδόν διπλάσιες τιμές στην αναδεδόμενη σε σχέση με τη στατική καλλιέργεια, ενώ η ανάλυση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα επιβεβαίωσε τα προηγούμενα ευρήματα. Ποσοτικός προσδιορισμός των κλασμάτων στις διάφορες φάσεις του αυξητικού κύκλου έδειξε ότι στα πρώιμα στάδια της ζύμωσης όπου ανιχνεύτηκαν υψηλότερες ποσότητες λιπιδίων επί ξηράς μάζας, το ποσοστό του NL ήταν υψηλότερο και ενόσω καταναλώνονταν τα ενδοκυτταρικά λιπίδια, υπήρξε εκλεκτική κατανάλωση των NL με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των G+S και των PL. Επιπλέον, το στέλεχος *V. voluacea* 190 χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών πηγών C και N στη φυσιολογία του. Μεγάλη παραγωγή βιομάζας διαπιστώθηκε κατά την αύξησή του στη γλυκόζη και τη φρουκτόζη (14,5-15,2 g/l), τόσο σε αναδεδόμενες όσο και σε στατικές καλλιέργειες, αλλά και στο άμυλο στις αναδεδόμενες (15,5 g/l), ενώ ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας (π.χ. 11,3 g/l) και με υψηλό συντελεστή $Y_{X/Glc}$ (~0,7 g/g) αναφέρθηκαν για την ξυλόζη στις στατικές καλλιέργειες. Πολύ μικρότερη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις μαλτόζη και σακχαρόζη, τόσο στις αναδεδόμενες όσο και τις στατικές καλλιέργειες. Σχετικά με τις πηγές αζώτου, η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης έδωσαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ περιορισμένη βιομάζα παρατηρήθηκε στην ουρία, το NH_4NO_3 και την L-τροπιτοφάνη. Σε ό,τι αφορά την παραγωγή των EPS, τα πιο ικανοποιητικά υποστρώματα ήταν οι γλυκόζη και φρουκτόζη υπό αναδεδόμενες συνθήκες και οι ξυλόζη, άμυλο και φρουκτόζη υπό στατικές. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι πολύ ικανοποιητική βιοσύνθεση EPS πραγματοποιήθηκε στα υποστρώματα που δεν ευνόησαν την παραγωγή βιομάζας. Η συγκέντρωση των IPS έδειξε να εξαρτάται από την πηγή C, με τις γλυκόζη και φρουκτόζη να ευνοούν την παραγωγή τους υπό αναδεδόμενες και στατικές συνθήκες και το άμυλο υπό αναδεδόμενες. Κύριο συστατικό των παραγόμενων πολυσακχαριτών αναδείχθηκε η γλυκόζη, ανεξάρτητα από το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε. Η βιοσύνθεση και η σύσταση των συνολικών λιπιδίων που μελετήθηκαν στις διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου και σε διάφορα χρονικά σημεία της ζύμωσης ήταν σε συνάφεια με τα προηγούμενα αποτελέσματα, καθώς μεγαλύτερα ποσοστά λιπιδίων (σε %, κ.β. επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας) αναφέρθηκαν στις πρώιμες φάσεις της αύξησης (μέγιστο ποσοστό λιπιδίων ~18%, κ.β.), με το ποσοστό λίπους να μειώνεται αξιοσημείωτα προϊούσης της ζύμωσης. Όπως και σε προηγούμενες αναλύσεις, παρατηρήθηκε μη-αμελητέα ύπαρξη

χαμηλομοριακών και υψηλομοριακών κορεσμένων λιπαρών οξέων (π.χ. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0) επί των παραγόμενων μυκηλιακών λιπιδίων. Πάντως, καίτοι οι διάφορες πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν μεγάλη βιοχημική ομοιότητα σε μεταβολικό επίπεδο, η αύξηση του *V. voluacea* AMRL 190 σε αυτού του είδους τα υποστρώματα έδειξε αξιοσημειώτες διαφοροποιήσεις στο επίπεδο της σύστασης σε λιπαρά οξέα των συνολικών λιπιδίων. Επίσης, ποσοτικοποίηση των λιπιδιακών κλασμάτων έδειξε (σχετικά) υψηλή περιεκτικότητα των NL (47-65% κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων), ενώ σε μικρότερα ποσά ανιχνεύτηκαν τα G+S και (κυρίως) τα PL. Ανάλυση της σύστασης των φωσφολιπιδίων έδειξε διαφοροποιήσεις σχετιζόμενες με τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ τα κύρια PL που ανιχνεύτηκαν ήταν οι κλάσεις φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και φωσφατιδυλοχολίνη (PS).

Τέλος, ο μύκητας *V. voluacea* 190 καλλιεργήθηκε υπό αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (30 έως 95 g/l) και σταθερή αρχική συγκέντρωση αζώτου. Στα πρώιμα στάδια των ζυμώσεων, η αύξηση του αρχικού λόγου C/N (από 20 έως 60) είχε ως απόρροια αξιοσημειώτη αύξηση του ποσοστού των παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων (από ~14% σε ~31% κ.β. επί ξηράς μάζας), ενώ αυξήθηκε και η μέγιστη συγκέντρωση μυκηλιακής μάζας (μέγιστη τιμή βιομάζας ~22 g/l για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 95 g/l). Παρόλα αυτά, ο συντελεστής $Y_{X/Glc}$ μειώθηκε αξιοσημειώτα με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, ενώ η ταχύτητα κατανάλωσης της γλυκόζης r_{Glc} (σε g/l/d) αυξήθηκε σημαντικά. Ο αυξανόμενος περιορισμός του μέσου σε άζωτο είχε ως αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση IPS σε πολύ μεγάλες και διαρκώς αυξανόμενες ποσότητες. Η μέγιστη συγκέντρωση IPS ανιχνεύτηκε για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 95 g/l και ήταν 12,2 g/l, τιμή συγκρινόμενη με τις υψηλότερες της διεθνούς βιβλιογραφίας. Κινητική ανάλυση της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων και πολυσακχαριτών έδειξε μια αλληλοδιαδοχή στη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών προϊόντων, καθώς αρχικά συντέθηκαν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις λιπίδια και κατόπιν παρατηρήθηκε αύξηση της συσσώρευσης των IPS με ταυτόχρονη αποικοδόμηση των λιπιδίων. Στα υποστρώματα που εμφάνιζαν υψηλούς λόγους C/N υπήρχε σύνθεση λιπιδίων πλούσιων σε λινελαϊκό οξύ, ενώ η παρουσία των χαμηλομοριακών και υψηλομοριακών κορεσμένων λιπαρών οξέων (π.χ. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0) μειωνόταν πολύ. Το κλάσμα των PL ήταν εκ νέου το πιο κορεσμένο, ενώ ανιχνεύτηκαν κυρίως οι κλάσεις PE, PI, PC και PS, το ποσοστό των οποίων μεταβάλλονταν με το λόγο C/N και το χρόνο της ζύμωσης. Τέλος, η σύσταση των παραγόμενων IPS σε απλά σάκχαρα μεταβαλλόταν σε συνάρτηση με το χρόνο καλλιέργειας, με τη γλυκόζη να είναι η κύρια δομική μονάδα των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

Λέξεις - κλειδιά: μακρομύκητες, *Volvariella voluacea*, ενδοπολυσακχαρίτες, εξωπολυσακχαρίτες, λιπίδια, λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια

ABSTRACT

The physiological behaviour of several edible and medicinal fungi, grown basically in liquid cultures, was investigated. Specifically, the production of mycelial mass, the substrate consumption, the accumulation and (in some cases) the degradation of intracellular compounds like polysaccharides and lipids, as well as the secretion of exopolysaccharides (EPS) was studied, with special attention given in the macromycetous *Volvariella volvacea*. Intensive literature survey showed relative lack of comparative data on the physiological behaviour and biosynthetic capacity of edible and medicinal fungi in liquid synthetic culture media.

Initially, 9 basidiomycetes (*Ganoderma lucidum*, *G. applanatum*, *Auricularia auricula-judae*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, *V. volvacea*) and 2 ascomycetes (*Morchella elata*, *M. esculenta*) were evaluated by examining their ability to produce mycelial mass, exopolysaccharides (EPS) and lipids in liquid static- and shake-flask cultures at various culture media based on glucose. High values of dry mycelial mass (~ 13-19 g/l), EPS (~ 1.0-1.3 g/l) and lipids (up to 22.0%, w/w, in dry matter) were reported for several of the studied strains. Fatty acid (FA) analysis of cellular lipids showed high concentrations of linoleic acid for most of the strains studied. By this way, the 6 most interesting species (*P. pulmonarius*, *G. applanatum*, *F. velutipes*, *A. aegerita*, *V. volvacea* and *M. esculenta*) were selected and further kinetic analysis of growth and biosynthesis exo- and endo-polysaccharides (IPS) and lipids was made. Extension of the fermentation time resulted in higher concentrations of biomass, compared with the initial experiment (maximum biomass values ~20-22.5 g/l), whereas the conversion yield of biomass produced per glucose consumed ($Y_{X/Glc}$) was in several cases promising (0.6-0.9 g/g). Additionally, the maximum EPS values showed great variation depending on the strain and the application (or not) of agitation. Also, very high concentrations of IPS (e.g. 5.8-10.9 g/l), close to the maximum reported in the literature, were syntheses. IPS composition in simple sugars varied according to cultivation time and was characterized primarily by glucose and in smaller percentages by fructose, mannitol and xylitol. Relatively high concentrations of lipids (e.g. 20-22.5%, w/w) were recorded in the early growth stages (e.g. up to the 12th day after inoculation), while then degradation was observed. The main cellular FAs were linoleic (>50%, w/w) followed by oleic (up to 40%, w/w) and palmitic (10-30%, w/w). Differences in the FA composition related with the fermentation time and the application (or not) of agitation were revealed, with the profile of FAs being the most saturated in *M. esculenta* and *V. volvacea* fungi.

In another series of experiments, the fungus *V. volvacea* was more extensively studied, by evaluating the mycelium growth rate of four *V. volvacea* strains (188, 190, 191 and 192) grown in Petri dishes and by assessing the production of mycelial mass for the above mentioned strains in liquid cultures. Analysis in the FA composition of fungal lipids demonstrated for all strains a non-negligible presence of low- and high-chain saturated FAs (e.g. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0), suggesting that this FA profile is typical for *V. volvacea*. Quantification of the fractions of the produced lipids showed for most

strains relatively higher content of neutral lipids (NL), with glycolipids and sphingolipids (G+S) and principally phospholipids (PL) found in much smaller amounts. FA analysis of the fractions showed as most saturated fraction that of PL. Strain *V. volvacea* 190 was then grown in both agitated and static conditions and glucose consumption and biomass, IPS and EPS production were almost identical for both cultures. Only the production of lipids (in %, w/w) showed almost double value in agitated compared with static culture, while FA analysis of fungal lipids confirmed the previous findings. Quantification of lipid fractions at different stages of fungus growth cycle showed that, in the early stages of fermentation where higher amounts of lipids (% w/w) were detected, the percentage of NL was higher and during lipid degradation process, selective consumption of NL along with an increase in G+S and PL occurred. Moreover, strain *V. volvacea* 190 was used to evaluate the effect of 10 different sources of carbon and nitrogen in its physiology. With initial sugar concentration of 30 g/l, high biomass production (14.5-15.2 g/l) was achieved with glucose and fructose employed as substrates in both agitated and static cultures and in starch (15.5 g/l) for agitated cultures, while satisfactory amounts of biomass (e.g. 11.3 g/l) accompanied by high yields $Y_{X/S}$ (~0.7 g/g) were reported for xylose in static cultures. Much lower biomass production was recorded in the disaccharides maltose and sucrose, in both agitated and static cultures. Concerning nitrogen sources, peptone and yeast extract gave very satisfactory results, while low biomass was observed in urea, NH_4NO_3 and L-tryptophan. Regarding the production of EPS, the most satisfactory substrates were glucose and fructose in agitated conditions and xylose, starch and fructose in static ones. Interestingly, very satisfactory biosynthesis in EPS was performed in substrates that did not favour at all the production of biomass (e.g. maltose, sucrose). The concentration of IPS was depended on the employed carbon source, with glucose and fructose favouring the production of IPS under agitated and static conditions and starch in shake-flask experiments. Glucose was the main base-unit for the IPS synthesized, regardless of the substrate used. Biosynthesis and FA composition of total microbial lipids studied in various carbon and nitrogen sources used validated the previous results, while larger amounts of lipids (% w/w) were reported in the early stages of growth (maximum lipid percentage ~18%, w/w) with the percentage of lipids being reduced remarkably with time. FA analysis of cellular lipids showed high content of linoleic acid, in many cases however, non-negligible presence of low-chain and high-chain and saturated FAs (e.g. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0) was reported. The FA composition of *V. volvacea* AMRL 190 presented differences in relation with the individual sugars used as substrates. Also, quantification of the lipid fractions showed (relatively or remarkably) high content of the NL (47-65%, w/w, of total lipid), while in smaller amounts were detected the fractions of G+S and PL. Compositional analysis of PL showed differences related to the carbon sources used, while the main PL detected were the phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylserine (PS).

Finally, the macromycetous *V. volvacea* 190 was cultivated under increasing initial glucose concentrations (~30 to 95 g/l) and constant initial concentration of nitrogen. In the early stages of

fermentation, increasing the initial ratio C/N (from 20 to 60) resulted in a marked increase in the percentage of intracellular lipid produced (from ~14% to ~31%, w/w), whereas the maximum concentration of biomass (maximum biomass value ~ 22 g/l for initial glucose concentration of 95 g/l) was also increased. However, biomass yield $Y_{X/Glc}$ significantly decreased with the initial glucose concentration increase, while interestingly, glucose consumption rate (r_{Glc} in g/l/d) significantly increased with the increase of glucose concentration into the medium. The increasing nitrogen restriction of the medium resulted in IPS biosynthesis in large and constantly increasing rates. The maximum IPS concentration was detected for initial glucose concentration 95 g/l and it was 12.2 g/l, a value compared with the highest values reported in the literature. Kinetic analysis of biosynthesis of intracellular lipids and polysaccharides showed a succession in the accumulation of the intracellular products, as initially relatively high concentrations of lipids were synthesized and then the progressive nitrogen limiting conditions led to increased accumulation of IPS with simultaneous degradation of intracellular lipids. In substrates with high C/N ratios, there was a high biosynthetic potential for production of fungal lipids rich in linoleic acid, while the presence of low- and high-chain saturated FAs (e.g. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0) were greatly reduced. In line with previous findings, the PL fraction was the most saturated, whereas the main PL detected were PE, PI, PC and PS, the percentage of which changed with the C/N ratio and the time of fermentation. Finally, the composition in simple sugars of the produced IPS changed depended on the cultivation time, with glucose being the primary building block of intracellular polysaccharides.

Key-words: macromycetes, *Volvariella volvacea*, endopolysaccharides, exopolysaccharides, lipids, fatty acids, phospholipids

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	i
ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xiii
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
I.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΕΣ (ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ)	1
I.2. ΟΙ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	4
I.2.1. Μορφολογικοί, οικο-φυσιολογικοί και καλλιεργητικοί χαρακτήρες.....	4
I.2.1.1. <i>Ganoderma</i> spp.....	8
I.2.1.2. <i>Pleurotus</i> spp.....	9
I.2.1.3. <i>Lentinula edodes</i>	10
I.2.1.4. <i>Agrocybe aegerita</i> (<i>A. cylindracea</i>)	12
I.2.1.5. <i>Morchella</i> spp.	12
I.2.1.6. <i>Volvariella volvacea</i>	14
I.2.2. Διατροφικές και φαρμακευτικές ιδιότητες μακρομυκήτων	16
I.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΥΘΟΥ	23
I.3.1. Παραγωγή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	28
I.3.2. Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS).....	32
I.3.3. Παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων	33
I.4. ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ	36
I.4.1. Γενικά για το μικροβιακό λίπος	36
I.4.2. Είδη και χημική σύσταση λιπιδίων βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων.....	39
I.4.3. Διατροφικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των μυκητιακών λιπιδίων.....	42
I.4.4. Η βιοσύνθεση των μικροβιακών λιπιδίων	45
I.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	48
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
II.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ	49
II.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ	49
II.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	50
II.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΒΥΘΟΥ ΣΕ ΦΙΑΛΕΣ.....	51
II.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ	53
II.6. ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	54
II.6.1. Προσδιορισμός pH.....	54
II.6.2. Συλλογή βιομάζας.....	54
II.6.3. Προσδιορισμός σακχάρων στη διάρκεια της ζύμωσης	55

II.6.3.1. Ανάγοντα σάκχαρα.....	55
II.6.3.2. Ολικά σάκχαρα	56
II.6.4. Προσδιορισμός εξωπολυσακχαριτών (EPS)	56
II.6.5. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	57
II.6.6. Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους	57
II.6.7. Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography - G.C.).....	59
II.6.8. Προσδιορισμός σύστασης σακχάρων - Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας (High Performance Liquid Chromatography - H.P.L.C.).....	60
II.6.9. Ανάλυση λιπιδιακών κλάσεων των φωσφολιπιδίων (PL). Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας (H.P.L.C.).....	61
II.6.10. Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (G.C.-M.S.).....	61
II.6.11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	62
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
III.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ	63
III 1.1 Συντομογραφία - μονάδες.....	65
III.2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ - ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ 11 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΑ ΥΓΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ	66
III.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ GPYS.....	81
III.4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ VOLVARIELLA VOLVACEA ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ GPYS	112
III.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΗΓΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ VOLVARIELLA VOLVACEA AMRL 190.....	126
III.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ (ΜΕΤΑΒΑΛΟΜΕΝΟΣ ΛΟΓΟΣ C/N) ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ V. VOLVACEA AMRL 190 ΣΕ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΤΕΙΕΣ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΖΩΤΟΥ.....	158
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	173
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	225

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΕΣ (ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ)

Τα μανιτάρια, ετερότροφοι οργανισμοί που παίρνουν τις απαραίτητες οργανικές ενώσεις από ζωντανούς ή νεκρούς οργανισμούς, αποτελούν μια κατηγορία της ομάδας των μυκηλιακών μυκήτων. Μανιτάρια ονομάζονται οι μακροσκοπικές καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής, κυρίως των βασιδιομυκήτων και δευτερευόντως των ασκομυκήτων που χαρακτηρίζονται ως μακρομύκητες. Οι μακρομύκητες βρίσκονται το περισσότερο χρονικό διάστημα του βιολογικού κύκλου ζωής τους ως μυκήλιο. Σε αυτό το βλαστικό στάδιο, το μυκήλιο αποικεί στο υπόστρωμα απορροφώντας θρεπτικά συστατικά με σκοπό την αποθησαύρισή τους για να χρησιμοποιηθούν αργότερα στο στάδιο της καρποφορίας. Η δημιουργία (επαγωγή) μανιταριών (εγγενής αναπαραγωγή) οφείλεται κυρίως στο ερέθισμα ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών που δίνουν το έναυσμα στο μυκήλιο για να περάσει στην αναπαραγωγική φάση. Ο σχηματισμός των καρποσωμάτων (μανιταριών) ξεκινά όταν αναπτύσσονται κάτω από την επιφάνεια του υποστρώματος μικροί 'κόμποι' που ονομάζονται καταβολές (primordia). Οι καταβολές αυξάνονται σε μέγεθος και αν το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, νερό και θρεπτικά συστατικά δεν είναι περιορισμένα, θα δημιουργηθούν τελικά ώριμα μανιτάρια που φέρουν τα σπόρια, μέσω των οποίων οι μακρομύκητες αναπαράγονται εγγενώς. Ανάλογα με τον τρόπο εμφάνισης των σπορίων οι μακρομύκητες διαχωρίζονται σε βασιδιομύκητες, των οποίων τα σπόρια (βασιδιοσπόρια) δημιουργούνται πάνω σε μικροσκοπικά ροπαλόμορφα όργανα τα βασίδια και σε ασκομύκητες, των οποίων τα σπόρια (ασκοσπόρια) αναπτύσσονται μέσα σε αυγόμορφους ή επιμήκεις σάκους, τους ασκούς. Για την συνέχιση του κύκλου ζωής τους, τα μανιτάρια ελευθερώνουν τα σπόριά τους από το ώριμο πλέον καρπόσωμά τους, το οποίο αρχίζει να αποσυντίθεται, ενώ το μυκήλιο συνεχίζει να ζει για χρόνια (Φιλιππούσης, 2003α).

Ο πληθυσμός των μυκήτων σε όλο τον κόσμο υπολογίζεται σε 140.000 είδη, ενώ τα κοινώς αποδεκτά καταγεγραμμένα είδη ανέρχονται σε 82.000, αλλά αυτό εκτιμάται ότι δεν αντιπροσωπεύει παρά το 5% περίπου των υπάρχοντων ειδών (κάθε χρόνο ανακαλύπτονται δεκάδες έως εκατοντάδες νέα είδη). Ακόμα, παγκοσμίως είναι γνωστά περίπου 20.000 βασιδιομυκήτων και 30.000 ασκομυκήτων (Groombridge και Jenkins, 2002). Με βάση τη συστηματική μελέτη των μακρομυκήτων της Ελλάδας, την τελευταία δεκαετία καταγράφηκαν πάνω από 900 είδη μακρομυκήτων εκ των οποίων τα 250 αποτελούν νέες αναφορές για τη χώρα μας, ενώ ο αριθμός των καταγεγραμμένων ειδών μακρομυκήτων στην Ελλάδα εκτιμάται περίπου στα 2.300 είδη (Zervakis κ.α., 2002α,β; Dimou κ.α., 2008). Από τα

γνωστά μανιτάρια, 3.000 είδη χαρακτηρίζονται ως εδώδια και περισσότερα από 1.000 ως φαρμακευτικά (Chang και Miles, 2004). Σε περίπου 80 είδη, έχει μελετηθεί ή αναπτυχθεί η αναγκαία τεχνογνωσία για την καλλιέργειά τους, 50 καλλιεργούνται εμπορικά και περίπου 30 καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα. Στα πιο δημοφιλή περιλαμβάνονται τα: *Agaricus bisporus/bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. citrinopileatus* κ.α. συγγενικά είδη), *Auricularia* spp., *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Coprinus comatus*, *Tremella fuciformis*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pholiota nameko*, *Grifola frondosa*, *Hericiium erinaceus*, *Dictyophora indusiata*, *Stropharia rugosoanulata*, *Lepista nuda*, *Agrocybe aegerita* (*A. cylindraceae*) (Delmas, 1989; Chang και Miles, 2004).

Σύμφωνα με τον Chang (2008), η βιολογία και βιοτεχνολογία των μανιταριών άπτεται τριών πτυχών του ευ-ζην (τρόφιμα, υγεία και περιβάλλον) και συμβάλλει στην αντιμετώπιση τριών σύγχρονων προβλημάτων της ανθρωπότητας: της έλλειψης τροφίμων, της υποβάθμισης της ανθρώπινης υγείας και της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Ως επιστημονικός κλάδος, περιλαμβάνει τρεις βασικές τεχνολογικές εφαρμογές: την τεχνολογία της παραγωγής καρποσωμάτων (βασίζεται σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης), την τεχνολογία της παραγωγής μεταβολιτών και βιο-δραστικών προϊόντων μανιταριών (κυρίως ζυμώσεις υγρής κατάστασης) και τη βιο-εξυγίανση/βιο-αποκατάσταση με χρήση του μυκηλίου των μανιταριών (ζυμώσεις στερεάς και υγρής κατάστασης).

Η τεχνολογία καλλιέργειας των μανιταριών είναι μια πολλά υποσχόμενη βιοδιεργασία αξιοποίησης λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή πολύτιμων για τον άνθρωπο και την κτηνοτροφία προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, ήτοι τροφίμου (μανιτάρια), ζωοτροφών από το εμπλουτισμένο με το μυκήλιο-υπόλειμμα της καλλιέργειας και μεταβολιτών/φαρμακευτικών προϊόντων (Philippoussis, 2009). Τα βασικά στάδια της καλλιέργειας περιλαμβάνουν: (α) την παρασκευή εκλεκτικού υποστρώματος (β) τον εμβολιασμό με το μυκήλιο («σπόρο»-spawn) του μανιταριού, (γ) την ανάπτυξη μυκηλίου στο υπόστρωμα (επώαση) σε ελεγχόμενες συνθήκες, (δ) την επαγωγή-σχηματισμό καταβολών καρποσωμάτων και (ε) την ανάπτυξη-συγκομιδή των μανιταριών (Φιλιππούσης, 2003α). Σήμερα η καλλιέργεια μανιταριών έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους και έχει εξελιχθεί σε υψηλού βαθμού τεχνολογίας αγροτοβιομηχανική επιχείρηση. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών ανήλθε το 2009 σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO (FAOStat, 2011) στα 6,54 εκατομμύρια τόνους (το 72% παράγεται στην Κίνα), ενώ η παγκόσμια αγορά μανιταριών (περιλαμβάνει καλλιεργούμενα και άγρια μανιτάρια, καθώς και τα προϊόντα τους) ανήλθε το 2008 στο ύψος των 26 εκατομμυρίων τόνων (Vostrovský και Jablonská, 2011). Κατά τάξη μεγέθους παγκόσμιας παραγωγής, το

λευκό μανιτάρι (*Agaricus bisporus*) είναι πρώτο στη σχετική λίστα, τη δεύτερη θέση καταλαμβάνει το μανιτάρι *Lentinula edodes* (γνωστό και ως shiitake), ενώ ακολουθούν τα *Pleurotus*, *Auricularia* και *Volvariella* spp. Τα είδη εδώδιμων μανιταριών, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Lentinula*, *Volvariella*, *Agrocybe*, *Ganoderma*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Stropharia*, *Tremella* κ.λ.π. άρχισαν σχετικά πρόσφατα να εμφανίζονται στην αγορά των χωρών της Ε.Ε. (η καλλιέργειά τους ήταν κυρίως εντοπισμένη στις χώρες της Ν.Α. Ασίας) στην οποία παραδοσιακά κυριαρχούσε το λευκό μανιτάρι.

Ειδικότερα, η βιοτεχνολογία των μακρομυκήτων, στην οποία εμπίπτει η παρούσα διδακτορική διατριβή και αναλύεται εκτενέστερα στη συνέχεια, στηρίζεται στις αρχές της βιολογίας/μικροβιολογίας μυκήτων, της τεχνολογίας των ζυμώσεων βυθισμένου τύπου και των βιο-διεργασιών και ασχολείται με την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων μακρομυκήτων και την πιθανή αξιοποίησή τους στη διατροφή, στην υγεία και το περιβάλλον. Ενδεικτικά, οι σημαντικότερες εφαρμογές της καλλιέργειας μακρομυκήτων υγρής κατάστασης αφορούν: (α) στην παραγωγή του μυκηλίου των μακρομυκήτων για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση, (β) στην παραγωγή πολυσακχαριτών και άλλων βιο-δραστικών ενώσεων, (γ) στην παραγωγή βιταμινών, ενζύμων και οργανικών οξέων και (δ) στην παραγωγή αρωματικών ενώσεων (Chang και Miles, 2004; Lindequist κ.α., 2005; Paterson, 2006; Boh κ.α., 2007; Cheung, 2008; Xu κ.α., 2010; Wasser, 2010; Shen κ.α., 2011).

Τέλος, μεταξύ των χρήσεων των μακρομυκήτων σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές σημαντικό ρόλο παίζει και η αξιοποίησή τους σε εφαρμογές βιο-εξυγίανσης. Διάφορα είδη βασιδιομυκήτων λευκής σήψης έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την ικανότητά τους να αποσυνθέτουν οργανικούς ρύπους στα πλαίσια αξιοποίησής τους για τη βιο-εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών και υδάτων που επιτυγχάνεται χάρη στο πλούσιο ενζυμικό δυναμικό τους και την ικανότητά τους να αποδομούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις. Βασιδιομυκήτες που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα με επιτυχία σε βιο-επεξεργασίες είναι: είδη του γένους *Trametes* στην αποδόμηση χλωριωμένων αποβλήτων χαρτοβιομηχανίας, ο *L. edodes* για την απομάκρυνση πενταχλωροφαινολών από μολυσμένα εδάφη, οι *Sporotrichum pulverulentum*, *Trametes versicolor* και *Stereum hirsutum* για την ανοργανοποίηση διχλωροανιλινών, dieldrin, ενώ άλλα είδη, μεταξύ των οποίων και είδη του γένους *Pleurotus*, κατάφεραν να αποδομήσουν TNT (2,4,6-trinitrotoluene), πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH), εντομοκτόνα (DDT, lindane), κ.ά. (Pointing, 2001; Novotný κ.α., 2004; Cohen κ.α., 2002; Rodriguez κ.α., 2004; Asgher κ.α., 2008; Rigas κ.α., 2009). Ακόμη, έχει αναφερθεί η αξιοποίηση μακρομυκήτων σε τεχνολογίες βιο-εξυγίανσης υγρών βιομηχανικών αποβλήτων και των αποβλήτων που προκύπτουν κατά την παραγωγή τροφίμων, με καλά αποτελέσματα

όσον αφορά στην μείωση της βιολογικής απαίτησης σε οξυγόνο (BOD) αλλά και τον αποχρωματισμό τους. Ιδιαίτερα αξίζει να αναφερθεί η περίπτωση της αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (ΥΑΕ), καθώς έχει διαπιστωθεί ότι διάφοροι μακρομύκητες λευκής σήψης (*Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp., *L. edodes*) μπορούν, με τα οξειδωτικά ένζυμα που εκκρίνουν, να αποπολυμερίζουν τα φαινολικά συστατικά με διάσπαση των αρωματικών δακτυλίων και να τα αποχρωματίζουν (Sanjust κ.α., 1991; Martirani κ.α., 1996; Lakhtar κ.α., 2010; Ntougias κ.α., 2012).

Ι.2. ΟΙ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

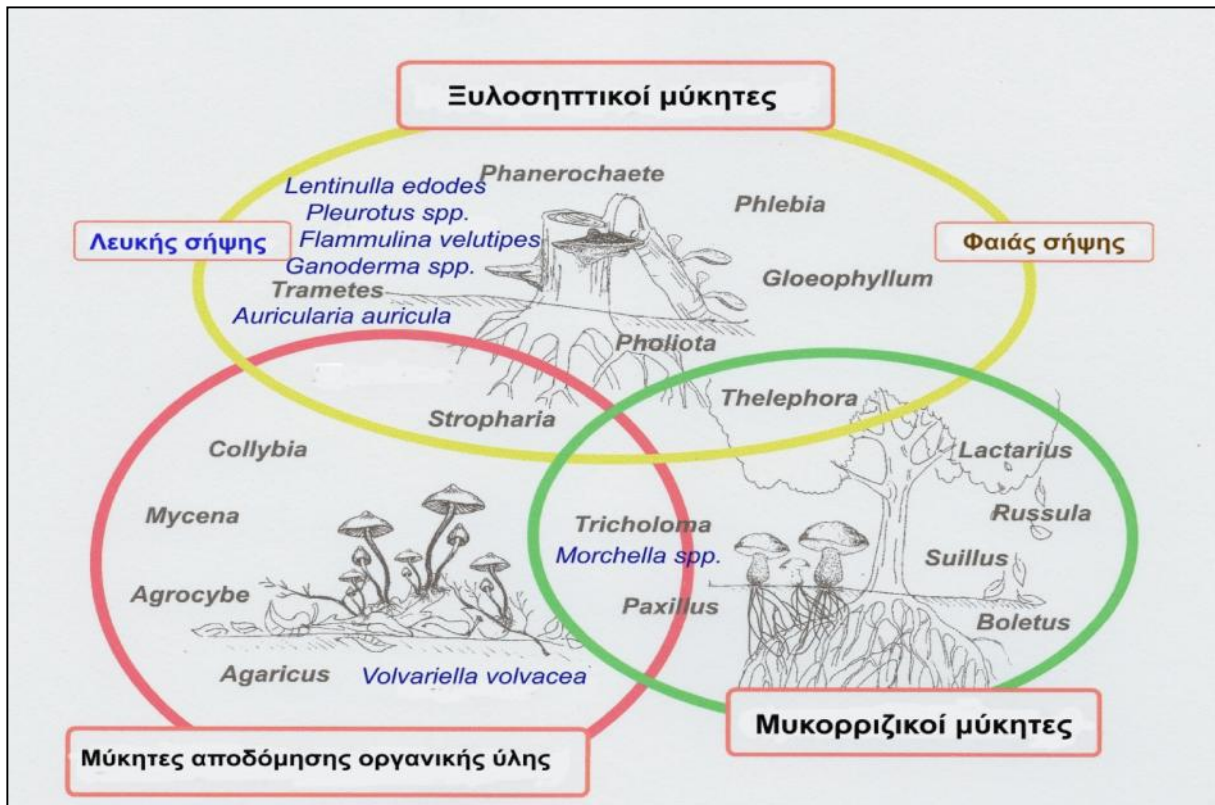
Ι.2.1. Μορφολογικοί, οικο-φυσιολογικοί και καλλιεργητικοί χαρακτήρες

Οι μακρομύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί καθώς δεν περιέχουν χλωροφύλλη (δεν φωτοσυνθέτουν) και έτσι χρειάζονται έτοιμες οργανικές ενώσεις για να τραφούν. Με βάση τις τροφικές τους απαιτήσεις και τις οικολογικές τους προσαρμογές διακρίνονται τρεις κατηγορίες: α) *Σαπροτροφικοί*: Οι μύκητες αυτού του είδους τρέφονται αποδομώντας τις οργανικές ενώσεις νεκρών φυτικών κυττάρων (π.χ. τους ιστούς του ξύλου δέντρων, φυτικά υπολείμματα του εδάφους, όπως πεσμένα φύλλα και κλαδιά). Πολλοί από τους μακρομύκητες αυτής της κατηγορίας είναι σχεδόν αποκλειστικοί αποδομητές της κυτταρίνης και της λιγνίνης. Από τα 3 δομικά συστατικά του ξύλου η κυτταρίνη είναι η πλέον άφθονη, περιλαμβάνοντας το 35 έως 45% του ξηρού βάρους των περισσότερων φυτικών ιστών. Οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη αποτελούν το 20-40% και το 15-35% αντίστοιχα. Η λιγνίνη είναι ένα πολυμερές που περιβάλλει τις μικροϊνες της κυτταρίνης και προσδένεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με την ημικυτταρίνη. Χάρη στη δράση των μακρομυκήτων, τα συστατικά αυτά της βιομάζας διασπώνται και το διοξείδιο του άνθρακα επιστρέφει στην ατμόσφαιρα για να συνεχιστεί ο κύκλος του άνθρακα και της ζωής, ενώ παράλληλα οι μεγαλομοριακές ενώσεις μετατρέπονται σε μορφές κατάλληλες προς απορρόφηση από τις ρίζες των φυτών, β) *Βιοτροφικοί ή Παρασιτικοί*: Ένα μέρος των μακρομυκήτων προσλαμβάνει τις οργανικές ενώσεις που χρειάζεται αναπτυσσόμενο παρασιτικά πάνω σε ζωντανά φυτά, ενώ μερικοί είναι φυτοπαθογόνοι (οδηγούν τον ξενιστή σε θάνατο) και γ) *Συμβιωτικοί ή Μυκορριζικοί*: Κάποιοι μακρομύκητες αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις (μυκορριζες) με τις ρίζες των δέντρων. Σ' αυτή τη σχέση, ο μύκητας παίρνει από το φυτό απαραίτητες οργανικές ενώσεις, ενώ εξασφαλίζει σ' αυτό μεγαλύτερη ικανότητα πρόσληψης νερού και ανόργανων στοιχείων, προσδίδοντας στα φυτά μεγαλύτερη ικανότητα εγκατάστασης και επιβίωσης (Chang και Miles, 2004).

Ανάλογα με τα αποδομούμενα συστατικά του ξύλου, διακρίνουμε τη λευκή, τη φαιά (ή καστανή) και τη μαλακή σήψη. Οι μύκητες λευκής και μαλακής σήψης (λιγνινολυτικοί ή ξυλοσηπτικοί) αποσυνθέτουν όλα τα συστατικά του ξύλου, ενώ οι μύκητες φαιάς σήψης αποσυνθέτουν εκτενώς την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του ξύλου και σε μικρή έκταση την λιγνίνη (Αγγελής, 2007), καθώς μπορούν να αποσπάσουν τη γλυκόζη από την κυτταρίνη χωρίς να χρειάζονται να καταναλώσουν ενέργεια για αποπολυμερισμό της λιγνίνης (Micales, 1995), την οποία ωστόσο μετατρέπουν με μεθυλίωση, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα καφέ υλικό που περιέχει οξειδωμένη λιγνίνη. Ειδικότερα, οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι και οι πιο αποδοτικοί αποδομητές στη φύση, οι οποίοι αποδομούν τα συστατικά των τοιχωμάτων των κυττάρων του ξύλου (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη) με περίπου ίδιους ρυθμούς και σχετικά ταυτόχρονα, αν και ορισμένοι από αυτούς αποδομούν περισσότερο ή πρώτα τη λιγνίνη (επιλεκτική αποικοδόμηση), ώστε να είναι πιο εύκολη η πρόσβασή τους στην κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες που προστατεύονται από αυτή. Οι μύκητες μαλακής σήψης (πολλοί ανήκουν στους ασκομύκητες) είναι πιο αργοί και λιγότερο αποτελεσματικοί αποδομητές των πολυσακχαριτών του ξύλου και εμφανίζουν μερική ικανότητα αποδόμησης της λιγνίνης.

Κάθε είδος μανιταριού αντιδρά διαφορετικά στο εκάστοτε υπόστρωμα, παράγοντας διαφορετικά ένζυμα. Στην αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης λαμβάνουν μέρος δύο εξωκυτταρικά ενζυμικά συστήματα: (α) το υδρολυτικό που παράγει υδρολάσες οι οποίες αποδομούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Τέτοια υδρολυτικά ένζυμα της κυτταρίνης είναι οι ενδογλυκανάσες, β-γλυκοζιδάσες και κελλοβιοϋδρολάσες, ενώ της ημικυτταρίνης οι ενδοξυλανάσες και οι ενδομαννανάσες και (β) το οξειδωτικό, το οποίο διασπά τους φαινολικούς δακτυλίους της λιγνίνης με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό της και περιλαμβάνει κυρίως υπεροξειδάσες, όπως την υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP), την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και πολυφαινολοξειδάσες όπως είναι η λακκάση (Lac). Πρόσφατα, σε είδη του γένους *Pleurotus* και σε ορισμένους άλλους μύκητες έχει βρεθεί και η ευέλικτη υπεροξειδάση (versatile peroxidase, VP), η οποία συνδυάζει τις καταλυτικές ιδιότητες των LiP και MnP (Gadd, 2001).

Αναφορικά με τους μακρομύκητες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, οι εννέα από τους έντεκα ανήκουν στο φύλο των βασιδιομυκήτων (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *A. auricula-judae*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *A. aegerita*, *V. volvacea*), με την πλειονότητά τους να ανήκει στην τάξη των Agaricales και μόνο δύο στο φύλο των ασκομυκήτων (*M. elata*, *M. esculenta*). Ως προς τον τύπο αποδόμησης της λιγνοκυτταρίνης διακρίνονται σε ξυλοσηπτικούς μύκητες λευκής σήψης (wood decaying white-rot fungi): *G.*



Εικόνα I.1 Οικο-φυσιολογική ομαδοποίηση βασιδιομυκήτων σε τρεις μερικώς επικαλυπτόμενες ομάδες με βάση τις αποδομητικές τους ικανότητες και τις οικολογικές τους προσαρμογές (τροποποίηση από Steffen, 2003)

lucidum, *G. applanatum*, *A. auricula-judae*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* και σε μύκητες αποδόμησης οργανικής ύλης (litter decomposing fungi): *A. aegerita*, *V. volvacea*, *M. elata* και *M. esculenta* και απεικονίζονται στην Εικόνα I.1 (τροποποίηση από Steffen, 2003) με βάση τις αποδομητικές τους ικανότητες και τις οικολογικές τους προσαρμογές.

Ακόμη, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας I.1) παρουσιάζεται η ταξινόμηση, καθώς και ενδεικτικοί οικο-φυσιολογικοί χαρακτήρες (θρεπτικές απαιτήσεις, κατηγορία με βάση την ικανότητα αποδόμησης της λιγνοκυτταρίνης, λιγνολυτικά ένζυμα που διαθέτουν) και καλλιεργητικοί χαρακτήρες (υποστρώματα καλλιέργειας, θερμοκρασία ανάπτυξης μυκηλίου και καρποφορίας, παραγωγικός κύκλος) των μακρομυκήτων που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον, παρατίθενται και φωτογραφίες των καρποσωμάτων των συγκεκριμένων ανώτερων μυκήτων, τόσο από τον φυσικό τους βióτοπο όσο και από την παραγωγή τους σε ελεγχόμενες συνθήκες (εκτός από τους μύκητες του γένους *Morchella* που δεν καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα).

Πίνακας Ι.1 Ταξινόμηση, τροφικοί και καλλιεργητικοί χαρακτήρες των μανιταριών που μελετήθηκαν

Καρπόσωμα στη φύση	Γένος Είδος	Οικογένεια Τάξη Φύλο	Τύπος αποδόμησης Λιγνινολυτικά ένζυμα*	Υπόστρωμα καλλιέργειας	Θερμοκρασία Κύκλος καλλιέργειας	Καρπόσωμα σε καλλιέργεια
	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Ganodermataceae Polyporales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP LiP Lac	κορμοί/πριονίδι/σπάδικες καλαμποκιού (αζύμωτο υπ/μα)	Επώαση: 25-30 °C Καρποφορία: 20-25 °C 40-60 ημέρες	
	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	Ganodermataceae Polyporales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP LiP Lac	κορμοί/πριονίδι/γεωργικά υπολείμματα (αζύμωτο υπόστρωμα)	Επώαση: 24-26 °C Καρποφορία: 18-22 °C 40-60 ημέρες	
	<i>Auricularia auricula-juda</i> (Bull.) Quéf.	Auriculariaceae Auriculariales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP LiP Lac	κορμοί/πριονίδι/άχυρο (ζυμωμένο υπόστρωμα)	Επώαση: 20-25 °C Καρποφορία: 15-22 °C 40-50 ημέρες	
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Pleurotaceae Agaricales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP VP Lac	άχυρο/πριονίδι/λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα (ζυμωμένο ή αζύμωτο υπόστρωμα)	Επώαση: 25-28 °C Καρποφορία: 12-20 °C 30-35 ημέρες	
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quéf.	Pleurotaceae Agaricales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP VP Lac	άχυρο/πριονίδι/λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα (ζυμωμένο ή αζύμωτο υπ/μα)	Επώαση: 25-28 °C Καρποφορία: 18-26 °C 30-35 ημέρες	
	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Marasmiaceae Agaricales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP Lac	κορμοί/πριονίδι/γεωργικά υπολείμματα (αζύμωτο υπόστρωμα)	Επώαση: 23-26 °C Καρποφορία: 12-18 °C 80-150 ημέρες	
	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	Physalacriaceae Agaricales Basidiomycota	Ξυλοσηπτικός Λευκής σήψης MnP LiP Lac	πριονίδι/υπόλειμμα βαμβακιού (αζύμωτο υπόστρωμα)	Επώαση: 20-25 °C Καρποφορία: 8-14 °C 40-50 ημέρες	
	<i>Agrocybe aegerita</i> (V. Brig.) Singer	Strophariaceae Agaricales Basidiomycota	Αποδόμησης οργανικής ύλης MnP Lac	πριονίδι/γεωργικά υπολείμματα (αζύμωτο υπόστρωμα)	Επώαση: 23-25 °C Καρποφορία: 18-22 °C 40-50 ημέρες	
	<i>Volvariella volvacea</i> (Bull.) Singer	Pluteaceae Agaricales Basidiomycota	Αποδόμησης οργανικής ύλης Lac	άχυρο/υπόλειμμα βαμβακιού/κοτταρινούχα ζυμωμένα υποστρώματα	Επώαση: 32-34 °C Καρποφορία: 28-32 °C 10 ημέρες	
	<i>Morchella esculenta</i> (L.) Pers.	Morchellaceae Pezizales Ascomycota	Αποδόμησης οργανικής ύλης και μυκορριζικός Lac	Δεν είναι γνωστή η μέθοδος καλλιέργειας	Επώαση: 24-27 °C Καρποφορία: 14-20 °C (στη φύση)	
	<i>Morchella elata</i> Fr.	Morchellaceae Pezizales Ascomycota	Αποδόμησης οργανικής ύλης και μυκορριζικός Lac	Δεν είναι γνωστή η μέθοδος καλλιέργειας	Επώαση: 24-27 °C Καρποφορία: 12-18 °C (στη φύση)	

*MnP= υπεροξειδάση μαγγανίου, LiP=υπεροξειδάση της λιγνίνης, Lac=λακκάση, VP=ευέλκτικη υπεροξειδάση (Hattaka, 2001)

1.2.1.1. *Ganoderma* spp.

Το γένος *Ganoderma* που ανήκει στην τάξη Polyporales, οικογένεια Ganodermataceae, απαρτίζεται από 6 κύριες ομάδες στις οποίες εντάσσονται περισσότερα από 200 είδη, τα σημαντικότερα των οποίων είναι τα εξής: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. philippii*, *G. pseudoferreum*, *G. orbiformum*, *G. adspersum*, *G. carnosum*, *G. colossus*, *G. meredithiae*, *G. resinaceum*, *G. pfeifferi*, *G. tsugae*, *G. fassii*, *G. gibbosum* (Hong και Jung, 2004). Η ετυμολογία της λέξης *Ganoderma* είναι ελληνική και προέρχεται από τις λέξεις γάνος (=γυαλιστερός, λαμπρός) και δέρμα. Χαρακτηριστικό των καρποσωμάτων αυτού του γένους είναι ότι έχουν σκληρή και δερματώδη υφή, καθιστώντας τα μη εδώδιμα. Τα μανιτάρια της οικογένειας Ganodermataceae στην κάτω επιφάνεια του πύλου δεν έχουν ελάσματα, αλλά μικρούς πόρους. Σε πολλά είδη τα καρποσώματα είναι πολυετή, προσθέτοντας ένα νέο στρώμα σε κάθε αναπτυξιακή περίοδο. Η μεγαλύτερη ποικιλία του γένους παρατηρείται στις θερμές περιοχές των τροπικών ζωνών, ενώ λίγα είδη συναντάει κανείς στα βόρεια κλίματα.

Οι μακρομύκητες *Ganoderma* προκαλούν λευκή σήψη στο νεκρό και ζωντανό ξύλο που στον *Ganoderma australe* (= *G. adspersum*) επάγεται από χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου και οξυγόνου, ιδιαίτερα όσον αφορά στην παραγωγή του λιγνολυτικού ενζύμου MnP (Ríos και Eyzaguirre, 1992; Elissetche κ.α., 2007). Αν και έχει καταγραφεί η παραγωγή τόσο MnP και LiP, όσο και Lac έχουν διαπιστωθεί διαφορές μεταξύ ειδών και στελεχών *Ganoderma* όσον αφορά στην ενζυμική δραστηριότητά τους, με κάποια στελέχη να μην παράγουν κάποιο από τα οξειδωτικά ένζυμα (Maganhotto κ.α., 2005; Songulashvili κ.α., 2006; Elissetche κ.α., 2007). Οι τελευταίοι αναφέρουν ότι μεταξύ των *G. adspersum*, *G. lucidum* και *G. applanatum* μόνο οι δύο τελευταίοι παρήγαγαν MnP. Ωστόσο, έχει επισημανθεί για τον *G. lucidum* σε ζυμώσεις υγρής κατάστασης, ο σημαντικός ρόλος του υποστρώματος για το είδος των λιγνολυτικών ενζύμων που θα παράξει ο μύκητας (D'Souza κ.α., 1999). Όσον αφορά στα υδρολυτικά ένζυμα, έχει αναφερθεί η παραγωγή ξυλανάσης, ενδογλυκανάσης και β-γλυκοζιδάσης στους *G. adspersum* (Ríos και Eyzaguirre, 1992; Elissetche κ.α., 2007), *G. capense* και *G. gibbasum* (Fang κ.α., 1997), *G. lucidum* (Rai κ.α., 2004), ενώ πρόσφατα οι Elisashvili κ.α. (2009) ανέφεραν ότι υπήρξε παραγωγή ενδογλυκανάσης και ξυλανάσης από τον *G. applanatum*, τόσο σε καλλιέργειες υγρής κατάστασης όσο και σε ζύμωση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορα γεωργικά υπολείμματα.

Η παραγωγή καρποσωμάτων των μυκήτων του γένους *Ganoderma* και ιδιαίτερα του *G. lucidum* μπορεί να γίνει είτε με τον χρονοβόρο τρόπο καλλιέργειας επάνω σε φυσικούς κορμούς δένδρων (από την έναρξη της καλλιέργειας ως την καρποφορία απαιτείται περίπου ένα έτος), είτε με την πλέον διαδεδομένη και γρήγορη μέθοδο σε σάκους με υπόστρωμα από

μίγμα πριονιδιού ξύλου και συστατικών εμπλουτισμού (καλλιεργητικός κύκλος 2-5 μήνες), σε θερμοκηπιακούς χώρους με ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού και υγρασίας. Ωστόσο, η περιεκτικότητά τους σε τριτερπένια και πολυσακχαρίδια είναι μικρότερη από αυτή των καρποφοριών της κλασικής μεθόδου καλλιέργειας σε κορμούς.

1.2.1.2. *Pleurotus* spp.

Οι μακρομύκητες του γένους *Pleurotus*, με πιο γνωστό είδος στη χώρα μας το *P. ostreatus*, ανήκουν στη τάξη Agaricales και στην οικογένεια Pleurotaceae (Kirk κ.α., 2008). Άλλα γνωστά είδη που ανήκουν στο γένος *Pleurotus* είναι: *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. citrinopileatus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. djamor* και *P. tuber-regium*. Τα καρποσώματα του *P. ostreatus* (η ετυμολογία της λέξης *Pleurotus* προέρχεται από το πλευρο = πλάγιο και ους-ωτος = αυτί και αναφέρεται στον πλάγιο τρόπο έκφυσης του καρποσώματος, ενώ η λέξη *ostreatus* = όστρακο αναφέρεται στο οστρακοειδές σχήμα του πύλου) εκφύονται πλάγια σε κορμούς νεκρών ή και ζωντανών δένδρων, σε αλληπάλληλες στρώσεις. Τα είδη του γένους *Pleurotus* είναι σαπροτροφικοί μύκητες λευκής σήψης που ευδοκιμούν σε υποτροπικές και εύκρατες περιοχές. Τα λιγνολυτικά ένζυμα που παράγουν οι μύκητες του γένους *Pleurotus* είναι τα MnP, Lac, αλλά όχι η LiP που απαντάται στους περισσότερους μύκητες λευκής σήψης (Sanjust κ.α., 1991). Ωστόσο, διαθέτουν την ευέλικτη υπεροξειδάση (VP), η οποία συνδιάζει τις καταλυτικές ιδιότητες των LiP και MnP (Gadd, 2001).

Από φυσιολογικής πλευράς, οι μύκητες του γένους *Pleurotus* χαρακτηρίζονται από μεγάλη ταχύτητα ανάπτυξης και υψηλή σαπροφυτική ικανότητα αποικισμού του υποστρώματος. Η αύξηση του μυκηλίου εξαρτάται κύρια από τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση των CO₂ και O₂ στην ατμόσφαιρα και το pH. Η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μυκηλίου κυμαίνεται μεταξύ των 25 και 30 °C ανάλογα με το είδος. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15 και υψηλότερες από 32 °C ο ρυθμός αύξησης μειώνεται αισθητά, ενώ τιμές που υπερβαίνουν τους 35 °C νεκρώνουν το μυκήλιο (Zervakis κ.α., 2001). Υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ (22-28% κ.ο.) ευνοούν τη μυκηλιακή ανάπτυξη και γρήγορη εξάπλωση των *Pleurotus*, ιδιότητα η οποία σε συνθήκες εμπορικής καλλιέργειας καθιστά τον μακρομύκητα ανταγωνιστικό σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς ως προς τον αποικισμό του υποστρώματος. Μολονότι η αύξηση του μυκηλίου γίνεται σε ημι-αναερόβιες συνθήκες, οι απαιτήσεις του μύκητα σε αερισμό είναι υψηλές κατά την περίοδο σχηματισμού των καρποσωμάτων του (Φιλιππούσης, 1999). Ακόμη, το φως αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη μετάβαση του μύκητα από τη φάση της βλαστικής ανάπτυξης στη φάση σχηματισμού των καταβολών των καρποσωμάτων. Τα θερμοκρασιακά άριστα ποικίλουν μεταξύ των ειδών

Pleurotus με χαρακτηριστικό παράδειγμα το *P. ostreatus*, όπου για την επαγωγή των καταβολών είναι απαραίτητο ένα ψυχρό σοκ, πτώση δηλαδή της θερμοκρασίας στους 12-15 °C (για χρονικό διάστημα λίγων ημερών) με αποτέλεσμα υψηλότερη ποσοτικά και καλύτερη ποιοτικά παραγωγή (Φιλιπούσης, 1999). Τέτοιου είδους χειρισμό δεν απαιτούν άλλα είδη, όπως το *P. pulmonarius* που σχηματίζει καρποσώματα στις υψηλότερες θερμοκρασίες 18-26 °C. Όσον αφορά στις πηγές άνθρακα και αζώτου, οι γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και ξυλόζη από τα σάκχαρα, καθώς και ποικιλία οργανικών πηγών και το NaNO₃ όσον αφορά στο άζωτο είναι ουσίες που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του μυκηλίου (El-Dein κ.α., 2004; Lee κ.α., 2007; Paraspyridi κ.α., 2010).

Συνοπτικά, τα στάδια (σε παρένθεση η διάρκεια τους) και οι συνθήκες καλλιέργειας για παραγωγή καρποσωμάτων του *P. ostreatus* έχουν ως ακολούθως: (α) Παρασκευή υποστρώματος (4 ημέρες): τεμαχισμός και διαβροχή αχύρου, προσθήκη γύψου και εμπλουτισμός με πηγή αζώτου (τριφύλλι, σογιάλευρο κ.λ.π.), ανάμειξη, πρόβρεξη και δημιουργία σωρού, αερισμός-γυρίσματα με διαβροχή, μεταφορά και γέμισμα του τούνελ παστερίωσης, (β) Παστερίωση-ωρίμανση υποστρώματος (4 ημέρες): καταστροφή των ανταγωνιστών του μανιταριού με υψηλή θερμοκρασία (60-70 °C, 6-10 ώρες), ωρίμανση σε ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού-θερμοκρασίας (48-52 °C, 60 ώρες) για δημιουργία εκλεκτικού υποστρώματος, (γ) Σπορά-επώαση (15-20 ημέρες): εμβολιασμός με το μυκήλιο (σπόρο) του μανιταριού, γέμισμα σάκων, μεταφορά σε θάλαμο, αποικισμός υποστρώματος από το μύκητα σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας κομπόστας 26-28° C, υψηλή σχετική υγρασία (90%) και περιεκτικότητα σε CO₂, (δ) Επαγωγή-σχηματισμός καρποσωμάτων (8 ημέρες): αλλαγή συνθηκών όπως εισαγωγή φωτισμού, μείωση θερμοκρασίας αέρα στους 12-16 °C, μείωση του CO₂ με εισαγωγή φρέσκου αέρα, ρύθμιση σχετικής υγρασίας στο 92-96%. Οι καταβολές (πολύ μικρά μανιτάρια) εμφανίζονται 5-8 ημέρες μετά την αλλαγή των συνθηκών, (ε) Ανάπτυξη-συγκομιδή μανιταριών (7 ημέρες): Ανάπτυξη των νεαρών καρποφοριών (σε 5-7 ημέρες) σε ελεγχόμενες συνθήκες: θερμοκρασία 14-20 °C, σχ. υγρασία 85%, επιπλέον φωτισμός και αερισμός. Παραγωγή μανιταριών κατά κύματα που απέχουν χρονικά μεταξύ τους περίπου 15 ημέρες. Συνήθως συλλέγονται 1-3 κύματα, με συνολική απόδοση που κυμαίνεται από 18-28% του βάρους του υποστρώματος.

1.2.1.3. *Lentinula edodes*

Ο μακρομύκητας *L. edodes* (Berk.) Pegler που ανήκει στην τάξη Agaricales, οικογένεια Marasmiaceae ήταν γνωστός με το όνομα *Lentinus edodes* (Berk.) Singer μέχρι το 1978 οπότε κατατάχθηκε από τον Pegler στο καινούριο γένος *Lentinula*. Χαρακτηρίζεται από λευκά

σπόρια, στίβο που συνδέεται κεντρικά έως παράκεντρα με τον πύλο και ελάσματα συνήθως οδοντωτά. Είναι σαπροτροφικός ξυλοσηπτικός μύκητας λευκής σήψης με ικανότητα να αναπτύσσεται σε ξυλώδη υλικά πλούσια σε λιγνίνη, καθώς πέρα από τα υδρολυτικά ένζυμα που διαθέτει (κυτταρινάσες, ξυλανάσες, αμυλάσες, πηκτινάσες) εκκρίνει και οξειδωτικά ένζυμα, όπως MnP και Lac που αποπολυμερίζουν την λιγνίνη (Cavallazzi κ.α., 2005).

Ο παραδοσιακός τρόπος καλλιέργειας του *L. edodes* σε κούτσουρα βελανιδιάς, οξιάς κ.λ.π. αποτελεί χρονοβόρα διαδικασία (~1,5 χρόνος μέχρι την καρποφορία) και σε μεγάλο βαθμό έχει σήμερα αντικατασταθεί με την καλλιέργεια του *L. edodes* σε υποστρώματα από γεωργικά υπολείμματα (συντόμηση παραγωγικού κύκλου σε ~5-6 μήνες) Η παραγωγική διαδικασία περιλαμβάνει την παρασκευή εμβολίου (spawn) σε κόκκους σιτηρών ή δημητριακών καθώς και του υποστρώματος καλλιέργειας σε αναλογία 75-80% τεμαχισμένα και διαβρεγμένα γεωργικά υπολείμματα (άχυρο σίτου, εκκοκκισμένοι σπάδικες καλαμποκιού και πριονίδι βελανιδιάς) και 20-25% κατάλληλα προσθετικά (πίτυρο σίτου, σογιάλευρο), ώστε ο τελικός λόγος C/N να είναι 25-50/1 και η υγρασία να είναι 60-70% (Philippoussis κ.α., 2003, 2010). Καθώς ο μύκητας παρουσιάζει ευαισθησία στους ανταγωνιστές, τα υποστρώματα τοποθετούνται σε σάκους 2-3 κιλών και αποστειρώνονται πριν τον εμβολιασμό με τον μύκητα. Ο παραγωγικός κύκλος, που διαρκεί συνολικά 150 ημέρες (80-90 ημέρες για αποικισμό του υποστρώματος και 60-70 ημέρες για καρποφορία), πραγματοποιείται σε θαλάμους με ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας. Η επώαση γίνεται σε σχ. υγρασία 85% και θερμοκρασία 24-25 °C. Τα στάδια ανάπτυξης του μυκηλίου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* είναι: (α) Αποικισμός του υποστρώματος από το μυκήλιο, (β) Σχηματισμός εξογκωμάτων-συσσωματωμάτων (aggregates), ήτοι άμορφης μυκηλιακής μάζας (εν είδη σβόλων) και (γ) Καφέτιασμα του μυκηλιακού ιστού (browning-pigmentation) που γίνεται με την έκκριση χαρακτηριστικής χρωστικής από το ώριμο μυκήλιο (Donoghue και Denison, 1995; Ohga και Royse, 2001). Στη συνέχεια, αφαιρούνται οι σάκοι και ακολουθεί επαγωγή στους 15 °C και καρποφορία σε θερμοκρασία 17,5 °C, φωτισμό (300-500 Lux, 12-24 h/ημ) και υγρασία 85-90%. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η καλλιέργεια του μανιταριού *L. edodes* παρουσιάζει μεγαλύτερη δυσκολία σε σχέση με αυτή των μανιταριών *Pleurotus*, καθώς απαιτείται η αποστείρωση των υποστρωμάτων (στους 121 °C για 1-2h), έχει μακρύτερο βιολογικό κύκλο και η πιθανότητα μολύνσεων με κίνδυνο απώλειας της παραγωγής είναι ιδιαίτερα αυξημένος (Φιλιπούσης, 2010).

Όσον αφορά στη φυσιολογία του μύκητα, οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν στην μυκηλιακή αύξηση του *L. edodes* είναι η θερμοκρασία (22-28 °C, άριστη 25 °C; Tokimoto και Komatsu, 1982), το pH (3,5-5,5, άριστο pH 5,0-5,5) και η υγρασία του

υποστρώματος (55% έως 68%; Przybylowicz και Donoghue, 1990). Μεταξύ των πηγών άνθρακα, οι γλυκόζη και φρουκτόζη είναι τα σάκχαρα που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του μυκηλίου, ενώ από τις πηγές αζώτου, η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης (Feng κ.α., 2010).

1.2.1.4. *Agrocybe aegerita* (*A. cylindracea*)

Ο μακρομύκητας *A. aegerita* (V. Brig.) Singer - συνώνυμος με τον *A. cylindracea* (DC.) Maire που ανήκει στην τάξη Agaricales, οικογένεια Strophariaceae, με βάση τα οικονομολογικά του χαρακτηριστικά που αφορούν στην ικανότητα αποδόμησης της λιγνοκυτταρίνης, καθώς και στα περιορισμένα λιγνολυτικά του ένζυμα (διαθέτει μόνο Lac, ενώ κάποια στελέχη έδειξαν και παραγωγή MnP αλλά με πολύ χαμηλή ενεργότητα) κατηγοριοποιείται μεταξύ μυκήτων λευκής σήψης και αποδόμησης οργανικής ύλης με μεγαλύτερη προσέγγιση προς στη δεύτερη κατηγορία (Steffen, 2003).

Συνήθως καλλιεργείται σε αζύμωτο ή ελάχιστα ζυμωμένο υπόστρωμα από εμπλουτισμένα πριονίδια και ροκανίδια ιτιάς, λεύκας, σφενδάμου κ.α. που τοποθετούνται σε σάκους και αποστειρώνονται στους 121 °C για 1-2h. Ωστόσο, ο μύκητας έδειξε καλή ανάπτυξη και στα εμπλουτισμένα με πίτυρο υποστρώματα από άχυρο σίτου και υπολείμματα εκκοκκισμένου βαμβακιού (Philippoussis κ.α., 2001; Zervakis κ.α., 2001; Φιλιππούσης και Διαμαντοπούλου, 2001). Η ιδανική υγρασία του υποστρώματος είναι μεταξύ 60% - 70%. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι, σε σχ. υγρασία 85-95% και θερμοκρασία 21-27 °C, CO₂>20.000 ppm και ο αποικισμός του υποστρώματος διαρκεί 20-28 ημέρες. Ακολουθεί επαγωγή για σχηματισμό των καταβολών των καρποσωμάτων (7-14 ημέρες) και γίνεται στους 12-16 °C, σε σχ. υγρασία 90-98%, με καλό αερισμό του θαλάμου ώστε CO₂<2.000 ppm και φωτισμό (100-300 Lux, 12-24 h/ημ). Η ανάπτυξη των καρποσωμάτων που διαρκεί 4-6 ημέρες απαιτεί θερμοκρασία 13-18 °C, φωτισμό (300-500 Lux, 12 h/ημ) και υψηλή υγρασία 90-95%. Συνήθως συλλέγονται 1-3 κύματα με συνολική απόδοση που κυμαίνεται από 10-15% του βάρους του υποστρώματος, ενώ ο συνολικός κύκλος καλλιέργειας διαρκεί ~100-120 ημέρες.

1.2.1.5. *Morchella* spp.

Οι μακρομύκητες του γένους *Morchella* είναι ασκομύκητες που ανήκουν στη τάξη Pezizales και στην οικογένεια Morchellaceae. Τα ασκοκάρπια αναγνωρίζονται εύκολα από τη σπογγώδη ή κυψελωτή εμφάνιση του πύλου, στην οποία συμβάλουν οι χαρακτηριστικές διαμήκεις και εγκάρσιες πτυχώσεις του. Άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα των συγκεκριμένων

μυκήτων είναι η ενιαία εσωτερική κοιλότητα πύλου και στίπου που παρατηρείται σε επιμήκη τομή. Με βάση τις παλαιότερες μορφολογικές (Weber και Weber, 1988), αλλά και τις νεότερες γενετικές ταξινομικές αναλύσεις (Φιλιπούσης, 2003β; Kellner κ.α., 2005; Masaphy κ.α. 2009), οι μύκητες *Morchella* ομαδοποιούνται στην ομάδα των ανοιχτόχρωμων ειδών (*M. esculenta*, *M. rotunda*, *M. vulgaris* και *M. crassipes*) και στην ομάδα των σκουρόχρωμων ειδών (*M. angusticeps*, *M. elata*, *M. conica*, *M. deliciosa* και *M. hortensis*).

Με βάση τα οικο-φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά και με δεδομένο ότι δε διαθέτουν λιγνολυτικά ένζυμα εκτός από ένα οξειδωτικό ένζυμο παρεμφερές της Lac, τοποθετούνται σε μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ μυκήτων αποδόμησης οργανικής ύλης και συμβιωτικών (Parinutti και Lechner, 2008). Ωστόσο, σε περιορισμένες μελέτες έχουν προσδιοριστεί διάφορα ένζυμα όπως (α) οξειδοαναγωγάσες: Lac, λιποξυγανάση, (β) τρανσφεράσες: γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση, (γ) υδρολάσες: αμυλάσες, β-γλυκοζιδάση, ενδογλυκανάση, κελλοβοιϋδρολάση και (δ) λυάσες: α-1,4-γλυκανο-λυάση (Zhang κ.α., 2009).

Καθώς δεν έχει μέχρι σήμερα επιτευχθεί η παραγωγή καρποσωμάτων *in vitro*, ένα υποθετικό σχήμα κύκλου ζωής που περιλαμβάνει τόσο τη σαπροτροφική όσο και τη συμβιωτική σχέση των μυκήτων *Morchella* με ανώτερα φυτά και διατυπώθηκε από τους Pilz κ.α. (2007) θα μπορούσε να έχει ως ακολούθως: η απελευθέρωση και η βλάστηση των ασκοσπορίων έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ομοκάρων υφών, από τις οποίες με αναστόμωση και πλασμογαμία (συγχώνευση δύο απλοειδών μυκηλίων αντίθετου συζευκτικού τύπου) σχηματίζεται ετεροκάρυο μυκήλιο. Αυτό αναπτύσσει συμβιωτική σχέση με ρίζες ανώτερων φυτών και δένδρων με τη μορφή ριζομόρφων (strands) που επιτρέπουν την εύκολη απορρόφηση και γρήγορη μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων θρεπτικών συστατικών και νερού, παίζοντας σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό καρποσωμάτων. Άλλες μορφές που συνδέουν τα ριζομόρφα με τις ρίζες είναι τα σκληρώτια και οι μυκηλιακοί μανδύες, ενώ πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα σκληρώτια που σχηματίζονται πριν την εμφάνιση των ασκοκαρπίων την άνοιξη είναι ένα καθοριστικό ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ της μυκηλιακής και της αναπαραγωγικής φάσης των μυκήτων *Morchella* (Volk και Leonard, 1990; Philippoussis και Balis, 1995; Φιλιπούσης, 2003β; Pilz κ.α., 2007).

Όσον αφορά στη φυσιολογία του μύκητα στις καλλιέργειες *in vitro*, οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην μυκηλιακή αύξηση των ασκομυκήτων του γένους *Morchella* είναι η θερμοκρασία (24-28 °C, άριστη 25 °C; Φιλιπούσης, 2003β) και το pH (6,5-7,5, άριστο pH 7; Winder, 2006; Meng κ.α., 2010). Ακόμη, σύμφωνα με τους Meng κ.α. (2010), ο όγκος του θρεπτικού μέσου στις κωνικές φιάλες (100 ml), η ταχύτητα ανάδευσης στις κινούμενες καλλιέργειες (200 στροφές το λεπτό) και η περίοδος καλλιέργειας (συλλογή

της βιομάζας την 4^η ημέρα ζύμωσης) έδειξαν να ευνοούν την παραγωγή βιομάζας του μύκητα *M. esculenta* (6,2-6,9 g/l). Μεταξύ των πηγών άνθρακα, οι μαλτόζη, γλυκόζη, άμυλο και σακχαρόζη είναι τα σάκχαρα που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του μυκηλίου. Όσον αφορά στις πηγές αζώτου, οι πεπτόνη, τρυγικό αμμώνιο, ουρία, ασπαραγίνη, γλουταμινικό οξύ, αμμωνιακά άλατα, αλανίνη, ασπαραγινικό οξύ και νιτρικό νάτριο ευνοούν την ανάπτυξη του μυκηλίου (Brock, 1951; Φιλιππούσης, 2003β). Τέλος, όσον αφορά στην επίδραση του λόγου C/N, ο *M. esculenta*, έδειξε την καλύτερη ανάπτυξη σε λόγους C/N 10/1-24/1, ενώ η παραγωγή βιομάζας στον μύκητα *M. elata* φάνηκε να ευνοείται σε υψηλότερες τιμές του λόγου C/N (24/1-44/1) (Φιλιππούσης, 2003β).

1.2.1.6. *Volvariella volvacea*

Ο μακρομύκητας *V. volvacea* (Bull.) Singer που ανήκει στην τάξη Agaricales, οικογένεια Pluteaceae, απαντάται στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές και αναπτύσσεται στη φύση σε νεκρά φύλλα και ξυλώδη υλικά. Γενικά, τα διακριτικά χαρακτηριστικά των μυκήτων της οικογένειας Pluteaceae είναι τα ελεύθερα ελάσματα, η παρουσία βόλβας στο στίβο, η απουσία δακτυλίου και το ρόδινο χρώμα των σπορίων που προσδίδει ρόδινο χρώμα στα ελάσματα των ώριμων μανιταριών. Διάφορα είδη ανήκουν στο γένος *Volvariella*, με πιο αντιπροσωπευτικά τα *V. volvacea*, *V. esculenta*, *V. speciosa* και *V. diplasia*. Ωστόσο, το είδος το οποίο καλλιεργείται ευρύτατα είναι το *V. volvacea* (μορφολογικά θεωρείται όμοιο και το είδος *V. esculenta*), το οποίο εμφανίζει καφέ χρωματισμό όταν ωριμάζει (Chang, 1972).

Στα φυσικά υποστρώματα καλλιέργειάς του που είναι γεωργικά υπολείμματα πλούσια σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνες και πτωχά σε λιγνίνη, όπως π.χ. τα υπολείμματα βαμβακιού στα οποία ευνοείται η μυκηλιακή αύξηση και καρποφορία του (Kurtzman και Chang-Ho, 1982; Buswell κ.α., 1996; Philippoussis κ.α., 2001; Zervakis κ.α., 2001), ο μύκητας εκκρίνει πληθώρα κυτταρινολυτικών ενζύμων στα οποία περιλαμβάνονται πέντε ενδογλυκανάσες, πέντε κελλοβιοϋδρολάσες και δύο β-γλυκοζιδάσες (Cai κ.α., 1998, 1999; Chang και Steinkraus, 1981). Ακόμη, κατά την ανάπτυξή του σε λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα έχει καταγραφεί η παραγωγή ξυλανάσης (Cai κ.α., 1994; Ahlawat κ.α., 2008) και σε ορισμένα στελέχη μικρές ενεργότητες των ενζύμων Lac και πολυφαινολοξειδάση (Ahlawat κ.α., 2008, 2010). Ακόμη, σε καλλιέργειες βυθού στελεχών του μύκητα καταγράφηκε η παραγωγή α- και β-αμυλάσης (υποστρώματα αμύλου και πιτύρων σιταριού και ρυζιού), όπως και πρωτεάσης (υπόστρωμα καζέϊνης και πιτύρου σιταριού).

Ο *V. volvacea* που έχει μικρό κύκλο παραγωγής 20-25 ημέρες, καλλιεργείται στις χώρες της Άπω Ανατολής παραδοσιακά στο ύπαιθρο, σε υπόστρωμα από άχυρο ρυζιού

(ονομάζεται και straw mushroom). Εντούτοις, η μέθοδος αυτή εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα με μεγαλύτερο αυτό της χαμηλής απόδοσης σε καρποσώματα (Buswell και Chen, 2005). Λόγω των αυξημένων κυτταρολυτικών ικανοτήτων του, ο *V. voluacea* έχει καλλιεργηθεί εκτενώς σε μια σειρά αγροτοβιομηχανικών υπολειμμάτων, όπως περικόρπια ελαιοφωινίκων (Chen και Graham, 1973), φύλλα μπανάνας (Chua και Ho, 1973) καθώς και για μεγαλύτερες αποδόσεις σε υπολείμματα βαμβακιού (Chang, 1974). Η σύγχρονη και πιο αποδοτική καλλιέργειά του (με βιολογική αποδοτικότητα >40% επί ξ.β. υποστρώματος) γίνεται σε υπόστρωμα με βάση τα υπολείμματα βαμβακιού, το οποίο εμπλουτίζεται με πίτυρα ρυζιού και ασβεστόλιθο, ζυμώνεται για μικρό χρονικό διάστημα και στη συνέχεια παστεριώνεται για να ακολουθήσει η παραγωγή των μανιταριών σε ημι-ελεγχόμενες συνθήκες σε θαλάμους (Chang, 1978). Η παστερίωση γίνεται με τη βοήθεια ατμού για 4-6 ώρες σε θερμοκρασία 60-70 °C. Ακολουθεί εμβολιασμός με το μυκήλιο του μύκητα όταν η θερμοκρασία του υποστρώματος μειωθεί στους 30 °C. Η επώαση για αποικισμό του υποστρώματος από το μυκήλιο γίνεται στο σκοτάδι, σε σχ. υγρασία 80-95% και θερμοκρασία 30-35 °C (γρήγορη αύξηση στους 35 °C; Reyes κ.α., 1998; Zervakis κ.α., 2001), CO₂> 5.000 ppm, ο αποικισμός του υποστρώματος διαρκεί 5-10 ημέρες. Ακολουθεί επαγωγή για σχηματισμό των καταβολών των καρποσωμάτων που έχει διάρκεια 4-6 ημέρες και γίνεται στους 27-32 °C, σε σχ. υγρασία 90-98%, με καλό αερισμό του θαλάμου ώστε το CO₂< 2.000 ppm και φωτισμό (200-500 Lux, 12 h/ημ). Η ανάπτυξη των καρποσωμάτων που διαρκεί 6-10 ημέρες απαιτεί θερμοκρασία 27-32 °C, φωτισμό (500-700 Lux, 12 h/ημ) και υγρασία 85-95%. Συνήθως συλλέγονται 1-3 κόμματα με συνολική απόδοση που κυμαίνεται από 8-12% του βάρους του υποστρώματος, ενώ ο συνολικός κύκλος καλλιέργειας διαρκεί ~20-25 ημέρες.

Όσον αφορά στη φυσιολογία μακρομύκητα *V. voluacea* στις καλλιέργειες *in vitro*, οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην μυκηλιακή αύξησή του είναι η θερμοκρασία (30-35 °C, άριστη 32 °C; Chang, 1978), το pH (5,5-8,5, άριστο pH 6,5; Akinyele και Adetuyi, 2005) και η υγρασία του υποστρώματος (άριστη 70%; Chang, 1978; Kurtzman και Chang-Ho, 1982). Μεταξύ των πηγών άνθρακα, η γλυκόζη και το άμυλο είναι τα σάκχαρα που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του μυκηλίου (Chakravarty και Mallick, 1979; Ofosu-Asiedu κ.α., 1984). Ακόμη, οι πολυσακχαρίτες βρέθηκε να επηρεάζουν θετικά την μυκηλιακή αύξηση έναντι των μονοσακχαριτών (γαλακτόζη και γλυκόζη) και των δισακχαριτών (μαλτόζη και λακτόζη) (Reyes κ.α., 1998). Όσον αφορά στις πηγές αζώτου, το εκχύλισμα σόγιας, η πεπτόνη και η γλυκίνη υποστηρίζουν γρήγορη αύξηση του μυκηλίου (Reyes κ.α., 1998).

Ι.2.2. Διατροφικές και φαρμακευτικές ιδιότητες μακρομυκήτων

Η μεγάλη προτίμηση των καταναλωτών για τα μανιτάρια οφείλεται όχι μόνο στη γεύση, στην εμφάνιση και στο άρωμα που προσδίδουν, αλλά κυρίως στη θρεπτική τους αξία. Τα εδώδιμα μανιτάρια διαθέτουν πρωτεΐνες υψηλής θρεπτικής αξίας, οι οποίες μπορούν να συγκριθούν με τις πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης, καθώς επίσης και πολλά από τα απαραίτητα αμινοξέα. Για παράδειγμα, διαθέτουν μικρότερο ποσοστό πρωτεϊνών από το κρέας, αλλά υπερσχύουν έναντι άλλων τροφίμων όπως είναι το γάλα και τα λαχανικά (Chang και Miles, 1989). Ακόμα, τα λευκά μανιτάρια του γένους *Agaricus* περιέχουν περισσότερες πρωτεΐνες από τα κοινά φασόλια, ενώ τα μανιτάρια *L. edodes* (shiitake), αν και λιγότερο θρεπτικά, αποτελούν καλή πηγή πρωτεϊνών (Stamets, 2005) (βλ. Πίνακα Ι.2). Επιπλέον, περιέχουν υψηλότερα ποσοστά θρεονίνης, τυροσίνης και αργινίνης σε σχέση με την πατάτα, το καρότο και το κουνουπίδι (Mattila κ.α., 2002). Τα μανιτάρια λοιπόν θεωρούνται ιδανική πηγή αφομοιώσιμων πρωτεϊνών (μεγάλη αναλογία σε γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ, προλίνη, φαινολαλανίνη, αργινίνη), αν και η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη διαφέρει για κάθε είδος μύκητα, π.χ. στο *A. bisporus* είναι 23,9-34,8% κ.β., στο *L. edodes* 13,3-17,5%, στο *P. ostreatus* 10,5-30,4% και στο *V. volvacea* 26% κ.β..

Ακόμα, αποτελούν τροφή χαμηλής περιεκτικότητας λιπίδια (1,5-8,0%, κ.β.), χαμηλή σε κορεσμένα λίπη και με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να κατέχουν τη μεγαλύτερη αναλογία στο σύνολο των ολικών λιπαρών οξέων (72-85%κ.β.; Chang και Miles, 2004). Οι λιπαρές ύλες των μανιταριών περιλαμβάνουν όλες τις αντιπροσωπευτικές ομάδες λιπαρών συστατικών που απαντώνται στα τρόφιμα, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, μόνο-, δι-, και τριγλυκερίδια, στερόλες, εστέρες των στερολών και φωσφολιπίδια (Crisan και Sands, 1978). Μεταξύ των στερολών, τα μανιτάρια περιέχουν υψηλά ποσοστά εργοστερόλης η οποία θεωρείται πρόδρομος της βιταμίνης D2 (Mattila κ.α., 2002). Περιέχουν επίσης μικρή ποσότητα νατρίου, είναι μειωμένης θερμιδικής αξίας (τα 100g αποδίδουν περίπου 30 θερμίδες), καθώς και καλή πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β και C, όπως θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), νιασίνη (B3) και ασκορβικό οξύ (C) και βιταμίνη D. Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε ανόργανα στοιχεία και μέταλλα είναι σημαντική ωστόσο εξαρτάται από το είδος του μύκητα, το στάδιο ανάπτυξης, την περιοχή συλλογής και την απόσταση από πιθανές πηγές μόλυνσης (Kalács, 2009). Ιδιαίτερα πλούσια είναι τα μανιτάρια σε σίδηρο, φώσφορο, κάλιο, μαγνήσιο, χαλκό, ψευδάργυρο και σελήνιο (Racz κ.α., 1996; Ouzouni κ.α., 2005). Το ποσοστό υγρασίας των φρέσκων μανιταριών κυμαίνεται στο 70-95% αναλόγως την περίοδο συγκομιδής και τις συνθήκες ανάπτυξης, ενώ στα αποξηραμένα μανιτάρια βρίσκεται στο 10-13%. Η περιεχόμενη τέφρα αντίστοιχα που αντιπροσωπεύει το 60% της

σύστασης του ξηρού δείγματος αποτελείται από οξείδια του καλίου και του φωσφόρου (Mattila κ.α., 2002). Τέλος, σε ό,τι αφορά τους υδατάνθρακες (3-28%, κ.β.) τα μανιτάρια περιέχουν κυρίως χιτίνη και β-γλυκάνες. Οι παραπάνω ιδιότητες είναι κάποιοι από τους βασικούς λόγους για τους οποίους τα μανιτάρια έχουν χαρακτηριστεί από την παράδοση ως «υγιεινά» τρόφιμα. Στον Πίνακα I.2 παρατίθεται η σύσταση του καρποσώματος μερικών φαρμακευτικών μακρομυκήτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τέλος, μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στην κατανάλωση των μανιταριών καθώς εκτός από τα καλλιεργούμενα ή αυτοφυή εδώδιμα, υπάρχουν και τα δηλητηριώδη μανιτάρια που μπορεί προκαλέσουν σοβαρές διαταραχές ή να οδηγήσουν και στα θάνατο. Για τον λόγο αυτό, η συγκομιδή αυτοφυών μανιταριών πρέπει να γίνεται από ανθρώπους με εμπειρία και γνώσεις.

Πέρα από τη διατροφική τους αξία, τα μανιτάρια έχουν και φαρμακευτικές-βιοενεργές ιδιότητες. Αν και σχετικά πρόσφατα άρχισαν να διαδίδονται στο Δυτικό κόσμο, καλλιεργούνται και καταναλώνονται για χιλιάδες χρόνια στις χώρες της Ανατολής από όπου

Πίνακας I.2 Σύσταση καρποσώματος ορισμένων φαρμακευτικών μανιταριών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (Stamets, 2005)

Διατροφικό προφίλ	Είδη φαρμακευτικών μανιταριών		
	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Θερμίδες	376	356	360
Πρωτεΐνες ^α	15,05	32,93	27,25
Λίπος ^α	3,48	3,73	2,75
Πολυακόρεστα λίπη ^α	0,50	1,30	1,16
Ακόρεστα λίπη ^α	1,20	1,36	1,32
Κορεσμένα λίπη ^α	0,27	0,22	0,20
Υδατάνθρακες ^α	71,00	47,60	56,53
Σύνθετοι υδατάνθρακες ^α	69,30	31,80	38,43
Σάκχαρα ^α	1,70	15,80	18,10
Διαιτητικές ίνες ^α	66,80	28,90	33,40
Χοληστερόλη ^β	ίχνη	ίχνη	Ίχνη
Βιταμίνη Α ^β	ίχνη	ίχνη	Ίχνη
Θειαμίνη (B1) ^β	0,06	0,25	0,16
Ριβοφλαβίνη (B2) ^β	1,59	2,30	2,04
Νιασίνη (B3) ^β	12,40	20,40	54,30
Παντοθενικό οξύ (B5) ^β	2,70	11,60	12,30
Βιταμίνη C ^β	ίχνη	ίχνη	Ίχνη
Βιταμίνη D ^γ	66	110	116
Ασβέστιο ^β	37	23	20
Χαλκός ^β	1,30	1,23	1,69
Σίδηρος ^β	13	5,5	9,1
Κάλιο ^β	760	2700	2700
Σελήνιο ^β	0,014	0,076	0,035
Νάτριο ^β	6	18	48

^α εκφρασμένο σε g/100g ξηρού προϊόντος, ^β εκφρασμένο σε mg/100g ξηρού προϊόντος, ^γ εκφρασμένο σε IU/100g ξηρού προϊόντος

άρχισαν να γίνονται γνωστές οι θεραπευτικές τους ιδιότητες (Wasser και Weis, 1999). Εκτός από τα αντιβιοτικά που παράγονται από τους μικρομύκητες και διαθέτουν πολύτιμες χημικοθεραπευτικές ιδιότητες και τα εκχυλίσμα συστατικά των μακρομυκήτων προσελκύουν το παγκόσμιο ενδιαφέρον της εναλλακτικής (και όχι μόνο) ιατρικής για τη βελτίωση της λειτουργίας του ανθρώπινου οργανισμού τόσο σε προληπτικό, όσο και σε θεραπευτικό επίπεδο (Archer κ.α., 2008; Wasser, 2010).

Τουλάχιστον σε 700 είδη βασιδιομυκήτων που αντιπροσωπεύουν 182 γένη βασιδιομυκήτων, έχουν εντοπισθεί βιοδραστικές ουσίες οι οποίες απομονώνονται από τα καρποσώματα, το μυκήλιο ή το υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (Wasser και Weis, 1999; Lull κ.α., 2005). Σήμερα έχουν απομονωθεί από πολλά είδη φαρμακευτικών μακρομυκήτων, όπως *L. edodes*, *Auricularia auricula-judae*, *Cordyceps sinense*, *G. lucidum*, *Grifola frondosa*, *P. ostreatus*, *Tremella fuciformis*, *A. bisporus*, *Hericiium erinaceus*, *F. velutipes*, *Trametes versicolor*, *Agaricus blazei*, *Schizophyllum commune*, *Coprinus comatus*, *V. volvacea* κ.α. πολλές ουσίες με αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση καθώς και δράσεις κατά των ιών, πλασμοδίων, πρωτόζωων, μυκήτων, βακτηριδίων, οι οποίες δοκιμάζονται από την ιατρική ως φάρμακα

Πίνακας Ι.3 Φαρμακευτικές δράσεις βασιδιομυκήτων (Wasser και Weis, 1999)

Θεραπευτικά αποτελέσματα / Μακρομύκητες	Αντιμυκητισιακά	Αντιφλεγμονώδη	Αντικαρκινικά	Κατά των ιών, π.χ. AIDS	Αντιβακτηριακά & Αντιπαρασιτικά	Ρύθμιση της πίεσης του αίματος	Καρδιαγγειακές διαταραχές	Υπερχοληστερολαιμία	Τονωτικό νεφρών	Κατά της ηπατίτιδας	Τονωτικό νεφρών	Σεξουαλική ενίσχυση	Χρόνια βρογχίτιδα	Αντιδιαβητικά
<i>Auricularia auricula-judae</i>			x			x	*	*						*
<i>Ganoderma lucidum</i>		*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
<i>Ganoderma applanatum</i>			x	x	x									
<i>Lentinula edodes</i>		*	*	*	*	*		*	*	*		*		*
<i>Pleurotus ostreatus</i>			x	x	x			*			*			
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	x		x					x						
<i>Flammulina velutipes</i>	x	*	*	x										
<i>Volvariella volvacea</i>			x	x	x			x						
<i>Agrocybe aegerita</i>	x		x					x			x			

* Αναγνωρισμένο εμπορικό προϊόν μανιταριού (συμπλήρωμα διατροφής)
 x - Μη αναγνωρισμένο εμπορικό προϊόν μανιταριού

αντικαρκινικά, αντιυπερτασικά, αντιμυκητιασικά, υπογλυκαιμικά, αντιυπερλιπιδαιμικά, κατά της αθηροσκλήρυνσης, για την καταστολή αυτοάνοσων νοσημάτων και αλλεργιών κ.λ.π. (Chang, 1996; Wasser και Weis, 1999; Minato, 2010; Reshetnikov κ.α., 2001; Lull κ.α., 2005; Shen κ.α., 2011; Ισραηλίδης και Φιλιππούσης, 2005). Στον Πίνακα I.3 παραθέτονται οι κύριες δράσεις ορισμένων φαρμακευτικών βασιδιομυκήτων που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή σύμφωνα με μελέτη των Wasser και Weis (1999).

Πολλές ουσίες με ανοσορρυθμιστικούς και/ή αντικαρκινικές ιδιότητες έχουν απομονωθεί από μανιτάρια, κάποια από τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (βλ. Πίνακα 1.4). Αυτές περιλαμβάνουν κυρίως πολυσακχαρίτες (πιο συγκεκριμένα β-D-γλυκάνες, πολυσακχαροπεπτιδία (PSP), πολυσακχαριδικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες. Επιπλέον, άλλες βιοενεργές ουσίες, όπως τριτερπένια, λιπίδια και φαινόλες έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί σε μανιτάρια με αποδεδειγμένες φαρμακευτικές ιδιότητες. Οι σημαντικότερες ανοσορρυθμιστικούς επιδράσεις αυτών των ουσιών αφορούν στη πολλαπλασιαστικότητα και την ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως τα αιμοποιητικά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα κύτταρα φονείς (NK), καταλήγοντας στη παραγωγή κυττοκινών.

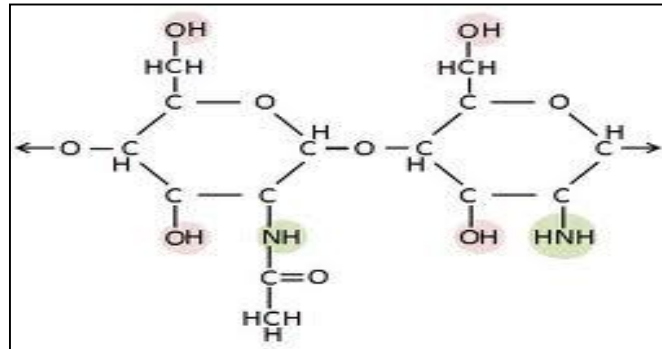
Στην κατηγορία των πολυσακχαριτών ανήκουν συστατικά που περιέχονται στα κυτταρικά τοιχώματα του μυκηλίου, όπως η χιτίνη (δομικός πολυσακχαρίτης των κυτταρικών τοιχωμάτων) και οι β-γλυκάνες (ομο- και ετερο-γλυκάνες με β(1-3), β(1-4) και β(1-6) γλυκοζιτικούς δεσμούς) (Manzi κ.α., 1999, 2001). Η χιτίνη (πολυμερές παράγωγο της χυτοβιόζης) που είναι πολυ-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (Εικόνα I.2), θεωρείται προβιοτική ουσία που επιδρά στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στον ορό του αίματος. Οι β-

Πίνακας I.4 Χαρακτηριστικά είδη μανιταριών με τις αντίστοιχες ιατροφαρμακευτικές τους ιδιότητες (Mizuno, 1995)

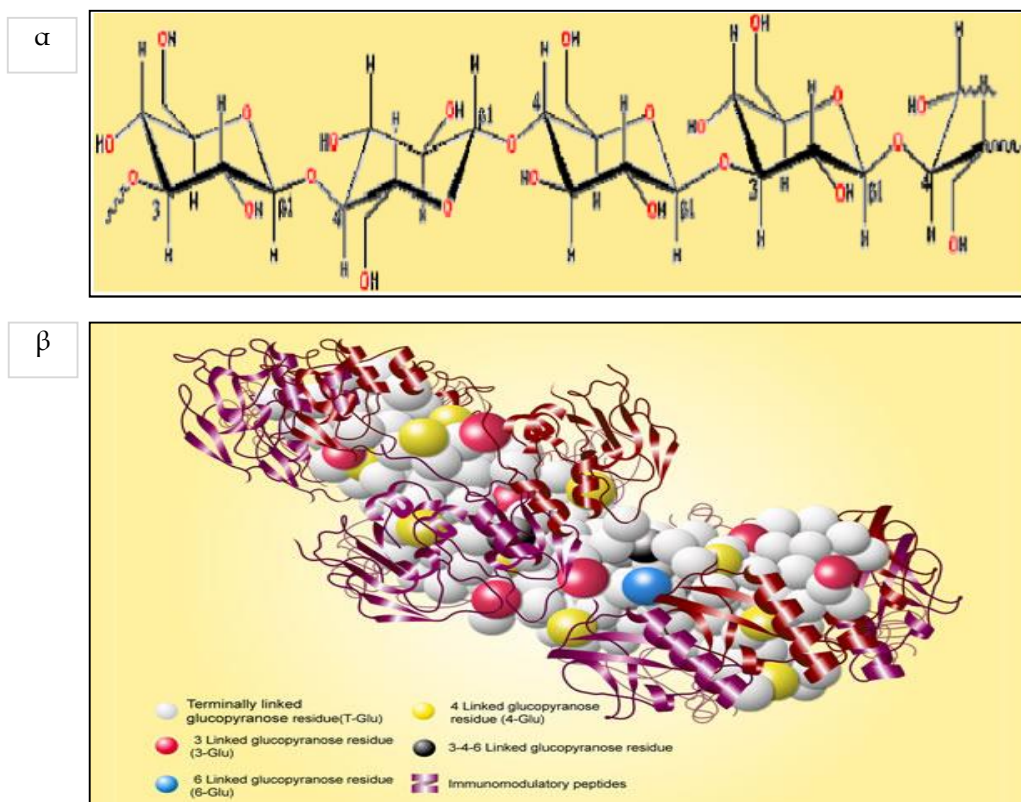
Μανιτάρια	Παράγωγα	Φαρμακευτικές ιδιότητες
<i>Ganoderma lucidum</i>	Πολυσακχαρίτες (ετερογλυκάνες, μαννογλυκάνες, γλυκοπεπτιδία)	Υπεργλυκαιμία, ανοσορρυθμιστική, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιγηραντική
<i>Lentinula edodes</i>	Πολυσακχαρίτες (λεντινάνη)	Ανοσορρυθμιστική, αντικαρκινική, αντιική
<i>Flammulina velutipes</i>	Πολυσακχαρίτες (γλυκοπρωτεΐνες)	Ανοσορρυθμιστική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης, αντιική
<i>Morchella esculenta</i>	Πολυσακχαρίτες (ετερογλυκάνες)	Υπεργλυκαιμία, αντικαρκινική.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Πολυσακχαρίτες (γλυκοπρωτεΐνες)	Υπεργλυκαιμία, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική

γλυκάνες (Εικόνα I.3 α,β) είναι πολυμερή της γλυκόζης ενωμένα με β-1,3 και β-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς που σε *in vitro* πειράματα έχουν δείξει κυτταροτοξική δράση εναντίον καρκινικών κυττάρων, ενώ σε *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα έχουν επιδείξει αντικαρκινική δράση μέσω της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Smith κ.α., 2002).

Όπως αναφέρθηκε, οι αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από ανώτερους μύκητες (καρποσώματα, καλλιέργειες βυθού) είναι είτε υδατοδιαλυτές β-D-



Εικόνα I.2 Χημική δομή της χιτίνης



Εικόνα I.3 (α) Στερεοχημική δομή, (β) Τρισδιάστατη δομή β-γλυκανών

γλυκάνες, β-D-γλυκάνες με αλυσίδες ετεροσακχαριτών ξυλόζης, μαννόζης, γαλακτόζης και ουρονικού οξέος, είτε σύμπλοκα β-D-γλυκάνης-πρωτεΐνης (γλυκοπρωτεΐνες). Σαν γενικός κανόνας, οι γλυκάνες που συνδέονται με τις πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη ενεργητικότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα σε σχέση με τις απλές γλυκάνες. Κάποιοι από τους πολυσακχαρίτες των μακρομυκήτων που έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες λόγω της θετικής τους δράσης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η λεντινάνη, η σχιζοφυλλάνη, το PSK, το PSP και το Grifon-D (Πίνακας I.5). Τα συγκεκριμένα είδη έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία τριάντα χρόνια. Κάποιοι από τους συγκεκριμένους πολυσακχαρίτες (συζευγμένοι ή μη), όπως η σχιζοφυλλάνη, η λεντινάνη, η γριφολάνη, η κρεστίνη/σύμπλοκο πολυσακχαρίτη - πεπτιδίου και το PSK/σύμπλοκο πολυσακχαρίτη-πρωτεΐνης) έχουν εμπορευματοποιηθεί και χρησιμοποιούνται κατά την κλινική θεραπεία ασθενών με καρκίνο (Yang και Zhang, 2009). Από τα αυτοφυή μανιτάρια, η πιο σημαντική σχετική ιατρική εφαρμογή είναι ο αντικαρκινικός παράγοντας καλβασίνη (calvacin) που απομονώθηκε από το μανιτάρι *Calvatia gigantea* και ανάλογη ουσία από τον *Boletus edulis* που αναχαιτίζει την ανάπτυξη όγκων.

Πίνακας I.5 Χημικές δομές και δράσεις πολυσακχαριτών μακρομυκήτων (Yang και Zhang, 2009)

Πολυσακχαρίτες	Χημική σύσταση	Δράσεις	Αναφορές
Λεντινάνη	β-1,3-D γλυκάνη που περιέχει τμήματα γλυκοπυρανοζιλής διακλαδιζόμενα στην 6 ^η θέση του μορίου της γλυκόζης	Αντικαρκινική, αντιική, ανοσορρυθμιστική και αντιθρομβωτική	Kurfahl κ.α., 2006; Lo κ.α., 2007; Maeda κ.α., 1997; Oka κ.α., 1996; Surenjav κ.α., 2006; Tomati κ.α., 2004; Vanea κ.α., 2006; Zhang κ.α., 2005
Σχιζοφυλλάνη	β-1,3-D γλυκάνη με μία πλευρική αλυσίδα β-1,6-D γλυκόζης ανά τρία σάκχαρα της κύριας αλυσίδας	Αντικαρκινική	Bot κ.α., 2001; Okamura κ.α., 1986; Tsuzuki κ.α., 1999
Πολυσακχαρίτης του μανιταριού <i>G. lucidum</i>	(1→4)-α-D-μαννοξυλάνη ή (1-3)-β-D-γλυκάνη για κύριο σκελετό διακλαδιζόμενο με μονο-, δι-, ολιγοσακχαρίτες, μια γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει φουκόζη ή μία όξινη πρωτεΐνη ενωμένη με πολυσακχαρίτη	Αντικαρκινική, αντιική, ανοσορρυθμιστική, αντιοξειδωτική, προστασία του συκωτιού, μείωση των επιπέδων της γλυκόζης του ορού, αντιεπεπτική, αντιελκογόνη και παρεμπόδιση της υπεροξειδωσής του λίπους και της οξειδωσής-καταστροφής του DNA	Bao κ.α., 2001, 2002; Eo κ.α., 2000; Kim κ.α., 2000; Lai και Yang 2007; Lee κ.α., 2001; Peng, κ.α., 2005; Shiao, 2003; Sun κ.α., 2004; Wang κ.α., 2002; Zhu και Lin, 2006; Zhu κ.α., 2007
Πολυσακχαρίτης του μανιταριού <i>A. auricula</i>	Ετεροπολυσακχαρίτες με βασική αλυσίδα αποτελούμενη από κομμάτια β-1,3-D-γλυκόζης με διακλαδώσεις από διάφορα μόρια όπως μαννόζη, γλυκόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικό οξύ	Αντικαρκινική, ανοσορρυθμιστική, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντιθρομβωτική	Fan κ.α., 2006; Wu κ.α., 2006; Yoona κ.α., 2003; Zhang και Yang, 1995, 1999

Όσον αφορά στις ευεργετικές ιδιότητες του μανιταριού *V. voluacea*, διάφορες αναφορές περιγράφουν της ανοσορρυθμιστικές, αντιογκολογικές και υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες αρκετών συστατικών που απομονώθηκαν από το καρπόσωμα, καθώς και το μυκήλιο του μανιταριού. Η λεκτίνη που προέρχεται από τον μύκητα *V. voluacea* μοριακού βάρους 26kDa, η οποία αποτελείται από δύο μη όμοιες υπομονάδες φάνηκε να έχει μέτρια ανασταλτική δραστηριότητα στην αύξηση καρκινικών κυττάρων (Lin και Chou, 1984). Ωστόσο, η πρωτεΐνη Fir-vno, ένα ανοσορρυθμιστικό πολυπεπτίδιο που απομονώθηκε από το καρπόσωμα του *V. voluacea*, ενεργοποίησε τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων λεμφοκυττάρων του περιφερικού συστήματος σε *in vitro* μετρήσεις (Hsu κ.α., 1997). Επαναλαμβανόμενη χορήγηση Fir-vno σε ποντίκια επίσης επιλεκτικά βελτίωσε την μεταγραφική έκφραση των ιντερλευκίνης (IL)-2, IL-4, ιντερφερόνης (IFN)- γ , του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF)- α , της λυμφοτοξίνης και του υποδοχέα της IL-2 (Hsu κ.α, 1997). Παρομοίως, μια λεκτίνη ανοσορρυθμιστής (VVL) που απομονώθηκε από το καρπόσωμα και το μυκήλιο του μύκητα *V. voluacea* ενεργοποίησε την πολλαπλασιαστική δράση λεμφοκυττάρων του σπλήνα σε ποντίκια και βελτίωσε την μεταγραφική έκφραση της ιντερλευκίνης-2 και του IFN- γ (She κ.α., 1998). Η VVL έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα σε μια σειρά από καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επίσης, πιθανή ογκοκατασταλτική δραστηριότητα προς εμφυτευμένους όγκους σε ποντίκια αναφέρθηκε για την 1,3- β -D γλυκάνη που προήλθε από αλκαλική απομόνωση του καρποσώματος του μύκητα *V. voluacea* (Kishida κ.α., 1989, 1992).

Σε πείραμα που έγινε σε ποντίκια χάμστερ που έπασχαν από υπερχοληστερολαιμία, όταν υποβλήθηκαν σε διαίτα με το μανιτάρι *V. voluacea* (καρπόσωμα ή μυκήλιο) εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης στο συκώτι και υψηλότερα επίπεδα ουδέτερων στερολών στα απεκκρίματά τους σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου (Cheung, 1998). Ακόμα, η συνολική χοληστερόλη πλάσματος, η HDL χοληστερόλη και τα συνδυασμένα επίπεδα συγκέντρωσης VLDL+LDL ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα που μελετήθηκε σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου (Cheung, 1998). Επίσης, αντιοξειδωτική δράση φαίνεται ότι έχουν τα κρύα (20 °C) και ζεστά (100 °C) εκχυλίσματα καρποσωμάτων όταν μετρήθηκαν με την μέθοδο FRAP (Shi, 2002). Ο μύκητας *V. voluacea* εμφανίζεται λοιπόν να έχει υποχοληστερολαιμικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Άλλα βιοδραστικά συστατικά που απομονώθηκαν από τον μύκητα *V. voluacea* περιλαμβάνουν μια καρδιοτοξική πρωτεΐνη, τη Βολβατοξίνη A2 (Weng κ.α., 2004; Lin κ.α., 2004) και την πρωτεΐνη που απενεργοποιεί το ριβόσωμα, Βολβαρίνη (Yao κ.α., 1998).

Ι.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΥΘΟΥ

Η χρήση της βιομάζας γίνεται υπό διάφορες μορφές (νωπή ή αποξηραμένη, σε σκόνη ή τεμάχια) με σκοπό την παρασκευή διαφόρων τροφίμων (σούπες, σάλτσες, πατέ, κρέμες, έως σνακ), ποτών (καφές, τσάι, μπύρες, κρασιά, αλκοολούχα ποτά, δυναμωτικά και θεραπευτικά αφεψημάτα), βελτιωτικών και ενισχυτικών (αρώματος και γεύσεως) συστατικών (σούπες, λιπαρές ύλες με άρωμα μανιταριού, πατέ) ή συμπληρωμάτων διατροφής (Litchfield, 1968; Maga, 1981). Περαιτέρω δε, η παραγωγή του μυκηλίου σε υγρές καλλιέργειες (στατικές ή βυθισμένου τύπου) έχει το πλεονέκτημα ότι μεγάλες ποσότητες αυτού μπορούν να παραχθούν σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, σε όλη τη διάρκεια του χρόνου και σε ρυθμό πολύ μεγαλύτερο από αυτόν των στερεών μέσων, ενώ το μυκήλιο μπορεί να παραληφθεί γρήγορα και εύκολα (Viccini κ.α., 2003; Lee κ.α., 2004; Fazenda κ.α., 2008). Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι σε βυθισμένες καλλιέργειες, οι οποίες πραγματοποιούνται κυρίως σε βιοαντιδραστήρες είναι δυνατόν να παραχθούν σε αρκετά υψηλές ποσότητες μεταβολίτες υψηλής φαρμακευτικής σπουδαιότητας, όπως εξωπολυσακχαρίτες (Tang κ.α., 2007). Ακόμα, παράγοντες όπως το pH, η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών και ο αερισμός μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν και έτσι να παραχθεί μυκήλιο με σταθερή ποιότητα (Szuecs, 1958) και να γίνει ικανοποιητικός έλεγχος της βιοδιεργασίας ακόμη και σε σχετικά μεγάλο ενεργού όγκου βιοαντιδραστήρες (Zhong κ.α., 2003; Zhong και Tang, 2004; Tang κ.α., 2011). Επιπλέον, μακρομύκητες όπως αυτοί των γενών *Ganoderma* spp., *Schizophyllum* spp., *Pleurotus* spp. και των ειδών *F. velutipes*, *Tuber sinense*, *L. edodes*, *Morchella* spp., *Volvariella* spp. χρησιμοποιούνται για υγιεινή διατροφή και περιέχουν βιολογικώς ενεργά συστατικά με πολλές προστατευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες (π.χ. αντικαρκινική δράση), όπως υψηλής φαρμακευτικής σπουδαιότητας πολυσακχαρίτες (π.χ. λεντινάνη, σχιζοφυλλάνη), γανοδερικά οξέα, κ.λ.π. (Mizuno, 1995; Bobek κ.α., 1998; Wasser, 2002; Israilides και Philippoussis, 2003; Zhong κ.α., 2003; Zhong και Tang, 2004; Philippoussis, 2009). Επίσης, οι Israilides κ.α. (2008) ανέπτυξαν το μύκητα *L. edodes* σε καλλιέργεια βυθού και παρέλαβαν ενεργά εκχυλίσματα από το μυκήλιο και το καρπόσωμά του με σκοπό να διερευνήσουν την ανοσοδιεγερτική τους δράση, την κυτταροτοξικότητά τους και την παρεμποδιστική τους δράση στην ανάπτυξη διαφόρων φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Χάρη στην υψηλή συγκέντρωση αυτών των συστατικών, τα οποία περιέχονται στα καρποσώματα, μυκήλια ή/και στο υγρό καλλιέργειας των μακρομυκήτων (Wasser, 2002; Wasser και Weis, 1999 - Πίνακας Ι.6), το μυκήλιο των ανώτερων μυκήτων αποτελεί σημαντική πρώτη ύλη για τις φαρμακευτικές βιομηχανίες. Γενικά, αναφέρεται ότι η ποσότητα και ο αριθμός των πολυσακχαριτών που παραλαμβάνονται από τα καρποσώματα είναι συνήθως πολύ υψηλότερος από εκείνον στις

Πίνακας I.6 Δραστικοί αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από φαρμακευτικά μανιτάρια βασιδιομυκήτων (Wasser και Weis, 1999)

Είδος	Καρπόσωμα	Καλλιέργεια βυθού – μυκηλιακή βιομάζα (IPS)	Καλλιέργεια βυθού – υγρή φάση (EPS)
<i>A. auricula</i>	(1-3)-β-γλυκάνη	-	-
<i>P. pulmonarius</i>	ξυλογλυκάνη, ξυλοπρωτεΐνη	-	-
<i>P. ostreatus</i>	όξινο τμήμα πολυσακχαρίτη, HA (β-γλυκάνη)	-	β-γλυκάνη, ετερογλυκάνη
<i>V. volvacea</i>	VVG (β-1-3)-D-γλυκάνη, α- μαννο-β-γλυκάνη	-	-
<i>F. velutipes</i>	EA6, EA6-PII (β-γλυκάνη - πρωτεΐνη)	προφλαμίνη (γλυκοπρωτεΐνη)	-
<i>A. aegerita</i>	α-(1-3)-β-γλυκάνη	-	-
<i>L. edodes</i>	λεντινάνη (β-D-γλυκάνη)	KS-2-α-μαννάνη- πεπτιδίο, LEM, LAP (ετερογλυκάνη- πρωτεΐνη), EP3	LEM, LAP (ετερογλυκάνη - πρωτεΐνη), EP3
<i>G. applanatum</i>	FI-1-B-1 (β-γλυκάνη)	F-1a-1-b (β-γλυκάνη), ετερογλυκάνες, πεπτιδογλυκάνες	-
<i>G. lucidum</i>	FI-1a (β-γλυκάνη), FIII-2b (έτερο-β-γλυκάνη), όξινη ετερογλυκάνη, χιτίνη, ξυλογλυκάνη	-	β-γλυκάνη
<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	σονιφιλάνη, SPG ή σχιζοφυλλάνη (β- γλυκάνη)

καλλιέργειες βυθού.

Για τους παραπάνω λόγους, η παραγωγή μυκηλιακής μάζας διαφόρων μανιταριών έχει μελετηθεί εκτενώς και κυρίως ως προς τους τρόπους μεγιστοποίησης της παραγωγής της (μελέτη παραμέτρων αύξησης). Ως παράμετρος αύξησης μπορεί να θεωρηθεί οτιδήποτε επηρεάζει την αύξηση του μύκητα, είτε αυτό ανήκει στο περιβάλλον στο οποίο καλλιεργείται (θερμοκρασία, pH, αερισμός, υγρασία), είτε στον τρόπο που καλλιεργείται (στερεή ή υγρή, αναδεδόμενη - μη αναδεδόμενη καλλιέργεια, κλειστή ή ημισυνεχής τροφοδοτούμενη ή συνεχής καλλιέργεια), είτε στο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (πηγή άνθρακα - αζώτου, αναλογία αυτών στο υπόστρωμα, μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία, βαρέα μέταλλα και άλλες ουσίες που μπορεί να προστίθενται, προϊόντα που παράγονται). Υπάρχουν πολλές μελέτες που ερευνούν το θέμα των παραμέτρων αύξησης σε ποικίλους μακρομύκητες με σκοπό την αύξηση της βιομάζας και εξαγωγή μεταβολιτών, όπως πολυσακχαρίτες για χρήση τους στην ιατρική βιομηχανία.

Όσον αφορά στο εδώδιμο μανιτάρι που εξετάστηκε εις βάθος στην παρούσα εργασία το *V. voluacea*, αυτό έχει μελετηθεί επαρκώς σε ό,τι αφορά την παραγωγή βιομάζας σε στερεοποιημένα με άγαρ υποστρώματα όπως και οι παράγοντες που την επηρεάζουν (Volz, 1972; Chang-Ho και Yee, 1977; Fasidi και Akwakwa, 1996; Zervakis κ.α., 2001; Akinyele και Adetuyi, 2005; Moonmoon κ.α., 2008), ενώ είναι ελάχιστες οι εργασίες που αναφέρονται σε κινητικές μελέτες αύξησής του σε υγρές καλλιέργειες και εξετάζουν, εκτός από την παραγόμενη βιομάζα, την ποσότητα των πολυσακχαριτών και τη σύστασή τους σε σάκχαρα, των λιπιδίων του και τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα, καθώς και την ποσότητα και την σύσταση των κλασμάτων τους (Huang κ.α., 1985; Breene, 1990). Ο σχηματισμός πολύτιμων μεταβολικών προϊόντων είναι γνωστό ότι εξαρτάται από το στέλεχος του μύκητα και τις συνθήκες καλλιέργειάς του. Ωστόσο, η χημική φύση των πηγών άνθρακα και του αζώτου, οι συγκεντρώσεις και η αναλογία τους επηρεάζουν εξίσου την κατεύθυνση ενός μεταβολικού μονοπατιού όπως π.χ. εκείνο της λιπογένεσης (Κονονα κ.α., 1987; Radzhabova κ.α., 1990). Από πολλές έρευνες προκύπτει ότι ο λόγος C/N και οι διάφορες αναλογίες του στο μέσο της καλλιέργειας καθορίζουν όχι μόνο το ρυθμό βιοσυσσώρευσης, αλλά και την περιεκτικότητα του μυκηλίου σε πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες.

Ειδικότερα, όσον αφορά στους πολυσακχαρίτες, είναι μια τάξη μακρομορίων με την υψηλότερη συμμετοχή σε βιολογικές λειτουργίες σε σχέση με τα υπόλοιπα μακρομόρια χάρη στην υψηλή πολυμορφικότητα της δομής τους. Η ικανότητα των πολυσακχαριτών να προσαρμόζονται δομικά στους διάφορους μηχανισμούς ρύθμισης συμβάλει στη σωστή λειτουργία των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων στους ανώτερους οργανισμούς όπως είναι ο άνθρωπος (Wasser, 2002). Πράγματι, οι πολυσακχαρίτες μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τύπο του επαναλαμβανόμενου μονοσακχαρίτη, το μήκος της αλυσίδας, τον τύπο του δεσμού που συνδέει τα απλά σάκχαρα και το βαθμό διακλάδωσης. Οι επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (μονοσακχαρίτες) ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς και ένα σάκχαρο μπορεί να ενωθεί με περισσότερα από δύο άλλα σάκχαρα, δημιουργώντας πολύ μεγάλες μακρομοριακές αλυσίδες με υψηλό ποσοστό διακλάδωσης (σύνθετα μόρια). Οι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από όμοια μόρια απλών σακχάρων ονομάζονται ομοπολυσακχαρίτες, ενώ όταν αποτελούνται από ανόμοια μόρια ονομάζονται ετεροπολυσακχαρίτες (Διαμαντίδης, 2007). Όπως αναφέρθηκε, οι πολυσακχαρίτες των μανιταριών είναι β-γλυκάνες (ομο- και ετερο-γλυκάνες, ήτοι πολυμερή της γλυκόζης ενωμένα με β(1-3), β(1-4) και β(1-6) γλυκοζιτικούς δεσμούς) (Manzi κ.α., 1999; 2001). Οι γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες οι οποίοι περιέχουν και άλλες δομικές μονάδες στη βασική τους αλυσίδα πέραν της γλυκόζης. Σε κάποιες γλυκάνες, τα δομικά σάκχαρα

ενώνονται με β -(1-3), (1-6) και α -(1-3) γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ άλλες είναι ετερογλυκάνες. Οι πλευρικές αλυσίδες των ετερογλυκανών περιέχουν γλυκουρονικό οξύ, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη ή ξυλόζη ως κύριο συστατικό ή σε διάφορους συνδυασμούς. Αρκετά συχνά, επίσης, εμφανίζεται μια κύρια αλυσίδα, η οποία είναι β (1-3) ή β (1-4) αλυσίδα ή ανάμεικτη β (1-3), β (1-4) αλυσίδα με β (1-6) πλευρικές αλυσίδες. Στον Πίνακα Ι.7 καταγράφονται κατηγορίες πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες χημικές τους δομές που απομονώθηκαν από διάφορα μανιτάρια (Zhang κ.α., 2007).

Τέλος, βυθισμένες καλλιέργειες εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών έχουν χρησιμοποιηθεί προς την «προηγμένου τύπου» διεργασία διαφόρων αποβλήτων και υποπροϊόντων (π.χ. υγρά απόβλητα ελαιουργίας, απόβλητη γλυκερόλη προερχόμενη από τη διεργασία παραγωγής βιοντήζελ, κ.λ.π.) όπου επιτυγχάνεται αξιοποίηση των αποβλήτων κατά τρόπο «διττό», καθόσον από τη μία πλευρά μειώνεται (ή και σε πολλές περιπτώσεις μηδενίζεται) το ρυπαντικό φορτίο των αποβλήτων, ενώ από την άλλη πλευρά παράγεται εδώδιμη βιομάζα και μεταβολικά προϊόντα (π.χ. ένζυμα) χρήσιμα για τη βιομηχανία τροφίμων και τη χημική βιομηχανία (Zervakis κ.α., 1996; Tsioumpas κ.α., 2002; Aggelis κ.α., 2003; D'Annibale κ.α., 2004; André κ.α., 2010).

Πίνακας I.7 Χημικές δομές πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από διάφορα μανιτάρια (Zhang κ.α., 2007)

Κατηγορία πολυσακχαρίτη	Είδη δεσμών	Γλυκάνη/Μύκητας/ Βιβλιογραφία	Κύρια αλυσίδα	Διακλάδωση	M. B.	
Ομογλυκάνες	(1→3) -β-D-γλυκάνη με 1-6 διακλαδώσεις	Λεντινάνη από <i>L. edodes</i> (Mizuno, 1997)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→6) -β-	5x10 ⁵	
		Σχιζοφυλλάνη από <i>Schizophyllum commune</i> (Yamamoto, 1981)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→6) -β-		
		Γριφολάνη από <i>Grifola frondosa</i> (Zhuang κ.α., 1994)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→6) -β-	5x10 ⁵	
		Σκληρογλυκάνη από <i>Sclerotium sclerotia</i> (Palleschi κ.α., 2005)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→6) -β-		
		Μία βασική-διαλυτή γλυκάνη από <i>Pleurotus tuber-regium</i> (Zhang κ.α., 2003)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→6) -β-	2x10 ⁵	
	Γραμμική (1→3) -β-D γλυκάνη	<i>Auricularia auricula</i> (Ukai κ.α., 1983)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	-	-	
		<i>Lyophyllum decastes</i> (Ukawa κ.α., 2000)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	-	-	
		<i>Armillariella tabescens</i> (Kihō κ.α., 1992)	(1→6) -β-D-γλυκάνη	-	-	
		Παχυμάνη από <i>Poria cocos</i> (Kanayama κ.α., 1986)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→2) -β- ή (1→6) -β-	1x10 ⁵	
		Γραμμική (1→6) -β-γλυκάνη, (1→3) -β-D γλυκάνη με 1-2 ή 1-6 διακλαδώσεις (1→3) -α-γλυκάνης	<i>Armillariella tabescens</i> (Ukawa κ.α., 2000)	(1→3) -α-γλυκάνη	-	-
Ετερογλυκάνες	(1→3) -β- γλυκουρογλυκάνη	<i>Amanita muscaria</i> (Kihō κ.α., 1992)	(1→3) -α-γλυκάνη	-	-	
		(1→4) -α; (1→6) -α-γλυκάνη	(1→6) -α-γλυκάνη	(1→4) -α-	-	
	(1→4) -α; (1→6) -β-γλυκάνη	<i>Agaricus blazei</i> (Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	(1→6) -β-D-γλυκάνη	(1→4) -α-	-	
			(1→6) -β; (1→3) -α-γλυκάνη	(1→3) -α-γλυκάνη	(1→6) -β-	-
	Ευλογυκάνη	(1→3) -β- γλυκουρογλυκάνη	<i>Ganoderma lucidum</i> (Mizuno, 1998)	(1→3) -β-γλυκουρογλυκάνη	γλυκουρο-νικό οξύ	5,3x10 ⁴
			<i>Grifola frondosa</i> (Mizuno και Zhuang, 1995) <i>Polyporus confluentis</i> (Sugiyama κ.α., 1992) <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Wasser, 2002)	γλυκάνη	ξυλόζη	-
		Αραβινογλυκάνη	<i>Ganoderma tsugae</i> (Wang κ.α., 1993)	γλυκάνη	αραβινόζη	-
		Ριβογλυκάνη	<i>Agaricus blazei</i> (Mizuno, 1998) <i>Flammulina velutipes</i> (Zeng, 1990)	γλυκάνη	ριβόζη	-
		Γαλακτομαννογλυκάνη	<i>Hohenbuehelia serotina</i> (Ma κ.α., 1991) <i>Leucopaxillus giganteus</i> (Wasser, 2002)	γλυκάνη	γαλακτόζη & μαννόζη	-
		Γαλακτοξυλογλυκάνη	<i>Hericiium erinaceus</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	γλυκάνη	γαλακτόζη & ξυλόζη	-
Μαννοξυλογλυκάνη		<i>Grifola frondosa</i> (Cun κ.α., 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994)	γλυκάνη	μαννόζη και ξυλόζη	-	
Ευλογαλακτογλυκάνη		<i>Inonotus obliquus</i> (Kim κ.α., 2005)	γλυκάνη	γαλακτόζη, ξυλόζη	-	
Ετερογλυκάνες		Γλυκογαλακτάνη	<i>Ganoderma teugae</i> (Peng κ.α., 2005)	γαλακτάνη	γλυκόζη	-
		Αραβινογαλακτάνη	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Wang κ.α., 2005)	γαλακτάνη	αραβινόζη	-
	Φουκογαλακτάνη	<i>Sarcodon aspratus</i> (Mizuno κ.α., 2000)	γαλακτάνη	φουκόζη	-	
	Μαννογαλακτάνη	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Wasser, 2002)	γαλακτάνη	μαννόζη	-	
	Φουκομαννογαλακτάνη	<i>Grifola frondosa</i> (Cun κ.α., 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994)	γαλακτόζη	φουκόζη - μαννόζη	-	
	Ξυλόνη, γλυκοξυλόνη	<i>Hericiium erinaceus</i> (Kawagishi κ.α., 1990)	ξυλόνη	γλυκόζη	-	
	Μαννογαλακτοφουκάνη	<i>Grifola frondosa</i> (Cun κ.α., 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994)	φουκάνη	μαννόζη, γαλακτόζη	-	
	Μαννογλυκοξυλόνη	<i>Hericiium erinaceus</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992, 1998)	ξυλόζη	μαννόζη, γλυκόζη	-	
	(1→3) -α-μαννάνη	<i>Dictyophora indusiata</i> (Hara κ.α., 1991)	(1→3)-α-μαννάνη	-	-	
	Γλυκομαννάνη		μαννάνη	γλυκόζη	-	
Σύνπλοκα πολυσακχαρίτη-πρωτεΐνης/πρωτεΐδιου	Σύνπλοκα πολυσακχαρίτη-πρωτεΐνης	<i>Agaricus blazei</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992;	(1→2) -β-; (1→3) -β-γλυκομαννάνη	(1→3) -β-ενωμένη μαννόζη	(1→2) -β-γλυκάνη	-
			Γαλακτογλυκομαννάνη	μαννάνη	γαλακτόζη & γλυκόζη	-
	Σύνπλοκα πολυσακχαρίτη-πρωτεΐδιου	<i>Coriolus versicolor</i> (Cui και Chisti, 2003)	α-1,4 και β-1,3 δεσμός, περιέχεται; αραβινόζη, ριμανόζη (όχι φουκόζη)	Πεπτίδιο: ασπαρτικό, γλουταμινικό οξύ	1x10 ⁵	
			α-1,4 και β-1,3 δεσμός, περιέχεται; φουκόζη (όχι αραβινόζη, ριμανόζη)	Πεπτίδιο: ασπαρτικό, γλουταμινικό οξύ	1x10 ⁵	

Ι.3.1. Παραγωγή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Στις περισσότερες έρευνες, ο σύνηθες τρόπος ανάπτυξης των μυκηλίων σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα για παραλαβή βιομάζας και διαφόρων μεταβολιτών γίνεται χρησιμοποιώντας απλές πηγές άνθρακα με κυρίαρχη τη γλυκόζη (Gern κ.α., 2008; Elisashvili κ.α., 2009; Meng κ.α., 2010; Nwokoye κ.α., 2010). Επίσης και η αριστοποίηση της παραγωγής IPS από μακρομύκητες έχει μελετηθεί με τη χρήση διαφόρων πηγών άνθρακα, με πρώτη τη γλυκόζη (Pokhrel και Ohga, 2007 - για τον *Lyophyllum decastes*; Tang και Zhong, 2002 - για τον *G. lucidum*; Tang κ.α., 2008 - για τον *T. sinense*). Σε περιορισμένο αριθμό εργασιών έχει αναφερθεί και η χρήση λακτόζης (π.χ. για την παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδερικού οξέος από τον *G. lucidum* (Tang και Zhong, 2002), όπως και σακχαρόζης (π.χ. για την καλλιέργεια του μύκητα *G. lucidum* σε μελέτη του Chen, 2002) ή για τον *T. sinense* από τους Tang κ.α., 2008), αλλά και σακχαρόζης, μαννόζης, λακτόζης και συνδυασμούς αυτών για την ανάπτυξη του *M. elata* (Winder, 2006), ενώ ως πηγή αζώτου προτιμούνται συνήθως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης. Επιπρόσθετα, έχουν γίνει έρευνες για δυνατότητα ανάπτυξης κάποιων ειδών μακρομυκήτων π.χ. *Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp. και *L. edodes* σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα από αγροβιομηχανικά παραπροϊόντα όπως γλυκερόλη ή απόβλητα όπως υγρά απόβλητα ελαιουργείου (Tsioulpas κ.α., 2002; Fountoulakis κ.α., 2002; Aggelis κ.α., 2003; André κ.α., 2010; Lakhtar κ.α., 2010; Ntougias κ.α., 2012).

Για παράδειγμα, η μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *P. ostreatus* σε ζυμώσεις βυθισμένου τύπου έχει αναφερθεί από πολύ παλιά (Voltz, 1966; Ginterová, 1973; Zadrazil, 1975, 1978; Shannon και Stevenson, 1975; Dijkstra, 1976). Σήμερα η ζύμωση υγρής κατάστασης των μυκήτων *Pleurotus* spp. χρησιμοποιείται ευρέως, ειδικά για παραγωγή βιομάζας με σκοπό την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών (Gregori κ.α., 2007). Οι Gern κ.α. (2008), σε μελέτη επιλογής υποστρώματος για μεγιστοποίηση της παραγωγής της μυκηλιακής μάζας του στελέχους *P. ostreatus* DSM 1833 και κατ'έπекταση παραγωγής του βιοενεργού πολυσακχαριτη β-γλυκάνη που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του μυκηλίου αλλά και του καρποσώματος των ειδών *Pleurotus*, διαπίστωσαν ότι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαριτών παρουσιάστηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν 5 g/l εκχυλίσματος ζύμης και 40 g/l γλυκόζης. Όσον αφορά στη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, οι βέλτιστες τιμές ανευρέθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε 20 g/l εκχύλισμα σίτου/καλαμποκιού και 40 g/l γλυκόζης. Οι El-Dein κ.α. (2004) σημείωσαν για τον *P. pulmonarius* μέγιστη τιμή παραχθείσας βιομάζας σε καλλιέργειες με αναδεδόμενες φιάλες, αυτή των 20,45 g/l ενώ οι Confortin κ.α. (2008) που πραγματοποίησαν καλλιέργειες του μύκητα *P. sajor-caju* σε μηχανικώς αναδεδόμενους βιοαντιδραστήρες ενεργού όγκου 5 l χρησιμοποιώντας μια πληθώρα

σακχάρων ως υλικών εκκίνησης της ζύμωσης (γλυκόζη, σακχαρόζη, κ.λ.π.), κατέγραψαν τιμές ξηράς μυκηλιακής μάζας μεταξύ 5,9 και 8,2 g/l.

Διάφορα υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε ζυμώσεις βυθού του μακρομύκητα *G. lucidum* (Han κ.α., 2005). Στην Κίνα παράγεται ένα ζυμούμενο γάλα σόγιας από το συγκεκριμένο μύκητα που αποτελεί υγιεινό πρωτεϊνούχο αναψυκτικό (Shao και Tang, 2002), για τη ζύμωση του οποίου, οι Yang και Zhang (2009) εξέτασαν πιθανές αλλαγές στην περιεκτικότητα των πολυσακχαριτών, των σακχάρων, της ακατέργαστης πρωτεΐνης, της βιταμίνης Β, των ελεύθερων αμινοξέων και των ισοφλαβονών. Επίσης, οι Chang κ.α. (2006) εξέτασαν την ανάπτυξη στελέχους *G. lucidum* σε διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου σε καλλιέργειες βυθού, αναδεδυόμενης φάσης. Από τις πηγές άνθρακα, η σακχαρόζη και το εκχύλισμα βύνης εμφάνισαν τα πιο θετικά αποτελέσματα κατά την μυκηλιακή ανάπτυξη και κατά την παραγωγή πολυσακχαριτών, ενώ από τις πηγές αζώτου το εκχύλισμα ζύμης και το αποβουτυρωμένο γάλα ήταν τα πιο αποτελεσματικά. Η προσθήκη ελαιοσπέρματος από το άνθος του φυτού κρόκος (*Crocus sativus*, σαφράν) στο θρεπτικό υπόστρωμα προώθησε εξίσου σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη, όπως επίσης και η προσθήκη ανθρακικού νατρίου συνέβαλε στη μυκηλιακή αύξηση και στην παραγωγή πολυσακχαριτών. Ακόμη, κατά τη μελέτη των Yang κ.α. (2000) ο μύκητας *G. lucidum* σε υπόστρωμα γλυκόζης 50 g/l παρήγαγε 2,0 g/l μυκηλιακής βιομάζας και με τη προσθήκη ελαϊκού οξέος η βιομάζα αυξήθηκε σε 4,6 g/l. Τέλος, οι Lee κ.α. (2003) χρησιμοποίησαν ως υπόστρωμα σε καλλιέργειες βυθού για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μύκητα, αποπρωτεϊνωμένο ορρό γάλακτος τυριού και συμπέραναν ότι το συγκεκριμένο είδος καλλιέργειας θα μπορούσε να προσφέρει μία αποδοτική οικονομική λύση για την εναλλακτική εκμετάλλευση του αποπρωτεϊνωμένου ορρού τυρογάλακτος, εντείνοντας τη χρήση του από την βιομηχανία παραγωγής τυριού.

Σε μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν σε καλλιέργειες βυθού διαφόρων στελεχών του *L. edodes*, οι Maziero κ.α. (1999) ανέφεραν παραγωγή βιομάζας 4,70 g/l σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό ανάδευση. Επίσης, οι Lombardi κ.α. (2002) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* σε αναδεδυόμενες φιάλες κατέγραψαν μυκηλιακή βιομάζα 6,1 g/l, ενώ καλλιέργεια του *L. edodes* σε γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης έδωσε μετά από αριστοποίηση των συνθηκών βιομάζα 6,88 g/l (Feng κ.α., 2010). Ωστόσο, μικρότερες παραγωγές βιομάζας (~5,0 g/l) σημειώθηκαν όταν ο μύκητας καλλιεργήθηκε με γεωργικά υπολείμματα σε αναδεδυόμενες φιάλες (Hasegawa κ.α., 2005) και σε υγρά απόβλητα ελαιουργίας (~4,0 g/l) (D'Annibale κ.α., 2004). Ακόμη, οι Reverberi κ.α. (2004) ανέφεραν αυξημένη σύνθεση της β-1-3-γλυκάνης από το μύκητα *L. edodes* σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ). Τα ΥΑΕ βρέθηκαν να είναι πολύ καλό υπόστρωμα για την παραγωγή βιομάζας του *L. edodes* (Lakhtar κ.α., 2010) και

αυτό κυρίως λόγω του ότι είναι πλούσια σε λιπίδια (1,5%, κ.β.), πλούσια κυρίως σε παλμιτικό και ελαϊκό οξύ, τα οποία υποκινούν την ανάπτυξη του μυκηλίου (Song κ.α., 1989). Οι Tomati κ.α. (2004) αναφέρουν επίσης ότι από τη βιομάζα του μυκηλίου του *L. edodes* που επώαστηκε σε ΥΑΕ, εκχυλίστηκαν οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και ξυλόζη σε μεγάλη ποσότητα (αναλογία 7:1), αλλά και ίχνη από τους ριβόζη, αραβινόζη και μαννόζη. Ακόμα, παρατηρήθηκε από τους ίδιους ερευνητές ότι το εκχύλισμα περιείχε τους πολυσακχαρίτες ξυλάνη και λεντινάνη. Τέλος, οι Minussi κ.α. (2007) αναφέρουν την παραγωγή λακκάσης σε υγρή ζύμωση αποβλήτων της διαδικασίας πολτοποίησης των ξύλων, ενώ οι Silva κ.α. (2005) σε μελέτες που έγιναν σε απόβλητα από βιομηχανίες του ελαιολάδου, της οينوπνευματοποίησης (μελάσες), της λεύκανσης βαμβακιού, της επεξεργασίας χαρτιού και πολτού και της βιομηχανίας κλωστοϋφαντουργίας ανέφεραν την παραγωγή των ενζύμων πρωτεάσης, λιπάσης και αμυλάσης.

Όσον αφορά στους μύκητες του γένους *Morchella*, έχουν καταγραφεί για τον *M. esculenta* τιμές βιομάζας της τάξης των 8,6 g/l (σε ζύμωση ~5 ημερών με 30 g/l γλυκόζης - Meng κ.α., 2010) και 4,5-6,9 g/l σε ανάλογες μελέτες αριστοποίησης συνθηκών (Xu κ.α., 2008α). Ωστόσο, σε άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων/ΕΘΙΑΓΕ καταγράφηκαν υψηλές τιμές βιομάζας (17,49g/l για τον *M. esculenta* και 8,18 g/l για τον *M. elata*) στις 17 ημέρες αύξησης των μυκήτων σε εκχύλισμα πατάτας με 20 g/l γλυκόζη (Φιλιππούσης, αδημοσίευτα στοιχεία). Τα ποσοτικά δεδομένα παραγωγής μυκηλιακής μάζας σε υγρές καλλιέργειες από τους μύκητες *A. auricula-judae*, *F. velutipes*, *A. aegerita* και *V. volvacea* είναι αρκετά περιορισμένα. Συγκεκριμένα, για τον μύκητα *A. auricula-judae* έχει αναφερθεί τιμή 10,6 g/l σε υλικό με βάση τη γλυκόζη (Wu κ.α., 2006). Χαμηλότερες αποδόσεις βιομάζας (της τάξης των ~3,2 g/l) κατέγραψαν οι Shin κ.α. (2007) στον *F. velutipes* σε μηχανικώς αναδεδυμένους βιοαντιδραστήρες, ενώ ο *A. aegerita* έδωσε 4,2 g/l τη δέκατη ημέρα της καλλιέργειας (Lomberh κ.α., 2002). Σε εργασίες που καταγράφουν την παραγωγή βιομάζας του *V. volvacea* αναφέρεται τιμή ~11 g/l για το μύκητα *V. volvacea* LPB77 κατά την ανάπτυξή του σε αναδεδυμένες φιάλες με υλικά εκκίνησης υπολείμματα της καλλιέργειας πατάτας και cassava (Tonial κ.α., 2000). Χαμηλότερες τιμές βιομάζας (0,6-3 g/l) παράχθηκαν και κατά την καλλιέργεια στελεχών του *V. volvacea* σε εκχυλίσματα γεωργικών υπολειμμάτων σε φιάλες υπό ανάδευση (Akinyele και Adetuyi, 2005), ενώ προσθήκη 1% κ.β. φυτικών ελαίων (ηλιέλαιο, σογιέλαιο, αραχιδέλαιο) και εστέρων του παλμιτικού, στεατικού και ελαϊκού οξέος σε υγρό υπόστρωμα γλυκόζης ευνόησε σημαντικά την παραγωγή βιομάζας (~8,5 g/l) του *V. volvacea* (Li κ.α., 1992). Ωστόσο, η επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στην

Πίνακας I.8 Βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην αύξηση του μυκηλίου του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* με βάση τη βιομάζα και την ταχύτητα γραμμικής αύξησης K_r (mm/ημέρα)

Πηγές άνθρακα	Καλλιέργειες υγρής κατάστασης (με βάση τη βιομάζα)				Καλλιέργειες στερεάς κατάστασης (με βάση τη βιομάζα)				K_r (mm/ημέρα)
	Chang-Cho και Yee (1977)	Chandra και Purkayastha (1977)	Voltz (1972) V135	Voltz (1972) V134	Torres-Lopez και Hepperly (1988)	Rayes κ.α. (1998) Vvc1	Rayes κ.α. (1998) EAAC-0001	Fasidi και Akwakwa (1996) <i>V. esculenta</i>	Moonmoon κ.α. (2008)
Γλυκόζη	100,00	100,00	100,00	100,00	-	100,00	100,00	100,00	100,00
Φρουκτόζη	-	112,35	67,44	66,67	-	-	-	116,87	77,94
Ξυλόζη	17,00*	44,12	90,70	175,0	-	-	-	-	-
Άμυλο	137,75	43,53	197,67	137,50	100,00	124,69	155,82	100,00	-
Μαλτόζη	-	41,76	102,32	150,00	25,64	111,47	122,08	112,50	108,78
Σακχαρόζη	-	8,23	100,00	137,50	-	143,29	115,79	98,13	131,77
Μαννόζη	115,48	99,41	100,00	116,67	-	-	-	93,75	-
Κελλοβιόζη	110,41	-	137,20	65,12	-	-	-	-	-
Ξυλάνη	87,56	-	93,02	32,56	-	-	-	-	-
Αραβινόζη	-	15,29	95,35	108,34	-	-	-	-	-
Γαλακτόζη	-	12,76	74,42	129,16	-	57,00	89,92	95,63	-
Ραμνόζη	-	-	132,56	150,00	-	-	-	-	-
Ριβόζη	-	-	79,06	129,17	-	-	-	-	-
Σορβόζη	-	1,35	120,93	95,84	-	-	-	-	-
Λακτόζη	-	10,76	83,72	91,66	25,64	52,17	64,68	79,38	35,51
Ραφφινόζη	-	-	69,77	79,17	-	-	-	-	-
Δεξτρίνη	-	94,12	144,19	108,34	-	-	-	89,37	-
Γλυκογόνο	-	-	620,93	116,67	-	-	-	-	-
Πηκτίνη	-	-	116,28	150,00	-	-	-	-	-
Σορβιτόλη	-	33,53	116,28	104,16	-	119,86	117,03	-	-
Μαννιτόλη	-	28,06	113,95	100,00	-	122,45	117,35	123,13	-
Κυτταρίνη	-	-	-	-	30,23	126,98	151,73	45,63	-

*Απόδοση σε σύγκριση με τη γλυκόζη (100,00%)

παραγωγή βιομάζας του *V. voluacea* σε υγρές καλλιέργειες και σε τρυβλία εξετάστηκε σε αρκετές μελέτες (Πίνακας I.8).

I.3.2. Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Μεγάλος αριθμός μελετών σε υγρές καλλιέργειες για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών αφορούν στο μανιτάρι *G. lucidum* (Yang και Liao, 1998; Lee κ.α., 1999; Li κ.α., 2000; Yang κ.α., 2000; Kim κ.α., 2002; Bevoric κ.α., 2003; Zhong και Tang, 2004). Σε αρκετές ωστόσο από τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε διαφορετική επίδραση της φύσης και της σύνθεσης του θρεπτικού υποστρώματος στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας και στη βιοσύνθεση EPS (Tang και Zhong, 2002; Parinutti, 2010). Συγκεκριμένα, οι Tang και Zhong (2002) μελετώντας τον *G. lucidum* σε υπόστρωμα λακτόζης αναφέρουν ότι το σάκχαρο ευνόησε την παραγωγή βιομάζας, αλλά όχι αυτή των EPS. Ακόμη, οι Yang και Liao (1998) παρατήρησαν ότι σε ζύμωση βυθού του *G. lucidum* σε εργαστηριακούς μηχανικώς αναδεδυμένους βιοαντιδραστήρες (όγκου 2 και 5 l) και σε συνθήκες καλλιέργειας που επάγουν αυξημένη παραγωγή EPS (διάρκεια 7 ημέρες, υπό ανάδευση >150rpm, θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζη - χλωριούχο αμμώνιο), όταν σημειώθηκε αύξηση της έκκρισης EPS στην υγρή φάση της καλλιέργειας μειώθηκε αισθητά η παραγωγή βιομάζας. Αλλά και κατά την καλλιέργεια του ασκομύκητα *Tuber sinense* σε ανακινούμενες φιάλες, οι Tang κ.α. (2008) διαπίστωσαν ότι η σακχαρόζη ευνόησε την παραγωγή βιομάζας, αλλά όχι την παραγωγή EPS. Ακόμη, ανάλογες περιπτώσεις αρνητικής σχέσης μεταξύ της παραγωγής βιομάζας και της συσσώρευσης εξωπολυσακχαριτών έχουν αναφερθεί και για τον *G. lucidum*, η παραγωγή βιοδραστικών EPS του οποίου έχει μελετηθεί εκτενώς.

Όσον αφορά στο υπόστρωμα που ευνοεί την παραγωγή EPS, είναι γενικά αποδεκτό ότι η γλυκόζη και οι οργανικές πηγές αζώτου (π.χ. πειπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, εκχύλισμα καλαμποκιού) ευνοούν την παραγωγή EPS στους ανώτερους μύκητες (Manu-Tawiah και Martin, 1987; Burns κ.α., 1994; Fasidi και Olorunmaiye, 1994; Wang κ.α., 2005; Gern κ.α., 2008; Elisashvili κ.α., 2009). Οι Zhou κ.α. (2009) ανέφεραν ότι ο συνδυασμός γλυκόζης και πειπτόνης είχε τη θετικότερη επίδραση στη παραγωγή EPS του *Grifola umbellata*, ενώ οι Meng κ.α. (2010) σε καλλιέργεια του *M. esculenta* παρέλαβαν τους περισσότερους EPS με γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης. Οι Fang και Zhong (2002α) από την άλλη, υποστήριξαν ότι συνδυασμός πειπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης βελτίωσε τη παραγωγικότητα των EPS στον *G. lucidum*. Ακόμα, οι Elisashvili κ.α. (2009) σε μελέτη τους σε οκτώ βασιδιομύκητες (μεταξύ των οποίων και οι *G. lucidum*, *P. dryinus* κ.α.) βρήκαν ότι οι γλυκόζη, μαλτόζη και μαννιτόλη ήταν οι πιο κατάλληλες πηγές άνθρακα για παραγωγή βιομάζας και EPS.

Πίνακας I.9 Μέθοδοι προσδιορισμού δομής πολυσακχαριτών (Varki κ.α., 1999; Zhang κ.α., 2007)

Πρωτοταγή δομικά χαρακτηριστικά	Μέθοδοι	Αποκτούμενες πληροφορίες
Σύνθεση μονοσακχαρίτη (φύση και αριθμός, απόλυτος σχηματισμός D ή L και μέγεθος του δακτυλίου της πυρανόζης ή της φουκόζης)	GLC - FID (αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '60)	Τύπος, ποσότητα και D ή L σχηματισμός του μονοσακχαρίτη
	GLC - MS (αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '70)	Τύπος και ποσότητα των μονοσακχαριτών
	HPLC (αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '80)	Τύπος και ποσότητα των μονοσακχαριτών
	HPLC - PAD (αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90)	Τύπος και ποσότητα των μονοσακχαριτών
Σχηματισμός (α,β) ανωμερών ανθράκων. Θέσεις γλυκοζιτικών δεσμών	IR	α ή β σχηματισμός
	NMR	α ή β σχηματισμός
	HPLC, HPCE	Παρουσία τμημάτων στους α ή β δεσμούς σε συγκεκριμένες θέσεις των αναζητούμενων σακχαριτών
	MS	Είδος δεσμού και θέσης μπορεί να διαφέρει
Αλληλουχία	NMR	Αλληλουχία βάσει προτύπων

Σχετικά με την παραλαβή και ποσοτικοποίηση των εξωπολυσακχαριτών, υπάρχουν πολλές κοινά αποδεκτές μέθοδοι (Beronic κ.α., 2003; Lavi κ.α., 2006; Pokhrel και Ohga, 2007; Parinutti, 2010). Θα πρέπει να τονισθεί ότι οι εξωπολυσακχαρίτες βρίσκονται στην υγρή φάση της καλλιέργειας και απομονώνονται με τρόπο παρόμοιο με εκείνον των ενδοπολυσακχαριτών, οι οποίοι βρίσκονται στη μυκηλιακή βιομάζα ή το καρπόσωμα. Έπειτα από την απομόνωση των πολυσακχαριτών, ο κύριος έμμεσος τρόπος ποσοτικού προσδιορισμού τους που εφαρμόζεται από τους περισσότερους ερευνητές (Yang και Liao, 1998; Fang κ.α., 2002; Tang και Zhong, 2003; Hsieh κ.α., 2006; Zhang κ.α., 2007; Xu κ.α., 2008), χωρίς να απαιτείται ειδικός εξοπλισμός είναι η μέθοδος Dubois (Dubois κ.α., 1956), ενώ η εναπομείνασα γλυκόζη υπολογίζεται με τη μέθοδο DNS (Miller, 1959). Για την αναλυτικότερη όμως μελέτη και την εξακρίβωση της δομής των πολυσακχαριτών χρειάζεται εφαρμογή και άλλων αναλυτικών μεθόδων, κάποιες από τις οποίες αναφέρονται στον παραπάνω Πίνακα I.9.

I.3.3. Παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων

Πολλά από τα μεταβολικά προϊόντα προερχόμενα από μακρομύκητες έχει βρεθεί ότι έχουν σημαντική διατροφική (π.χ. βιταμίνες, απαραίτητα λιπαρά οξέα κ.α.) αλλά και φαρμακευτική (π.χ. ορισμένοι πολυσακχαρίτες) αξία, δρώντας ευεργετικά για τον

ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, κάποια από τα ένζυμα που παράγονται από το μυκήλιο σε διάφορες ζυμώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον κλάδο της βιοτεχνολογίας κατά την επεξεργασία των αποβλήτων (βιομηχανικά απόβλητα και γεωργικά υπολείμματα), δρώντας κατά τρόπο οικονομικό και οικολογικό.

Οι Martirani κ.α. (1996) ανέπτυξαν τον βασιδιομύκητα *P. ostreatus* σε υγρή καλλιέργεια από εκχύλισμα πατάτας και ζύμης, απομόνωσαν το παραχθέν ένζυμο οξειδάση και το πρόσθεσαν σε υγρά απόβλητα ελαιουργείων (έως 20%, κ.β.) με σκοπό να μελετήσουν την ικανότητα του συγκεκριμένου μύκητα και ιδιαίτερα της οξειδάσης να αποτοξινώνει τέτοιου είδους υγρά απόβλητα, καθώς προκαλούν μεγάλο οικολογικό πρόβλημα λόγω της έντονης περιεκτικότητάς τους σε φαινολικά συστατικά. Η μελέτη αυτή βασίστηκε στο ότι ορισμένα από τα συγκεκριμένα φαινολικά συστατικά έχουν παρόμοια δομή με πολλά συστατικά της λιγνίνης, η οποία διασπάται μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων από ένζυμα μικρού βαθμού ειδίκευσης, π.χ. φαινολική οξειδάση και υπεροξειδάση, τα οποία παράγονται από λιγνινολυτικούς οργανισμούς, όπως είναι ο μύκητας *P. ostreatus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απομονωθείσα οξειδάση μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό την περιεκτικότητα των αποβλήτων σε φαινολικά, ενώ η άμεση προσθήκη του μικροοργανισμού στα απόβλητα ελαιουργείου οδήγησε σε μια λιγότερο σημαντική μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων με τη συνακόλουθη μείωση της περιεκτικότητας σε φαινόλες.

Οι Krzyczkowski κ.α. (2009) απομόνωσαν από καλλιέργειες βυθού και καθόρισαν ποιοτικά το υπεροξειδίο της εργοστερόλης διαφόρων ειδών μυκήτων (συμπεριλαμβανομένου και του μύκητα *M. esculenta*), καθώς η συγκεκριμένη ουσία έχει δειχθεί ότι διαθέτει έντονη βιολογική δραστηριότητα (αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση ενάντια του βακτηρίου *Bacillus subtilis*, του καρκινοσαρκώματος Walker και του αδενοκαρκινώματος στον ανθρώπινο μαστικό αδένα; Jong και Donovan, 1989, καθώς επίσης και άλλων ασθενειών). Επίσης, οι Nithan και Janardhanan (2008) εξέτασαν την αποτελεσματικότητα που είχε το εκχύλισμα αιθανόλης από αποξηραμένη μάζα του μύκητα *M. esculenta* στην προστασία των ποντικών από τη νεφρική τοξικότητα και πρότειναν την εν δυνάμει χρήση του για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης πάθησης. Οι Mau κ.α. (2004) μελέτησαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μυκηλίων τριών μακρομυκήτων (*G. frondosa*, *M. esculenta* και *Termitomyces albuminosus*) μέσω παραλαβής εκχυλισμάτων με τη χρήση μεθανόλης και συμπέραναν ότι οι ολικές φαινόλες αποτελούσαν τα κύρια φυσικά αντιοξειδωτικά συστατικά των μεθανολικών εκχυλισμάτων, ενώ η περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ και τοκοφερόλες ήταν παρόμοια στα τρία μυκήλια. Επιπρόσθετα, οι Wei κ.α. (2001) ανέπτυξαν το μακρομύκητα *M. esculenta* σε καλλιέργεια βυθού και παρέλαβαν γλυκοπρωτεΐνες με αντικαρκινική δράση.

Όσον αφορά στο μανιτάρι *G. lucidum*, εκτός από την παραγωγή πολυσακχαριτών, έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες σε υγρές καλλιέργειες για την παραγωγή γανοδερικών οξέων (Li κ.α., 2000; Tang και Zhong 2004; Xu κ.α., 2008β) ή για την ταυτόχρονη παραγωγή γανοδερικών οξέων και πολυσακχαριτών (Fang και Zhong, 2002α,β; Fang κ.α., 2002; Tang και Zhong, 2002; Tang και Zhong, 2003) σε κωνικές φιάλες ή βιοαντιδραστήρες, καθώς οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες θεωρείται ότι έχουν θεραπευτικές ιδιότητες. Οι Busmann και Berger (1994) ανάμεσα από δεκαπέντε είδη μακρομυκήτων που καλλιέργησαν σε καλλιέργειες βυθού, ανακάλυψαν ότι ο μύκητας *G. applanatum* αποτελεί έναν από τους τρεις πιο κατάλληλους μακρομύκητες για την παραγωγή αρωματικών ουσιών π.χ. μυρκενόλης (πιπτητικός οξυγονωμένος μεταβολίτης) από την πρόδρομη ουσία μυρκένη. Επιπρόσθετα, οι Jeurink κ.α. (2008) απομόνωσαν κλάσματα πρωτεΐνης και πολυσακχαριτών που υπήρχαν στα μυκίλια και στο υγρό θρεπτικό μέσο σε καλλιέργειες οχτώ διαφορετικών μακρομυκήτων (*Agaricus blazei*, *C. comatus*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *V. volvacea*, *L. edodes* και *P. ostreatus*) και μελέτησαν την ανοσορρυθμιστική τους ικανότητα. Οι πρωτεΐνες των *V. volvacea* και *G. lucidum* εμφάνισαν ανοσορρυθμιστική δράση, καθώς έδρασαν απευθείας στα μονοκύτταρα ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση των κυττάρων T.

Επιπλέον, πολλοί ερευνητές έχουν καλλιεργήσει σε στερεά υποστρώματα τον μακρομύκητα *L. edodes* για την παραλαβή ενός πολύ σημαντικού πολυσακχαρίτη, της λεντινάνης, ο οποίος διαθέτει αντικαρκινική, ανοσορρυθμιστική, αντιμικροβιακή και αντιική δράση (Maeda κ.α., 1997; Mizuno, 1999), λίγες αναφορές έχουν γίνει για την παραλαβή του συγκεκριμένου πολυσακχαρίτη από υγρές καλλιέργειες (π.χ. Hatvani, 2001).

Τέλος, για τον μύκητα *V. volvacea* αν και στερείται ενζύμων που απαιτούνται για την αποδόμηση της λιγνίνης από εμπλουτισμένα υποστρώματα π.χ. με πριονίδι (Buswell κ.α., 1996) είναι εξοπλισμένος με μια συστοιχία ενζύμων που είναι απαραίτητα για την υδρόλυση της κυτταρίνης όπως τα ένδο-1,4-β-γλυκανάση, κυτταροβιοϋδρολάση και β-γλυκοζιδάση και διαπιστώθηκε ότι μια σειρά από διαφορετικές ισομορφές αυτών των ενζύμων συντίθενται όταν ο μύκητας αναπτύσσεται σε περιβάλλον κυτταρινικού υποστρώματος τόσο σε υγρή καλλιέργεια στο εργαστήριο, όσο και σε συστήματα καλλιέργειας αντιπροσωπευτικών εκείνων που χρησιμοποιούνται για βιομηχανική καλλιέργεια (Cai κ.α., 1994, 1998, 1999). Παλιότερες βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεγαλύτερη ενεργότητα β-γλυκοζιδάσης στον μύκητα *V. volvacea* εντοπίζεται ενδοκυτταρικά ή συνδέεται με την εξωτερική επιφάνεια του τοιχώματος (Cai κ.α., 1999) και δύο β-γλυκοζιδάσες έχουν καθαριστεί και εν μέρει χαρακτηριστεί από εκχυλίσματα μυκηλίου, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε λιγνίνη (Cai κ.α., 1998). Επίσης, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην αποδόμηση της

λιγνίνης και που παράγεται από τον μύκητα *V. voluacea* είναι η Lac (Thurston, 1994). Ο μύκητας παρήγαγε πολλαπλές εξωκυτταρικές μορφές του ενζύμου μεγαλώνοντας, είτε σε υγρές καλλιέργειες σε καθορισμένο μέσο, με τη γλυκόζη να είναι η μοναδική πηγή άνθρακα, είτε σε υπόστρωμα υπολειμμάτων βάμβακος (κυτταρίνη). Στην υγρή καλλιέργεια, η σύνθεση του ενζύμου συσχετίστηκε με την εμφάνιση δευτερογενούς αύξησης στην οποία συνέβαλλαν θετικά ο χαλκός και διάφορα αρωματικά συστατικά. Σε στερεή καλλιέργεια, μόνο χαμηλά επίπεδα Lac ήταν ανιχνεύσιμα κατά την βλαστική φάση του μύκητα, αλλά η δραστηριότητα του ενζύμου αυξήθηκε κατακόρυφα κατά την έναρξη της καρποφορίας και κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των σπορίων.

I.4. ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

I.4.1. Γενικά για το μικροβιακό λίπος

Ως λιπίδια ονομάζονται οι εστέρες των λιπαρών οξέων με αλκοόλες. Τα λιπαρά οξέα δύνανται να είναι εστεροποιημένα είτε με τη γλυκερόλη οπότε τα λιπίδια που προκύπτουν ονομάζονται γλυκερίδια ή ακυλογλυκερόλες, είτε με τη σφινγκοσίνη οπότε προκύπτουν τα σφινγκολιπίδια, είτε τέλος με διάφορες λιπαρές αλκοόλες (συνήθως κετυλική, κερυλική και μυρικυλική αλκοόλη) οπότε προκύπτουν οι κηροί. Τα λιπίδια ανήκουν σε μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων, των οποίων κύριο χαρακτηριστικό είναι η ευχέρεια διάλυσής τους σε οργανικούς διαλύτες. Τέτοιοι διαλύτες μπορεί να είναι ο αιθέρας, το βενζόλιο, το εξάνιο, το χλωροφόρμιο και άλλα. Τα λιπίδια διακρίνονται σε απλά, σύνθετα λίπη, παράγωγα λιπίδια και διάφορες άλλες λιπαρές ύλες. Στα απλά λίπη εντάσσονται τα γλυκερίδια (ακυλογλυκερόλες), οι κηροί, τα αιθερογλυκερίδια και τα κετογλυκερίδια. Στα σύνθετα λίπη εντάσσονται τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια και άλλα σύνθετα λιπίδια. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν γλυκερίδια που περιέχουν στο μόριο τους χαρακτηριστικές ομάδες. Στα παράγωγα λιπίδια εντάσσονται τα λιπαρά οξέα, οι λιπαρές στερόλες, οι λιπαρές αλδεΐδες και υδρογονάνθρακες. Στα διάφορα λίπη εντάσσονται οι χρωστικές, οι σάπωνες με τα Na ή K, άλατα λιπαρών οξέων και πολυμερή προϊόντα οξείδωσης λιπών.

Αναλόγως με την κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών, αυτοί διακρίνονται στους «ελαιογόνους» και στους «μη-ελαιογόνους». Οι ελαιογόνοι (oleaginous) μικροοργανισμοί είναι αυτοί οι οποίοι δύνανται σε κάποια στιγμή του αυξητικού τους κύκλου και όταν οι συνθήκες αύξησης το επιτρέψουν, να συσσωρεύσουν λιπίδια εντός των κυττάρων (ή των μυκηλίων των) σε ποσά μεγαλύτερα από 20%, κ.β. επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (Ratledge και Wynn, 2002). Το ποσοστό λιπιδίων των ελαιογόνων μικροοργανισμών δύνανται να ανέλθει μέχρι και του ποσοστού του 80% κ.β. επί ξηράς μάζας (Papanikolaou και Aggelis, 2010;

2011α). Οι ζύμες ήταν οι πρώτοι μικροοργανισμοί που αναγνωρίστηκαν ως ικανοί για την συσσώρευση του μικροβιακού λίπους. Γενικά, έχει αναφερθεί ότι από τα 600 περίπου διαφορετικά είδη ζυμών, τουλάχιστον 25 μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστά μεγαλύτερα από το 20% κ.β. επί της ξηράς τους ουσίας, ενώ από τα 60.000 είδη μυκήτων, λιγότερα από 50 είδη μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος πάνω από το 25% κ.β. επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 1989). Επιπλέον, ορισμένοι μόνο μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος έως και 70% κ.β. επί της ξηράς ουσίας (Ratledge και Wynn, 2002). Κατόπιν όμως και άλλα είδη ικανά για λιποσυσσώρευση έχουν αναγνωρισθεί, μεταξύ των οποίων οι μύκητες και τα φύκη. Οι μύκητες, οι οποίοι αποτελούν ενδιαφέρον για την βιοτεχνολογική παραγωγή απαραίτητων λιπαρών οξέων είναι οι ζυγομύκητες οι οποίοι ανήκουν στην τάξη Mucorales (Čertík κ.α., 1997; Dyal κ.α., 2005). Το μεγάλο ενδιαφέρον για τα μικροβιακά λίπη έγκειται στην δυνατότητά τους να υποκαταστήσουν φυτικά ή ζωικά λίπη, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία σπάνια απαντώνται στη φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων, όπως το λίπος του κακάο.

Οι ανώτεροι μύκητες (μανιτάρια) περιέχουν μικρές ποσότητες λιπιδίων στο μυκήλιό τους (<10%, κ.β. - 'μη-ελαιογόνοι μικροοργανισμοί') και ακόμα μικρότερες στο καρπόσωμά τους. Το σύνολο των ολικών λιπιδίων των ανώτερων μυκήτων ποικίλει βάσει του είδους και μπορεί να κυμανθεί από 0,6 έως και (σε ορισμένες περιπτώσεις) 37,0% κ.β. επί ξηρού (Miric κ.α., 1985; Hiroi και Tsuyuki, 1988; Hong κ.α., 1988; Losel, 1988; Huang κ.α., 1999; Chang και Miles, 2004; Tsai κ.α., 2006). Πολλές ερευνητικές εργασίες υποστηρίζουν ότι η ποσότητα (σε % κ.β. επί ξηράς μικροβιακής μάζας), το ποσοστό (σε % κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων) των διαφόρων κλασμάτων (ουδέτερο κλάσμα NL, κλάσμα G+S, κλάσμα PL), καθώς επίσης και η σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων κατά τη διάρκεια της μικροβιακής αύξησης δεν είναι σταθερά, η δε φυσιολογική σημασία των μεταβολών αυτών μπορεί να συσχετιστεί με τις φάσεις της αύξησης του μικροοργανισμού και τις φυσικοχημικές μεταβολές του μέσου καλλιέργειας (π.χ. αλλαγές στο pH, στο ποσοστό κορεσμού σε οξυγόνο, κ.λ.π.). Στον Πίνακα Ι.10 παρατίθενται μερικές βιβλιογραφικές μελέτες ανώτερων μυκήτων και οι αντίστοιχες τιμές που σημειώθηκαν κατά τον υπολογισμό των ολικών τους λιπιδίων μυκηλίων ανεπτυγμένων σε διάφορα θρεπτικά μέσα και σε καρποσώματα. Το εν λόγω μικροβιακό λίπος μπορεί να περιέχει υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας.

Πίνακας Ι.10 Παραγωγή ολικών λιπιδίων (% κ.β.) από διάφορα στελέχη μακρομυκήτων

Είδος μύκητα	Μορφή μύκητα	Υπόστρωμα	Ολικά Λιπίδια (% κ.β.)	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>M. conica</i>	Καρπόσωμα		2,6	Kavishree κ.α., 2008
<i>M. hybrida</i>	Μυκήλιο	40 g/l γλυκόζη	6	Reusser κ.α., 1957
		60 g/l μελάσα	1,3	
		60 g/l γλυκόζη (16 C/N)	7,2	
		60 g/l γλυκόζη (19,7 C/N)	1,8	
<i>A. bisporus</i>	Καρπόσωμα	-	1,8	Rajarithnam και Sashirekha, 2003
<i>A. auricula</i>			1,5	
<i>F. velutipes</i>			1,9	
<i>L. edodes</i>			8	
<i>V. voluacea</i>	Καρπόσωμα	-	3	Huang κ.α., 1985
<i>A. bisporus</i>			3,1	
<i>A. auricula</i>			1,3	
<i>L. edodes</i>			1,3 - 3,1	
<i>P. sajor-caju</i> κ.α.			1,6 (0,6 - 3,1)	
Διάφορα είδη μανιταριών	Καρποσώματα από δάση	-	2 - 6	Kalac, 2009
<i>P. ostreatus</i>	Μυκήλιο	Τύρφη Γλυκόζη (45 g/l)	3,7	Manu-Tawiah και Martin, 1987
	Καρπόσωμα	-	3	
<i>G. applanatum</i>	Καρποσώματα από δάση	-	2,2	Pedneault κ.α., 2008
<i>M. esculenta</i>	Μυκήλιο	-	3,1	Tsai κ.α., 2006
<i>G. frondosa</i>			12,03	
<i>G. tsugae</i>	Μυκήλιο	-	25,0	Tseng κ.α., 2005
<i>V. esculenta</i>	Καρπόσωμα	-	22,0	Gbolagate κ.α., 2006
<i>Polyporus hirsutus</i>	Μυκήλιο	-	18,0	Sumner, 1973
<i>Calvatia caelata</i>			14,2-16,3	
<i>Antrodia camphorata</i>	Καρπόσωμα	-	32,0-37,0	Huang κ.α., 1999

Το κυρίαρχο κλάσμα των μικροβιακών αποθησαυριστικών λιπιδίων συνίσταται από τριγλυκερίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 55-80% (κ.β.) των συνολικών κυτταρικών ελαίων (Paranikolaou κ.α., 2001; Fakas κ.α., 2006, 2007). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι φυτικού τύπου, δηλαδή η θέση sn2 της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με ακόρεστο λιπαρό οξύ (Ratledge, 1994). Η συσσώρευση λίπους εξαρτάται, πέραν των φυλογενετικών χαρακτηριστικών του κάθε στελέχους, από την εξωκυτταρική διαθεσιμότητα σε άζωτο και το ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος από το μικροοργανισμό (Fakas, 2007; Paranikolaou κ.α., 2007). Ο καθοριστικότερος όμως παράγοντας για την λιπογένεση του μικροοργανισμού είναι ο λόγος άνθρακα/άζωτο (C/N) του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων προϋποθέτει υψηλό λόγο C/N και η συσσώρευση αυξάνει με αύξηση του λόγου C/N μέχρι ενός σημείου, πέραν του οποίου μειώνεται (Moreton, 1988). Η αύξηση του παραγόμενου λίπους μπορεί συνεπώς να επιτευχθεί με μείωση της συγκέντρωσης του

αζώτου (Reusser κ.α., 1957) ή με αύξηση της συγκέντρωσης σε άνθρακα. Καθώς τα χαρακτηριστικά της λιπογένεσης έχουν περιγραφεί για λίγους μύκητες και για ακόμα λιγότερους βασιδιομύκητες ή ασκομύκητες, όπου περιορίζονται κυρίως σε ανάλυση των καρποσωμάτων (Yokokawa, 1980; Nair κ.α., 1990), τα άρθρα που αναφέρονται στη παραγωγή λιπιδίων σε καλλιέργειες βυθού είναι περιορισμένου αριθμού.

Ακόμα, αν και οι μελέτες αναφορικά με την ποσότητα των λιπιδιακών κλάσεων (π.χ. NL, G+S, PL, κ.λ.π.), τις διαφοροποιήσεις τους σε συνάρτηση με το χρόνο, καθώς και τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα δίνουν πολλές πληροφορίες σε σχέση με τη φυσιολογία των μικροοργανισμών, οι εργασίες της βιβλιογραφίας οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στα παραπάνω θέματα είναι πράγματι περιορισμένες και στις περισσότερες από τις περιπτώσεις αναφέρονται σε μελέτες ελαιογόνων μικροοργανισμών (ζυγομύκητες, όπως *Cunninghamella echinulata*, ασκομύκητες όπως *Yarrowia lipolytica* κ.λ.π. - Fakas κ.α., 2006, 2007, 2008; Paranikolaou κ.α., 2009; Makri κ.α. 2010), ενώ λίγες αφορούν μακρομύκητες (Byrne and Brennan, 1975; Nair κ.α., 1989, 1990; Dembitsky κ.α., 1992; Hanuš κ.α., 2008; Pendneault κ.α., 2008). Ακόμα, περιορισμένες είναι και οι μελέτες που αφορούν τη σύσταση των φωσφολιπιδίων των ανώτερων μυκήτων σε κλάσεις. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα φωσφολιπίδια των μυκήτων αποτελούνται κυρίως από φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) (Wassef και Hendrix, 1977; Kemp κ.α., 1984), σε συγκεντρώσεις από 33 έως 50%, κ.β. και 13 και 37%, κ.β. αντίστοιχα, σε μικρότερο ποσοστό από την φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) (8-35%, κ.β.), ενώ η PS αποτελεί ένα μικρό μέρος των φωσφολιπιδίων (Paltauf και Schats, 1969; Goni κ.α., 1978). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η σύνθεση των PL των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ανάλογα τα γενετικά και διατροφικά χαρακτηριστικά τους (Margnall και Getz, 1973).

1.4.2. Είδη και χημική σύσταση λιπιδίων βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων

Το μικροβιακό λίπος είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό $\Delta^9,12\text{C}18:2$ και παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διαφέρουν σε σχέση με το λίπος φυτικής ή ζωικής προέλευσης, καθώς αυτό εμφανίζει διακυμάνσεις στην σύστασή του τόσο σε ακόρεστα όσο και σε κορεσμένα λιπαρά οξέα. Η χημική σύνθεση των μικροβιακών λιπιδίων είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τη διαφοροποίηση και την κατάταξη των βακτηρίων (Nichols κ.α., 1986; Samelis κ.α., 1998) και των ζυμών (Van der Westhuizen κ.α., 1987; Augustyn κ.α., 1990; Jeffery κ.α., 1997). Αντιθέτως, έρευνες που να ασχολούνται με τη ταξινόμηση των μυκηλιακών μυκήτων βάσει της σύστασής τους σε λιπαρά οξέα είναι λιγότερες (Jabaji-Hare, 1988; Stahl και Klug, 1996; Dimou κ.α., 2002; Wolf κ.α., 2002).

Η σύγχρονη γνώση για τη σύσταση των ανώτερων μυκήτων σε λιπαρά οξέα αφορά μελέτες στο καρπόσωμα ή/και το μυκήλιό τους τα οποία περιέχουν κυρίως παλμιτικό, ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ (Hadar και Cohen-Arazi, 1986; Bespalova κ.α., 2002; Dimou κ.α., 2002; Yilmaz κ.α., 2006; Pedneault κ.α., 2007; Kavishree κ.α., 2008; Kalac, 2009; André κ.α., 2010 κ.λ.π.), ενώ έχει αναφερθεί και η παρουσία μικρής ανθρακικής αλυσίδας ΛΟ στα μυκήλια εδώδιμων μυκήτων. Έτσι χαμηλομοριακά ΛΟ (C6:0-C12:0) ταυτοποιήθηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις (<0,5%, κ.β.) στα λιπίδια μυκήτων που ανήκουν στην οικογένεια Boletaceae (Pedneault κ.α. 2006, Yilmaz κ.α. 2006) ή στο γένος *Pleurotus* (Nair κ.α., 1989; Yilmaz κ.α., 2006; Pedneault κ.α., 2007). Από τον παρακάτω Πίνακα Ι.11, δίνονται ενδεικτικά μερικές βιβλιογραφικές μελέτες ανώτερων μυκήτων και οι αντίστοιχες τιμές που σημειώθηκαν για τη σύσταση των ολικών τους λιπιδίων σε διάφορα θρεπτικά μέσα και στο καρπόσωμα. Σύμφωνα με αυτόν, οι Bespalova κ.α. (2002) παρατήρησαν για το είδος *P. ostreatus* ότι από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα κυριάρχησε το λινελαϊκό οξύ (25,7-42,9% κ.β.) και από τα κορεσμένα το παλμιτικό οξύ (15,8-30,3%). Οι Dimou κ.α. (2002) μελέτησαν διάφορα είδη του γένους *Pleurotus* και ανέφεραν ότι στα λιπίδια που παράχθηκαν από τα είδη *Pleurotus abalonus*, *P. calyptratus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* και *P. sapidus*, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το λινελαϊκό (33-68%, κ.β.), ενώ το στέλεχος *P. eryngii* είχε ως κύριο λιπαρό οξύ το ελαϊκό (43-46%, κ.β.). Σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν, το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ βρέθηκαν σε σημαντικές συγκεντρώσεις (>12%, κ.β.), ενώ το στεατικό οξύ βρέθηκε σε χαμηλότερα ποσοστά. Παρομοίως, οι Manu-Tawiah και Martin (1987) παρατήρησαν ότι σε αναδευόμενη καλλιέργεια (150 g/m) με κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη (45 g/l) την 8^η ημέρα το κυρίαρχο λιπαρό οξύ για το είδος *P. ostreatus* ήταν το λινελαϊκό (43,5%, κ.β.) και ακολούθως τα ελαϊκό και παλμιτικό (18,4%, κ.β.). Για το είδος *F. velutipes*, σύμφωνα με τους Bespalova κ.α. (2002), από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα κυριάρχησε το λινελαϊκό οξύ (26,1%) και το ελαϊκό οξύ (34,7%) και από τα κορεσμένα το παλμιτικό οξύ (18,3%) και το στεατικό οξύ (5,8%, κ.β.). Σχετικά με το είδος *L. edodes*, τα κύρια λιπαρά οξέα που ανίχνευσαν οι Kitzberger κ.α. (2009) ήταν το λινελαϊκό και το παλμιτικό οξύ. Ακολούθησε το παλμιτικό οξύ με εξίσου σημαντικό ποσοστό και σε μικρότερες συνήθως συγκεντρώσεις το ελαϊκό οξύ. Όσον αφορά στο στεατικό οξύ, αυτό εξαρτάται αυστηρά από το στέλεχος του μύκητα. Επιπρόσθετα, οι Yilmaz κ.α. (2006) παρέλαβαν τα λιπαρά οξέα των ειδών *A. bisporus*, *Agaricus campestris*, *Boletus edulis*, *C. comatus*, *P. ostreatus*, *Oudemansiella radicata* και *Armillaria mellea* με τη χρήση μίγματος διαλυτών χλωροφόρμιου/μεθανόλης (2:1) και τα προσδιόρισαν ποσοτικά και ποιοτικά μέσω της διαδικασίας της μεθυλεστεροποίησης και τη χρήση αερίου χρωματογράφου. Η ανάλυση έγινε στα καρποσώματα και στο στίπο

Πίνακας I.11 Σύσταση λίπους σε κύρια λιπαρά οξέα (% κ.β.) διαφόρων ειδών μακρομυκήτων

Είδος μύκητα	Μορφή μύκητα/ Συνθήκες καλλιέργειας	Ολικά λιπίδια (% κ.β.)	C 16:0 Παλμιτικό οξύ (%)	Δ^9 C18:1 Ελαϊκό οξύ (%)	$\Delta^9,12$ C18:2 Λινελαϊκό οξύ (%)	Κορεσμένα Λ.Ο. (% κ.β.)	Ακόρεστα Λ.Ο. (% κ.β.)	U.I.	Βιβλιογραφική αναφορά
Μανιτάρια (π.χ. <i>M. conica</i> , <i>P. sajor-caju</i>)	Καρποσώματα από δάση	0,6-4,7 (2,6)	4,6 - 24,7 (8,5)	(11,3)	(68,6)	13,0 - 48,0 (18,5)	52,0 - 87,0 (81,5)	-	Kavishree κ.α., 2008
<i>P. sajor-caju</i>	Μυκήλιο, 10 g/l Glc, 30 C/N	5,7	24,0	8,0	61,0	25,0	73,0	1,3	Nair κ.α., 1989
<i>M. esculenta</i>	Καρποσώματα από δάση	-	11,0	24,1	12,6	-	-	-	Řezanka κ.α., 1999
<i>P. ostreatus</i>	Μυκήλιο, Τύρφη 45 g/l Glc (150 rpm, 28 °C, pH=5, 8 ημ.)	3,7 3,0	17,0 18,4	18,6 18,4	44,9 43,2	-	-	-	Manu-Tawiah και Martin, 1987
	Καρπόσωμα	2,2	16,6	15,2	36,3	-	-	-	
<i>F. velutipes</i>	Μυκήλιο σε καλλιέργεια βυθού	-	13,3	0,7	4,7	18,4	5,9	-	Bespalova κ.α., 2002
	8 C/N	-	18,3	34,7	26,1	25,4	61,5	-	
	15 C/N	-	12,2	9,9	16,0	17,6	27,4	-	
<i>A. bisporus</i> <i>P. ostreatus</i>	Καρποσώματα από δάση	-	-	-	-	27,6 20,2	47,2 65,0	-	Yilmaz κ.α., 2006
	Καρποσώματα από δάση	3,1	-	-	-	36,0	63,0	1,33	
<i>P. ostreatus</i>	Μυκήλια		13,0 - 22,78	13,0-34,0	42,76-65,48				Dimou κ.α., 2002
<i>P. pulmonarius</i>			12,29 - 23,0	13,0-17,0	45,42-59,19				
<i>P. ostreatus</i>	Καρπόσωμα (27 °C)	4,2	13,0	9,5	68,0	26,5	80,0	1,80	Pedneault κ.α., 2008

των συγκεκριμένων στελεχών και η σύνθεσή τους σε λιπαρά οξέα διέφερε από είδος σε είδος. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλα τα στελέχη ήταν το λινελαϊκό (C18:2) και κυμαινόταν από 13–59%, κ.β.. Τα λοιπά βασικά λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν ήταν το παλμιτικό, το ελαϊκό, το στεατικό και το αραχιδονικό. Το λινολενικό οξύ ανιχνεύθηκε σε πολύ χαμηλά ποσοστά σε όλα τα στελέχη. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ανάλυση έδειξε ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκονταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα κορεσμένα.

I.4.3. Διατροφικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των μυκητιακών λιπιδίων

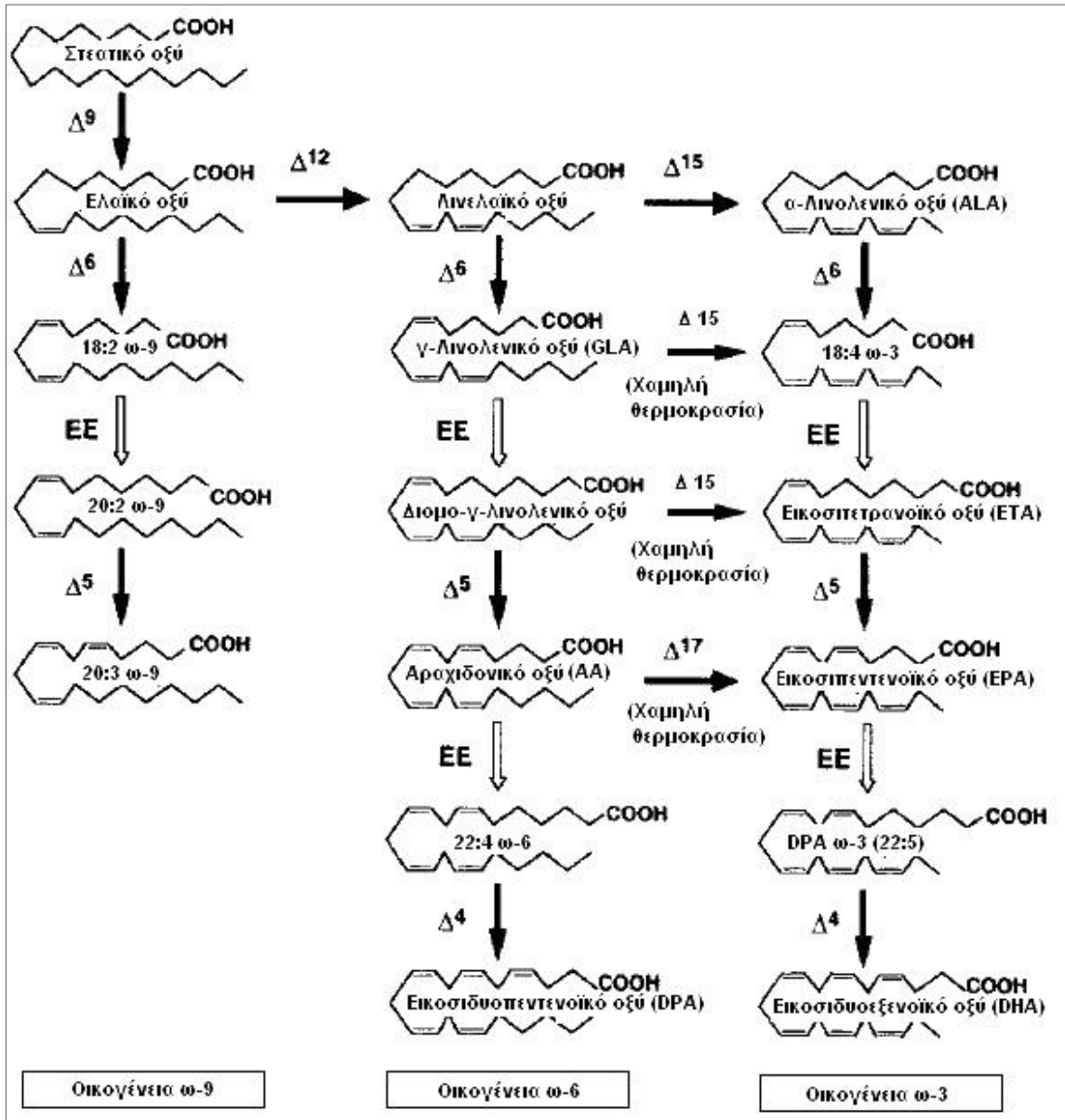
Αναλόγως με την κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών σε ελαιογόνους και μη-ελαιογόνους, τα λιπίδια δύνανται να αποτελούν ένα σημαντικό ή λιγότερο σημαντικό από πλευράς ποσότητας μέρος του μικροβιακού κυττάρου. Παρά τις διαφοροποιήσεις αυτές στην ποσότητα, η μελέτη των λιπιδίων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της φυσιολογίας και βιοχημείας των μικροοργανισμών λόγω των πολλαπλών και εξόχως ουσιωδών και διαφορετικών ρόλων τους οποίους δύνανται να παίξουν τα λιπίδια στο μικροβιακό κύτταρο. Ειδικότερα, τα λιπίδια των μυκήτων αποτελούν δομικούς λίθους των μεμβρανών και του κυτταρικού τοιχώματος, (σε πολλές περιπτώσεις) ενδοκυτταρικά αποθησαυριστικά μόρια και (σε λιγότερες περιπτώσεις) εξωκυτταρικά μεταβολικά προϊόντα (Losel, 1988; Ratledge, 1994, 1997; Fakas κ.α., 2009α; Papanikolaou και Aggelis, 2010, 2011α,β), η δε μελέτη τους είναι σημαντική τόσο για θέματα βασικής έρευνας όσο και για τις ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές που έχουν τα λιπίδια αυτά.

Βασική δομική μονάδα των λιπιδίων συνιστούν τα λιπαρά οξέα, τα οποία κατ' ουσία είναι οργανικά οξέα με μακρά ανθρακική αλυσίδα. Τα λιπαρά οξέα δύνανται να περιέχουν (ή όχι) διπλούς δεσμούς επί της αλειφατικής αλυσίδας τους, ενώ τα φυσικώς απαντώμενα λιπαρά οξέα έχουν διαμόρφωση *all-cis*. Λιπαρά οξέα περιέχοντα 2 διπλούς δεσμούς (ή περισσότερο) επί του μορίου τους καλούνται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids – PUFAs) και ανάλογα με την θέση του πρώτου διπλού δεσμού του μεθυλικού άκρου του μορίου, τα πολυακόρεστα λιπαρά αυτά οξέα διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες (ω -9, ω -7, ω -6 και ω -3). Μεταξύ αυτών, τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στις ω -6 και ω -3 ομάδες αποτελούν τα λεγόμενα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential fatty acids – EFAs). Όλα τα απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πολυακόρεστα και δεν μπορούν να συντεθούν *de novo* στον ανθρώπινο οργανισμό, ως εκ τούτου η πρόσληψή τους γίνεται μέσω της διατροφής. Τέτοια λιπαρά οξέα, με την αυστηρή έννοια του όρου, είναι το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2, ή C18:2 ω -6) και το α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3, ή C18:3 ω -3). Τα υπόλοιπα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ομάδων ω -3 και ω -6 προκύπτουν είτε ως συνέπεια αντιδράσεων επιμήκυνσης και

αφυδρογόνωσης των απαραίτητων λιπαρών οξέων, είτε παραλαμβάνονται απευθείας μέσω της διατροφής (Čertík και Shimizu, 1999; Papanikolaou και Aggelis, 2010, 2011α,β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα λιπίδια των μυκήτων αποτελούν εξαιρετικές πηγές ω-6 και ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, δεδομένου του γεγονότος ότι η βιοσυνθετική ικανότητα των μυκήτων είναι τέτοια που τους επιτρέπει να συνθέτουν μια ποικιλία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ενίοτε σε μεγάλες ποσότητες (π.χ. ύπαρξη αποκορεσμάσων δυνάμενη για τη *de novo* εισαγωγή διπλών δεσμών μετά από το 9^ο άτομο άνθρακα των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων σε αντίθεση με τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού), τα δε λιπίδια αυτά γενικώς είναι πιο ακόρεστα σε σχέση με τα αντίστοιχα τα οποία παράγονται από τις ζύμες (Fakas κ.α., 2009α; Papanikolaou και Aggelis, 2011α).

Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs) αποτελούν στοιχεία-κλειδιά και επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στην φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Πέρα από το ρόλο τους ως αποθησαυριστικά μόρια για παροχή ενέργειας (μέσω της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων), τα λιπαρά οξέα καθώς και οι μεταβολίτες τους αποτελούν δομικά τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων τη ρευστότητα και την σταθερότητα αυτής. Ακόμη, τα λιπαρά οξέα ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων, επηρεάζοντας την βιοσύνθεση διαφόρων ενζύμων καθώς επίσης και τη μεταφορά και σύνθεση της χοληστερόλης (Horrobin, 1992). Ωστόσο, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον ρόλο αυτών των μακρομορίων εστιάζεται στην ιδιότητά τους ως προάγγελοι για τη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους βραχύβιων ρυθμιστικών μορίων του οργανισμού, όπως προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, θρομβοξάνες και υδρόξυ-λιπαρά οξέα, ουσίες γνωστές και ως εικοσανοειδή, υπεύθυνες για την ρύθμιση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών (Horrobin, 1992; Čertík και Shimizu, 1999). Συγκεκριμένα, το λινελαϊκό οξύ (LA, C18:2, ω-6) αποτελεί πρόδρομη ένωση για την σύνθεση των γ-λινολενικού (GLA, C18:3, ω-6) και αραχιδονικού οξέος (AA, C20:4, ω-6), απ' όπου προέρχονται οι προσταγλανδίνες, ενώ το α-λινολενικό οξύ (ALA, C18:3, ω-3) αποτελεί τον προάγγελο για τη σύνθεση των εικοσιπεντενοϊκού (EPA, C20:5, ω-3) και εικοσιδυοεξενοϊκού οξέος (DHA, C22:6, ω-3) (Tariero κ.α., 2002). Η βάση της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι το στεατικό οξύ (C18:0), οι δε βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων χωρούν κατά το ακόλουθο Σχήμα I.1.

Τα λιπαρά οξέα των εδώδιμων μανιταριών είναι μεγάλου ενδιαφέροντος καθώς μπορούν να συμβάλουν θετικά στην ανθρώπινη διατροφή, κυρίως κατά το βασικό μεταβολισμό του ανθρώπου. Το λινελαϊκό ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3), καθώς, επίσης και οι μακριές αλυσίδες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων θεωρείται ότι έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία (Parikh κ.α., 2005).



Σχήμα Ι.1 Βιοσυνθετική οδός της γένεσης των *de novo* πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) (Čertík και Shimizu, 1999)

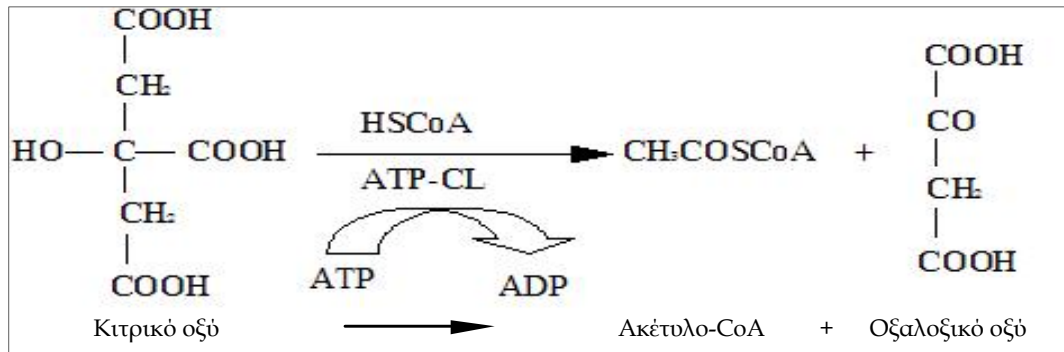
Χωρίς την παρουσία των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων (απαραίτητα λιπαρά οξέα), ο ανθρώπινος οργανισμός δε θα μπορούσε να επιτελέσει σημαντικές λειτουργίες για τη φυσιολογία του. Η ανεπάρκεια σε απαραίτητα λιπαρά οξέα και κατ'επέκταση η ελλιπής σύνθεση εικοσανοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό οδηγεί σε ανωμαλίες του δέρματος, του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης και σε καρδιαγγειακά, νεφρικά, ενδοκρινολογικά και αναπνευστικά προβλήματα (Čertík και Shimizu, 1999). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία δεν είναι απαραίτητα δεδομένου ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να βιοσυντεθούν από τα υγιή άτομα (π.χ. γ-λινολενικό οξύ $\Delta^{6,9,12}C18:3$), θεωρούνται παρόλα αυτά μεγάλης φαρμακευτικής, εμπορικής και βιολογικής

σημασίας, αφού σε πολλές περιπτώσεις (π.χ. λόγω stress, υπερλιπιδαιμίας, φτωχής διατροφής, κατάχρησης αλκοόλ κ.λ.π.) ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα βιοσυνθέσει και επομένως πρέπει να ληφθούν μέσω της τροφής.

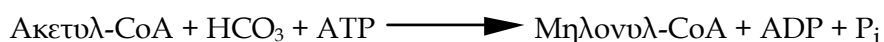
I.4.4. Η βιοσύνθεση των μικροβιακών λιπιδίων

Ως υλικό εκκίνησης για τη *de novo* βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, χρησιμοποιείται το ακέτυλο-CoA, το οποίο με αντιδράσεις κατ' ουσίαν αντίστροφες αυτών της β-οξειδωσης δημιουργεί τα ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα, τα οποία κατόπιν θα εστεροποιηθούν δίδοντας γένεση στα ενδοκυτταρικά τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, κ.λ.π.. Η προέλευση του ακέτυλο-CoA είναι ξεχωριστή αναλόγως με το γεγονός αν ο μικροοργανισμός είναι ελαιογόνος ή όχι. Το ακέτυλο-CoA, το οποίο δημιουργείται μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, είτε θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, είτε το υλικό δόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Όμως, η σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδιακών δομών δεν πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο, αλλά στο κυτταρόπλασμα, ως εκ τούτου το ακέτυλο-CoA θα πρέπει εκ νέου να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Η μεμβράνη των μιτοχονδρίων δεν είναι περατή από το ακέτυλο-CoA, το οποίο εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια σε σχετικά μικρά ποσά υπό την μορφή της ακέτυλο-καρνιτίνης και μόνο για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge και Gilbert, 1985; Davies και Holdsworth, 1992). Από την άλλη πλευρά, μεγάλες ποσότητες ακέτυλο-CoA οφείλουν να ευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, προκείμενου να μετατραπούν σε λιπαρά οξέα στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Στην πραγματικότητα, για να συμβεί κάτι τέτοιο, η αύξηση θα πρέπει να παύσει να είναι ισόρροπη και ικανός περιορισμός στο εξωκυτταρικό (και κατόπιν ενδοκυτταρικό) άζωτο θα πρέπει να επισυμβεί. Έτσι, αρχικά παρατηρείται πτώση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της μονο-φωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine monophosphate - AMP) που οφείλεται στο ένζυμο απαμινάση της AMP, της οποίας η ενεργότητα αυξάνει με την εξάντληση του αζώτου. Η αντίδραση αυτή ($AMP \rightarrow IMP + NH_4^+$) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ποσοτήτων αζώτου που θα χρησιμοποιηθούν στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοξέων. Η μείωση της συγκέντρωσης του AMP καταστέλλει τη δράση των ενζύμων 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6-Phosphorofructokinase - 6-PFK), πυροσταφυλική κινάση (Pyruvate kinase - PK) και NAD⁻ (και σε μερικές περιπτώσεις επίσης και NADP⁻) ισοκιτρική αφυδρογονάση (NAD-ICDH και NADP-ICDH) (Galiotou-Panayotou κ.α., 1998; Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Στην περίπτωση του περιορισμού της ενεργότητας της 6-PFK παρατηρείται συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών. Από την άλλη πλευρά, η μείωση της

ενεργότητας των NAD-ICDH και NADP-ICDH προκαλεί αναστολή στη λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, με το συσσωρευμένο στα μιτοχόνδρια κιτρικό οξύ να εξέρχεται του μιτοχονδρίου και να αποτελεί υπόστρωμα στο οποίο πραγματοποιείται η πιο κάτω, χαρακτηριστική της σύνθεσης λιπιδίων αντίδραση, όπου σε μεγάλα ποσά συντίθεται ακέτυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα των (κυρίως) ελαιογόνων μικροοργανισμών (Ratledge, 1994, 1997; Papanikolaou και Aggelis, 2011α):

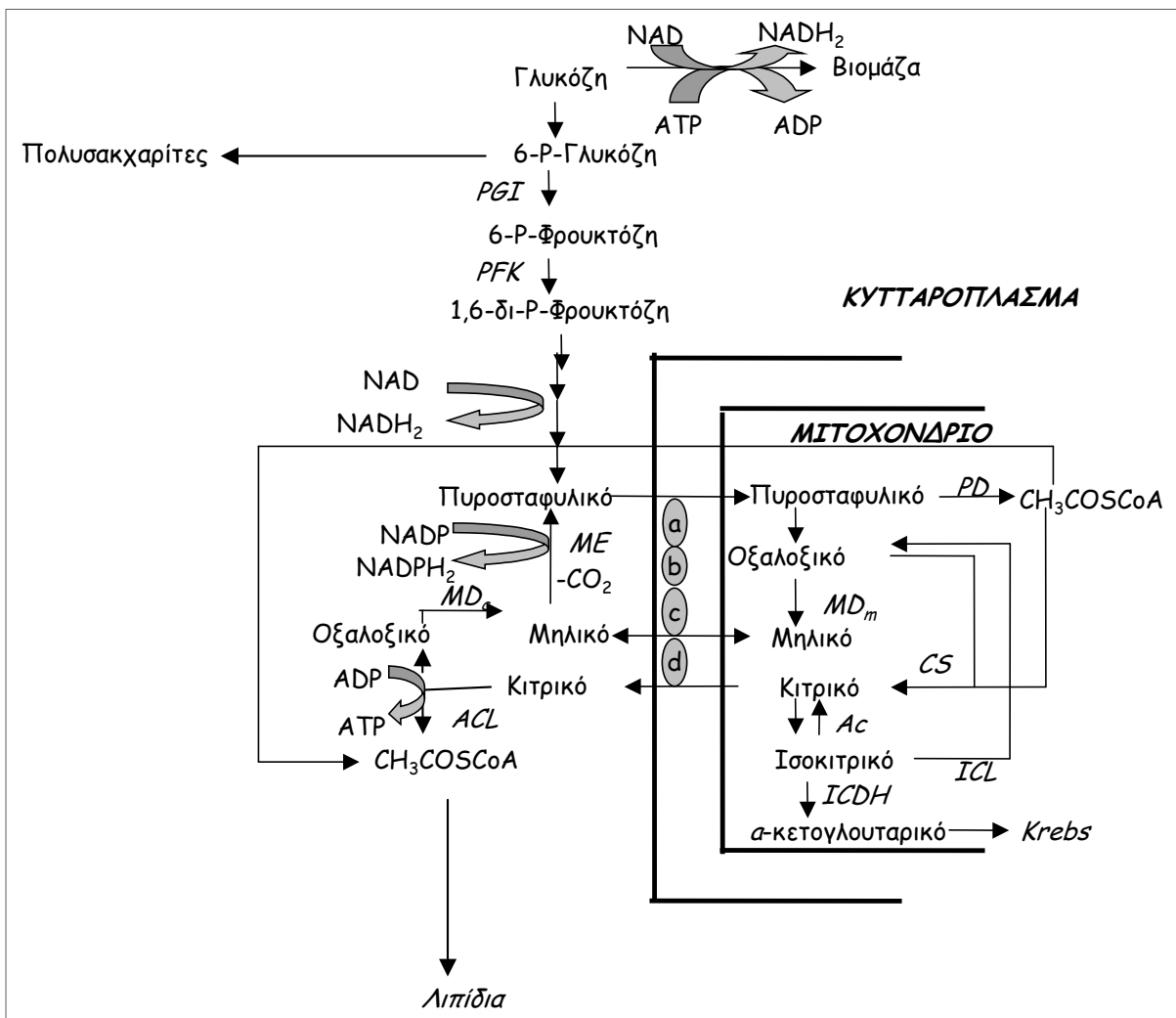


Η ανωτέρω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση (ACL) και (κυρίως στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς) με αυτό τον τρόπο παράγεται στο κυτταρόπλασμα σε μεγάλες ποσότητες το ακέτυλο-CoA, το οποίο θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης για τη σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων και συνακολούθως των τριγλυκεριδίων στους διαφόρους (ανώτερους και κατώτερους) οργανισμούς μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, οι οποίες είναι περίπου αντίστροφες αυτών της β-οξειδωσης, καταλυόμενων από το ενζυμικό σύμπλοκο της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS - Fatty Acid Synthetase) (Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ένζυμο ACL μπορεί να ευρίσκεται και σε μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (ειδικά μύκητες; Wynne κ.α., 1998), πλην όμως συνήθως δεν εκφράζεται σε αυτούς. Σε κάθε περίπτωση και ανεξαρτήτως του τρόπου προέλευσης του ακέτυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ξεκινά με την καρβοξυλίωση του ακέτυλο-CoA προς μηλονυλο-CoA απ' την καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (Acetyl-CoA carboxylase-ACC). Η αντίδραση αυτή δεν είναι αντιστρεπτή και αποτελεί το καθοριστικό βήμα της βιοσυνθετικής οδού (Ratledge, 1994; Papanikolaou και Aggelis, 2011α):



Η αντίδραση αυτή ενεργοποιείται με την παρουσία του κιτρικού οξέος για την ελαιογόνο ζύμη *Candida* sp. 107, αλλά όχι για τη μη-ελαιογόνο *Candida utilis*, ενώ με την απουσία του κιτρικού οξέος το ανωτέρω ένζυμο υπάρχει ως ανενεργός πρωτεΐνη με M.B.

$2,4 \times 10^5$ daltons, ενώ η παρουσία του κιτρικού οξέος επάγει τη συσσωμάτωση των ενζυμικών μονομερών σε ένα πολυενζυμικό ενεργό σύστημα με M.B. $7-9 \times 10^6$ daltons (Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Στη συνέχεια, οι ακυλο-μεταφοράσες μεταφέρουν ακετυλο-ομάδες και μηλονυλο-ομάδες σε μια ακυλο-φέρουσα πρωτεΐνη (Acyl carrier protein-ACP). Έπειτα, το ενζυμικό σύστημα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (Fatty acid synthetase-FAS) προσθέτει διαδοχικά δυο άτομα άνθρακα στη μηλονυλο-ACP, έως ότου το μήκος της αλυσίδας φτάσει τα 16 άτομα άνθρακα. Η τελική αντίδραση διαφέρει ανάλογα με το μικροοργανισμό



Σχήμα I.2 Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια. Η ροή άνθρακα με το ισομερές πάχος των βελών φαίνεται ισοσκελισμένη τόσο προς τα ενδοκυτταρικά λιπίδια, όσο και προς τα ενδοκυτταρικά πολυσακχαρίδια, όσο και προς τον κύκλο του Krebs. Ένζυμα: ACL: ATP-κιτρική λυάση, PGI: Ισομεράση της φωσφορογλυκόζης, PFK: Φωσφοροφρουκτοκινάση, ICDH: Ισοκιτρική αφυδρογονάση, PD: Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, CS: Κιτρική συνθάση, ICL: Ισοκιτρική λυάση (προσαρμογή σχημάτων από τους Zhong και Tang, 2004; Papanikolaou και Aggelis, 2011α)

και περιλαμβάνει είτε τη μεταφορά της ακυλο-ομάδας απ' την ACP στο CoA ή την υδρόλυση της ακυλο-ACP προς ελεύθερο λιπαρό οξύ. Η στοιχειομετρία της σύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι (Papanikolaou και Aggelis, 2011α):



Τα διάφορα συμβαίνουντα (σύνθεση πολυσακχαριτών, σύνθεση λιπιδίων μέσω ACL για τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σύνθεση λιπιδίων μέσω απ' ευθείας συμπύκνωσης του ακέτυλο-CoA για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς) σε επίπεδο διάμεσου μεταβολισμού παρουσιάζεται στο παραπάνω Σχήμα I.2.

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της βιοχημικής και φυσιολογικής συμπεριφοράς σε διάφορα στελέχη εδώδιμων και φαρμακευτικών μακρομυκήτων και συγκεκριμένα η διερεύνηση παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης, η παραγωγή της κυτταρικής μάζας, η κατανάλωση υποστρωμάτων, η συσσώρευση και σε κάποιες περιπτώσεις η αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών υλικών όπως πολυσακχαριτών και λιπιδίων, η έκκριση εξωπολυσακχαριτών, η σύσταση σε λιπαρά οξέα του ενδοκυτταρικού λίπους, σε αρκετές περιπτώσεις η ενδεδλεχής μελέτη των διαφόρων λιπιδιακών κλασμάτων, καθώς και η σύσταση σε μονοσακχαρίτες των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών.

Μεγάλη έμφαση δόθηκε στον μακρομύκητα *V. voluacea*, του οποίου μελετήθηκαν ενδεδλεχώς η φυσιολογία θρέψης και η σύσταση των ολικών λιπιδίων του σε λιπαρά οξέα, η σύσταση των ουδετέρων και πολικών (φωσφο-, γλυκο-, σφιγκο-λιπιδίων) κλασμάτων και οι κλάσεις των φωσφολιπιδίων του, καθώς υπάρχει απουσία βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με το θέμα αυτό. Ακόμα, παρά το γεγονός ότι έχουν δημοσιευτεί αρκετές εργασίες σχετικές με τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες του εν λόγω μακρομύκητα, η σύστασή τους κατά τη καλλιέργειά του σε υγρές ζυμώσεις δεν έχει μελετηθεί.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Στα εδάφια που ακολουθούν, περιγράφονται η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την μικροβιακή αύξηση, το βιολογικό υλικό, καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Ακόμη, θα λάβει χώρα εκτενής αναφορά στα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό τόσο της μικροβιακής αύξησης, όσο και των μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων. Τέλος, θα παρατεθούν πληροφορίες αναφορικά με τις συνθήκες λειτουργίας των διαφόρων αναλυτικών συσκευών και του λοιπού εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της ακόλουθης διδακτορικής διατριβής έλαβαν χώρα ως εξής:

- α) οι υγρές και στερεές ζυμώσεις των μακρομυκήτων και ο προσδιορισμός της βιομάζας και των μεταβολικών προϊόντων τους πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΕΘΙΑΓΕ (νυν ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ). Το εν λόγω εργαστήριο αρχικά ανήκε στο Ινστιτούτο Γεωργικών Μηχανών και Κατασκευών (ΙΓΕΜΚ) και σήμερα ανήκει στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΙΤΕΓΕΠ),
- β) οι αναλύσεις των λιπιδίων που αφορούσαν τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα (χρήση GC και GC-MC) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ,
- γ) οι αναλύσεις της σύστασης των πολυσακχαριτών σε απλά σάκχαρα (χρήση HPLC) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ
- δ) οι αναλύσεις λιπιδιακών κλάσεων των φωσφολιπιδίων (χρήση HPLC) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

II.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 14 στελέχη εδώδιμων και φαρμακευτικών μυκήτων, τα οποία ανήκουν στις κλάσεις των βασιδιομυκήτων (12) και των ασκομυκήτων (2) και αναφέρονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας II.1). Τα εν λόγω στελέχη διατηρούνται στη τράπεζα καλλιεργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του Ι.ΤΕ.ΓΕ.Π./ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ και φέρουν κωδικό αριθμό καταχώρισης AMRL (Athens Mushroom Research Laboratory). Όλες οι καθαρές καλλιέργειες των στελεχών αυτών έχουν

Πίνακας II.1 Είδη μακρομυκήτων που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία

Κλάση/Τάξη	Είδη μακρομυκήτων	Κωδικός AMRL*	Προέλευση
Ασκομύκητες			
Pezizales	<i>Morchella esculenta</i> (L.) Pers.	36	Αυτοφύες, Ελλάδα (ATCC** 200336)
	<i>M. elata</i> Fr.	63	Αυτοφύες, Ελλάδα (ATCC 200328)
Βασιδιομύκητες			
Polyporales	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	330	Εμπορικό, Ταϊβάν
	<i>G. applanatum</i> (Pers.) Pat.	341	Αυτοφύες, Ελλάδα
Auriculariales	<i>Auricularia auricula-judae</i> (Bull.) Quéf.	111	Εμπορικό, Κίνα
Agaricales	<i>Agrocybe aegerita</i> (V. Bring.) Singer	104	Εμπορικό, Γαλλία
	[= <i>Agrocybe cylindracea</i> (DC.) Maire]		
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	135	Εμπορικό, Ιταλία
	<i>P. pulmonarius</i> (Fr.) Quéf.	177	Εμπορικό, Γαλλία
	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	271	Εμπορικό, Κίνα
	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	121	Εμπορικό, Γαλλία
	<i>Volvariella volvacea</i> (Bull.:Fr.) Singer	188	Εμπορικό, Ταϊβάν
	<i>V. volvacea</i> (Bull.:Fr.) Singer	190	Εμπορικό, Ταϊβάν
	<i>V. volvacea</i> (Bull.:Fr.) Singer	191	Εμπορικό, Ταϊβάν
	<i>V. volvacea</i> (Bull.:Fr.) Singer	192	Εμπορικό, Ταϊβάν

*AMRL: Athens Mushroom Research Laboratory

**ATCC: American Type Culture Collection

αναπτυχθεί σε Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Darmstadt, Germany) μετά από επώαση 5-10 ημερών στους 25±0,1 °C (32 °C για τον *V. volvacea*) και διατηρούνται σε σωλήνες με κεκλιμένο PDA στους 2±0,1 °C (εκτός από τα στελέχη του *V. volvacea* που διατηρούνταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας πραγματοποιείται ανανέωση των στελεχών, ώστε οι καλλιέργειες να έχουν ηλικία 5-10 ημερών ανάλογα με τον μύκητα.

II.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, εντός κωνικών φιαλών Erlenmeyer των 100 ml, πληρωμένες με 30±1 ml θρεπτικό μέσο. Στον Πίνακα II.2 αναφέρεται η σύνθεση των τεσσάρων υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν αρχικά για την ανάπτυξη των 14 μακρομυκήτων, ενώ στα επόμενα πειράματα βάσει των αρχικών αποτελεσμάτων της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής σακχάρων ή/και λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο από τα τέσσερα αυτά υποστρώματα (υπόστρωμα GPYS, Πίνακας II.2).

Πίνακας II.2 Σύνθεση των τεσσάρων θρεπτικών μέσων (GPY, GPYS, GYS, MCM) που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των 14 μακρομυκήτων της παρούσας μελέτης

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/l)			
	GPY ¹	GPYS ²	GYS ³	MCM ⁴
Γλυκόζη	30,0	30,0	30,0	30,0
Εκχύλισμα Ζύμης	3,0	2,5	3,0	3,0
Πεπτόνη	3,0	3,5	-	3,0
CaCO ₃	1,0	1,0	1,0	1,0
KH ₂ PO ₄	-	1,0	7,0	0,46
K ₂ HPO ₄	-	-	2,5	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,5	1,5	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	1,3	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	0,3	0,15	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	0,04	0,06	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,02	0,02	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	0,08	0,15	-

¹Glucose, peptone, yeast extract

²Glucose, peptone, yeast extract, supplements

³Glucose, yeast extract, supplements

⁴Mushroom complete medium

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα χημικώς καθαρή γλυκόζη [D(+)-glucose, Alpha Aesar, Karlsruhe, Germany] και σε διάφορες αναλογίες προστίθετο εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Fluka, Steinheim, Germany) και/ή πεπτόνη (Merck, Darmstadt, Germany). Τα συστατικά αυτά περιείχαν επίσης ορισμένη ποσότητα οργανικού αζώτου και άνθρακα. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα ζύμης περιείχε 11% (κ.β.) άζωτο και 10% (κ.β.) άνθρακα, ενώ οι συγκεντρώσεις του αζώτου και του άνθρακα στην πεπτόνη ήταν 11% και 35% (κ.β.) αντίστοιχα. Επιπλέον, όπως φαίνεται στον Πίνακα II.2 σε κάποια θρεπτικά μέσα μαζί με τα τρία παραπάνω βασικά συστατικά, προστίθετο και ένα μίγμα αλάτων, μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν η πεπτόνη (Serva, Heidelberg, Germany), το θειικό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄, Merck] και το εκχύλισμα ζύμης (Serva), ο δε λόγος C/N των μέσων κυμαινόνταν στο 20. Το pH των μέσων καλλιέργειας ρυθμίστηκε μετά την αποστείρωση στο 6,2±0,2 με την προσθήκη CaCO₃ (Merck). Οι τελικές τιμές pH μετά από 12 ή 16 ημέρες καλλιέργειας κυμάνθηκαν στο 5,6-7,2 ανάλογα τον μύκητα και το υπόστρωμα.

II.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΒΥΘΟΥ ΣΕ ΦΙΑΛΕΣ

Στα πειράματα της παρούσας εργασίας που αφορούσαν στην επίδραση των πηγών άνθρακα στη κινητική παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και σακχάρων του *V. voluacea* 190 ως κύριες πηγές άνθρακα δοκιμάστηκαν έξι διαφορετικά σάκχαρα, τρεις μονοσακχαρίτες

(γλυκόζη/Alpha Aesar, φρουκτόζη, ξυλόζη/Merck), δύο δισακχαρίτες (μαλτόζη, σακχαρόζη/Serva) και ένας πολυσακχαρίτης (άμυλο/Merck), με κύριες πηγές αζώτου την πεπτόνη (Merck) και το εκχύλισμα ζύμης (Fluka). Βασικός κοινός παρονομαστής όλων των πειραμάτων ήταν η διατήρηση του λόγου C/N του μέσου στο 20. Πιο αναλυτικά, το βασικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα των διαφόρων πηγών άνθρακα σε ό,τι αφορά τη γλυκόζη (υπόστρωμα GPYS) είχε την σύνθεση που αναφέρεται στον Πίνακα II.2. Με βάση την αναλογία των 12g C/1 θρεπτικού υλικού, οι ποσότητες των σακχάρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: μονοσακχαρίτες και μαλτόζη 30g/l, σακχαρόζη 28,5g/l και άμυλο 27g/l. Η ποσότητα του αμύλου υπολογίστηκε βάση του τύπου: βάρος αμύλου = βάρος γλυκόζης x 0,9 (Horwitz, 1975). Για τη διατήρηση του λόγου C/N, το εκχύλισμα ζύμης και η πεπτόνη κυμάνθηκαν από 2,5 έως 3,5 g/l. Επιπλέον, προστέθηκαν α) ρυθμιστικό του pH διάλυμα αλάτων φωσφορικού οξέος ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και KH_2PO_4) και β) διάλυμα μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Ακόμα, μελετήθηκε και η επίδραση διαφόρων πηγών αζώτου στην κινητική παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και σακχάρων του *V. voluacea* 190. Έτσι, με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (30 g/l) ως πηγές αζώτου δοκιμάστηκαν οι πεπτόνη (GPS), εκχύλισμα ζύμης (GYS), ουρία (GUS), NH_4NO_3 (GNS) και (L)-τροπιτοφάνη (GTS), οι οποίες επιλέχθηκαν μετά από το πείραμα της γραμμικής αύξησης του *V. voluacea* σε τρυβλία (βλ. εδάφιο II.5). Πιο αναλυτικά, το βασικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα των διαφόρων πηγών αζώτου είχε την σύνθεση που αναφέρεται στον Πίνακα II.2 (υπόστρωμα GPYS) με αντικατάσταση των ποσοτήτων πεπτόνης/εκχυλίσματος ζύμης με 5,8 g/l πεπτόνης για το υπόστρωμα GPS, με 5,7 g/l εκχυλίσματος ζύμης για το GYS, με 1,2 g/l ουρίας για το GUS g/l, με 1,8 g/l NH_4NO_3 για το GNS και 5,0 g/l (L)-τροπιτοφάνης για το GTS. Σε όλα τα υποστρώματα προστέθηκε 0,5 g/l εκχύλισμα ζύμης. Για την αποφυγή αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών συστατικών του θρεπτικού υλικού κατά την αποστείρωση, ετοιμάστηκαν σε απιονισμένο νερό (21 ml), τα έντεκα διαλύματα των σακχάρων, το ρυθμιστικό διάλυμα του φωσφορικού οξέος και τέλος τα διαλύματα που περιείχαν τις πηγές αζώτου, τα υπόλοιπα μακροστοιχεία και τα ιχνοστοιχεία. Για κάθε επέμβαση διαφορετικού υποστρώματος έγιναν 3 επαναλήψεις.

Σε επόμενο πείραμα και μετά από επιλογή της γλυκόζης ως καταλληλότερης πηγής άνθρακα και του συνδυασμού πεπτόνης/εκχυλίσματος ζύμης ως καταλληλότερη πηγή αζώτου, μελετήθηκε η επίδραση τεσσάρων διαφορετικών λόγων C/N (20, 30, 40 και 60) στην κινητική παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων, σακχάρων και στην κατανάλωση υποστρώματος του μύκητα *V. voluacea* 190. Το βασικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GPYS (Πίνακας II.2). Για την επίτευξη του λόγου C/N=30 η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 45,8

g/l, στον λόγο C/N=40 62,4 g/l, ενώ για την επίτευξη του λόγου C/N=60 ήταν 95,4 g/l. Για κάθε τιμή λόγου C/N έγιναν 3 επαναλήψεις.

Οι κωνικές φιάλες με τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα μετά την αποστείρωσή τους σε αυτόκλειστο (121 °C, 20 λεπτά) εμβολιάστηκαν με ανανεωμένη καλλιέργεια μύκητα. Αυτό επιτυγχάνονταν με την προσθήκη εμβολίου 0,7 cm που περιείχε τον μύκητα νεαρής καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η συγκέντρωση του εμβολίου (ξηρή βιομάζα) ήταν ~0,10 g/l. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες επωάζονταν σε θερμοκρασία 26±1 °C (32±2 °C για τον *V. voluacea*) έως 24 ημέρες σε επωαστικό κλίβανο (Velp, model FOC 225E, Italy) υπό στατικές συνθήκες ή/και σε επιδαπέδιο ανακινητή (ZHICHENG ZHWY 211C, Shanghai, China) με ρυθμό ανάδευσης 120±5 rpm (rotations per min - στροφές ανά λεπτό) υπό συνθήκες ανάδευσης. Δεδομένου του γεγονότος ότι οι 14 μακρομύκητες εμφανίζουν διαφορετικά θερμοκρασιακά άριστα για την ανάπτυξή τους (Zervakis κ.α., 2001), επιλέχθηκε η μέση θερμοκρασία των 26±1 °C για την επώασή τους (32±2 °C για τον *V. voluacea*).

II.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ

Αρχικά, εξετάστηκε η ταχύτητα αύξησης K_r (mm/ημέρα) τεσσάρων στελεχών του *V. voluacea* (AMRL 188, AMRL 190, AMRL 191, AMRL 192) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό GPYS (Πίνακας II.2) στερεοποιημένο με άγαρ (20 g/l) με σκοπό την επιλογή του ταχύτερα αναπτυσσόμενου στελέχους. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου (Πίνακα II.3) στην ταχύτητα αύξησης του επιλεγμένου στελέχους *V.*

Πίνακας II.3 Πηγές άνθρακα και αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν στα θρεπτικά μέσα για τη μελέτη της ανάπτυξης του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε τρυβλία Petri

Πηγές άνθρακα	Προέλευση	Πηγές αζώτου	Προέλευση
D(+)-γλυκόζη	Alpha Aesar	Πεπτόνη	Merck
Φρουκτόζη	Merck	Εκχύλισμα ζύμης	Fluka
Άμυλο	Merck	Ουρία	Analar BDH
Ξυλόζη	Merck	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Μαλτόζη	Serva	Γλυκίνη	Merck
Σακχαρόζη	Serva	NH ₄ NO ₃	Sigma-Aldrich
Σορβιτόλη	Merck	NH ₄ HCO ₃	Sigma-Aldrich
D(-)-μαννόζη	Sigma-Aldrich	NaNO ₃	Sigma-Aldrich
D(+)-γαλακτόζη	Merck	(L)-τρουποφάνη	Sigma-Aldrich
Λακτόζη	Serva	(L)-γλουταμινικό οξύ	Sigma-Aldrich

voluacea. Σε όλες τις επεμβάσεις, οι συγκεντρώσεις των σακχάρων και των πηγών άνθρακα ήταν τέτοιες, έτσι ώστε ο λόγος C/N των υποστρωμάτων να είναι ~20. Συγκεκριμένα, διατηρήθηκε η αναλογία των 12g C/l σε όλα τα θρεπτικά υλικά (αρχική συγκέντρωση σακχάρων 30 g/l, εκτός σακχαρόζης 28,5 g/l και αμύλου 27 g/l), ενώ στη μελέτη των πηγών αζώτου προστίθετο πάντα 0,5 g/l εκχύλισμα ζύμης. Όσον αφορά στο υπόστρωμα χωρίς κύρια πηγή αζώτου (GS), αυτό περιείχε όλα τα υπόλοιπα συστατικά εκτός από πηγή αζώτου. Τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν στους 121 °C (1,1 atm) για 20 λεπτά και στην συνέχεια αφού απέκτησαν θερμοκρασία περιβάλλοντος, έγινε η πλήρωση των τρυβλίων. Ο εμβολιασμός των τρυβλίων με τα στελέχη έγινε με την τοποθέτηση ενός εμβολίου διαμέτρου 7mm στο κέντρο κάθε τρυβλίου. Τα εμβόλια των μυκήτων ελήφθησαν από προϋπάρχουσες, νεαρής ηλικίας, καθαρές καλλιέργειες των παραπάνω στελεχών. Αφού εμβολιάστηκαν όλα τα τρυβλία, τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 32±2 °C. Συνολικά εμβολιάστηκαν από 3 τρυβλία για κάθε στέλεχος του *V. voluacea*. Οι μετρήσεις ξεκίνησαν από τη στιγμή που το μέτωπο ανάπτυξης των μυκηλίων έγινε 10 mm και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν ανά 24 ώρες. Η καταγραφή του ρυθμού της μυκηλιακής αύξησης έγινε με μέτρηση της αύξησης της μέσης διαμέτρου της αποικίας κατά μήκος δυο κάθετων αξόνων από το κέντρο του εμβολίου και μέχρις ότου η αποικία κάλυψε την επιφάνεια του τρυβλίου (90 mm). Η γραμμική ταχύτητα αύξησης Kr (mm/ημέρα) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο $r = r_0 + Kr \cdot t$, όπου r_0 και r είναι η ακτίνα της αποικίας σε χρόνους 0 και t αντίστοιχα.

II.6. ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

II.6.1. Προσδιορισμός pH

Ο προσδιορισμός του pH έγινε με τη συσκευή Jenway 3020 pH meter (Essex, UK).

II.6.2. Συλλογή βιομάζας

Η βιομάζα συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση υπό κενό και με τη χρήση φίλτρων (Whatman No 2, Kent, England). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια τύπου MacCartey, καταγράφηκε το νωπό βάρος των μυκηλίων με ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB, Darmstadt, Germany) και τοποθετήθηκε σε ξηραντήριο (Elvem, Athens, Greece), στους 60±2 °C για τρεις ημέρες (ή μέχρι απόκτησης σταθερού βάρους). Η ξηρή βιομάζα ζυγίστηκε στον ίδιο ζυγό ακριβείας και εκφράστηκε σε g/l.

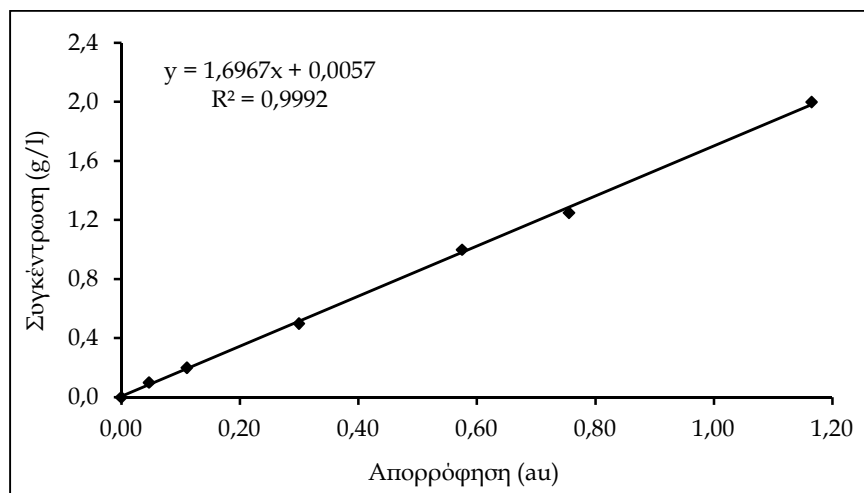
II.6.3. Προσδιορισμός σακχάρων στη διάρκεια της ζύμωσης

II.6.3.1. Ανάγοντα σάκχαρα

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη και μαλτόζη) που δεν καταναλώθηκαν από τον μύκητα στα διάφορα σημεία της κινητικής πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία καυστικού νατρίου (NaOH) και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

Παρασκευή αντιδραστηρίου DNS: Σε 500 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 200 ml NaOH (Merck) 2N. Ακολουθεί ήπια θέρμανση και στη συνέχεια, αργή διάλυση 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (10 g/l, Merck) και μετά του τρυγικού καλιονατρίου (300 g/l, Merck). Τέλος, γίνεται συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1l.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε 0,5 ml δείγματος προστέθηκε 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS και αναδεύτηκε. Στην συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο 100 °C για 5 λεπτά ακριβώς και ψύχθηκαν αμέσως μετά σε H₂O (25 °C). Κατόπιν προστέθηκαν 5 ml απιονισμένο H₂O, ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm. Η συγκέντρωση των δειγμάτων των αντίστοιχων σακχάρων σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς εκφρασμένη σε g/l σακχάρου. Ακολουθεί ενδεικτικά η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης (Γράφημα II.1). Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις φρουκτόζη, μαλτόζη και ξυλόζη ήταν οι $y=1,5936x + 0,0327$ ($R^2=0,9995$), $y=2,1856x + 0,0023$ ($R^2=0,9939$) και $y=1,4312x + 0,011$ ($R^2=0,9995$) αντίστοιχα. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους διπλής θέσεως (JASCO, V-530 UV/VIS Spectrophotometer, Japan).



Γράφημα II.1 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

II.6.3.2. Ολικά σάκχαρα

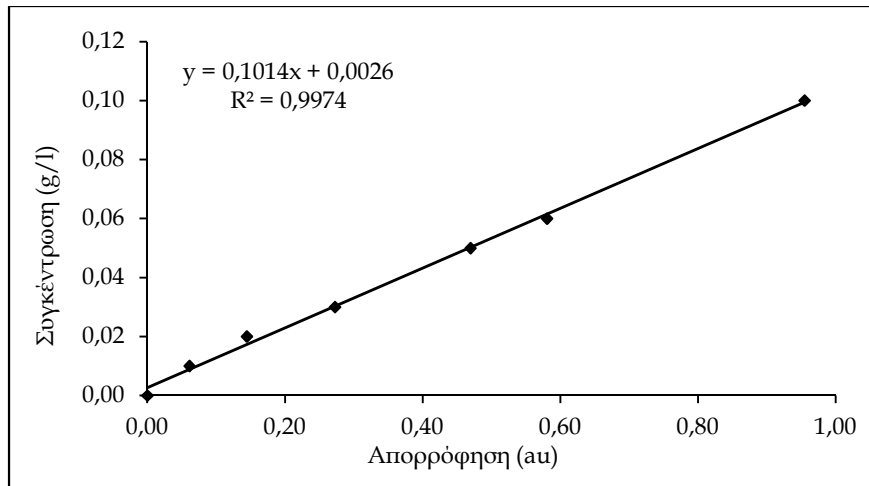
Ο προσδιορισμός της σακχαρόζης και του αμύλου που παρέμειναν στο μέσο καλλιέργειας στα διάφορα στάδια της κινητικής πραγματοποιήθηκε βάση της φωτομετρικής μεθόδου Dubois κ.α. (1957). Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των απλών σακχάρων, ολιγοσακχαριτών, πολυσακχαριτών και των παραγώγων τους να αποκτούν ένα κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα όταν αντιδρούν με φαινόλη και πυκνό θειικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε 1 ml δείγματος προστέθηκε 1 ml διαλύματος φαινόλης (5% β/ο, Carlo Erba-SDS) και 5 ml πυκνού θειικού οξέος (95% β/ο, Merck). Το δείγμα αναδεύτηκε, αφέθηκε σε ηρεμία για δέκα λεπτά ακολούθησε και δεύτερη ανάδευση και αφέθηκε πάλι σε ηρεμία για επιπλέον είκοσι λεπτά και τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φωτόμετρο στα 490 nm. Η παραπάνω διαδικασία πρέπει να λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 25-30 °C. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε υπολειπόμενη σακχαρόζη και άμυλο υπολογίστηκε με βάση τις αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες αναφοράς εκφρασμένη σε g/l σακχαρόζης και αμύλου αντίστοιχα. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η $y=1,4121x - 0,0023$ ($R^2=0,9894$) για τη σακχαρόζη και η $y=0,0832x + 0,0013$ ($R^2=0,9973$) για το άμυλο. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους διπλής θέσης (JASCO V-530 UV/VIS Spectrophotometer, Japan).

II.6.4. Προσδιορισμός εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Ο προσδιορισμός των εξωπολυσακχαριτών (EPS) βασίστηκε στη φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού ολικών σακχάρων Dubois (Dubois κ.α., 1957), όπως περιγράφεται στη παράγραφο II.6.3.2.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε φιαλίδιο erpendorf των 2 ml προστέθηκε 0,4 ml ακατέργαστου διηθήματος και 1,6 ml αιθανόλης (αναλογία 1:4 ο/ο, Carlo Erba-SDS) και το μίγμα αναδεύτηκε. Έπειτα από παραμονή του μίγματος στους 4 °C για δώδεκα ώρες, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (ψυχόμενη φυγόκεντρος Mikro 22R, Hettich, Germany) στα 10.000g, στους 4 °C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα οδηγήθηκε στο ξηραντήριο (60 ± 2 °C). Από τη ξηρή μάζα των εξωπολυσακχαριτών, η οποία διαλύονταν μέσω διαδοχικών ξηλωμάτων του περιεχομένου των erpendorf με απιονισμένο H₂O, προέκυψε αραιωμένο σακχαροδιάλυμα. Σε 1 ml σακχαροδιαλύματος προστέθηκε 1 ml διαλύματος φαινόλης 5% β/ο και 5 ml πυκνού θειικού οξέος (95-97% β/ο), σύμφωνα με την παράγραφο II.6.3.2. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε EPS υπολογίστηκε με βάση πρότυπη



Γράφημα II.2 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκόζης με την μέθοδο Dubois

καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε g/l γλυκόζης (Γράφημα II.2). Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η $y = 0,1014x + 0,0026$ ($R^2 = 0,9974$).

II.6.5. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Liang κ.α. (2010). Συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρής βιομάζας 100 mg εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας 20 ml 2,5M HCl (Merck) στους 100 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολούθησε ρύθμιση του pH του εκχυλίσματος με 2,5M NaOH (Merck) και ο τελικός όγκος προσαρμόστηκε στα 100 ml. Τα ολικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν στη συνέχεια ποσοτικά με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959) και οι IPS εκφράστηκαν ως ισοδύναμα της γλυκόζης.

II.6.6. Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους

Εκχύλιση ολικών λιπιδίων: Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του ολικού ενδοκυτταρικού λίπους των μακρομυκήτων, μετά τη ζύγιση της ξηρής τους βιομάζας προστέθηκε στο γυάλινο φιαλίδιο φύλαξης ποσότητα αντιδραστηρίου Folch [μίγμα διαλυτών CHCl_3 (Carlo Erba-SDS, Val de Reuil, France)/ CH_3OH (Carlo Erba-SDS, Val de Reuil, France) σε αναλογία 2:1] μέχρι κάλυψής της (Folch κ.α., 1957; Papanikolaou κ.α., 2001). Τα φιαλίδια σφραγίστηκαν αεροστεγώς προς αποφυγή εξατμίσεως του διαλύτη και διατηρήθηκαν σε σκοτεινό σημείο προς αποφυγή οξειδωσης του λίπους για 7 ημέρες τουλάχιστον. Με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό μικροβιακό λίπος, ήτοι τα αποθηκευτικά και τα δομικά λιπίδια. Κατόπιν, η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών διηθήθηκε μέσω χάρτινου ηθμού (Whatman No 2). Το διήθημα συλλέχθηκε σε

προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολούθησε εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Stuart RE300DB) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Στην φιάλη εξάτμισης παρέμειναν τα ολικά λιπίδια, τα οποία ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB) και υπολογίστηκαν σε g/l και % κ.β. επί ξηρού βάρους.

Κλασμάτωση λιπιδίων (fractionation): Μετά την εκχύλιση των ολικών λιπιδίων, πραγματοποιήθηκε έκπλυσή τους με διάλυμα KCl 0,88% β/ο (Merck), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις μη λιπιδιακών συστατικών (Folch κ.α. 1957), απ' όπου και παρελήφθη αυστηρά η κάτω φάση. Στη συνέχεια, προστέθηκε άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4 , Carlo Erba-SDS) προκειμένου να επιτευχθεί απομάκρυνση της υγρασίας και υδατοδιαλυτών συστατικών, ακολούθησε διήθηση και συμπύκνωση μέχρι ξηρού βάρους με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα και ζύγιση του εναπομείναντος λίπους. Για την προετοιμασία της στήλης κλασμάτωσης (25 × 100mm) ζυγίστηκε δεκαπλάσια ποσότητα πυριτικού οξέος (Caprylic acid, Sigma) από εκείνη του λίπους και τοποθετήθηκε στο φούρνο (110 °C) για 24 ώρες. Τα λιπίδια διαλύονταν σε 1-2 ml CHCl_3 (Carlo Erba-SDS) και προσθέτονταν στην στήλη. Στην συνέχεια προσθέτονταν με συνεχή ροή (Fakas κ.α., 2008) CHCl_3 (100 ml CHCl_3 /100 mg λιπιδίων) και σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη παρελήφθη το πρώτο κλάσμα λιπιδίων που περιείχε τα ουδέτερα λιπίδια (NL). Έπειτα, η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη ακετόνη (Carlo Erba-SDS) για την παραλαβή του κλάσματος σφιγκολιπιδίων και γλυκολιπιδίων (S+G) και τέλος, CH_3OH (Carlo Erba-SDS) για την παραλαβή του κλάσματος των φωσφολιπιδίων (PL). Τα ανωτέρω κλάσματα εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα, ζυγίστηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό τους και μεθυλεστεροποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο.

Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων: Τα ενδοκυτταρικά λιπίδια μετατράπηκαν με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες που είναι μόρια περισσότερο πηκτικά και λιγότερο πολικά, με την γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1984), προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτά. Η μέθοδος αυτή προτιμήθηκε έναντι άλλων λιγότερο χρονοβόρων προκειμένου να αποφευχθεί η μετατροπή των cis ισομερών των λιπαρών οξέων στα αντίστοιχα trans τα οποία δεν απαντούν, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, στα μικροβιακά λιπίδια. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων.

Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου (MeO-Na^+) και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Με την προσθήκη νερού η αντίδραση διακόπτεται και οι μεθυλεστέρες παραλαμβάνονται με εκχύλιση με n-εξάνιο.

Εφαρμογή της μεθόδου: Στην σφαιρική φιάλη με το κυτταρικό λίπος προστέθηκαν πέτρες βρασμού και 10 ml διαλύματος μεθανολικού νατρίου (MeO-Na^+) που περιείχαν φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH. Το δείγμα τοποθετήθηκε προς βρασμό (για 20 min) σε κάθετο ψυκτήρα και με το πέρας του χρόνου προστέθηκαν 5-10 ml υδροχλωρικής μεθανόλης (μέχρις ότου το pH του μίγματος να γίνει όξινο - αλλαγή χρώματος δείκτη από ερυθρό σε λευκό) και αφέθηκε προς βρασμό για άλλα 20 min. Ακολούθησε προσθήκη νερού προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση και έπειτα προστέθηκαν 6 ml n-εξανίου. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, αναδεύθηκε έντονα και αφέθηκε για λίγα λεπτά προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική φάση). Η φάση του εξανίου συλλέχθηκε σε μικρό φιαλίδιο όπου προστέθηκε μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4) για την απορρόφηση της υγρασίας. Ακολούθησε η ανάλυση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο (GC).

Παρασκευή διαλυμάτων: Το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου παρασκευάστηκε διαλύοντας 1g μεταλλικού νατρίου (Sigma) σε 100 ml μίγματος μεθανόλης/βενζολίου 70/30 (ο/ο, Carlo Erba-SDS). Το διάλυμα της υδροχλωρικής μεθανόλης παρασκευάστηκε προσθέτοντας στάγδην 10 ml ακετυλο-χλωριδίου (Fluka) σε 125 ml μεθανόλης (ισχυρά εξώθερμη αντίδραση).

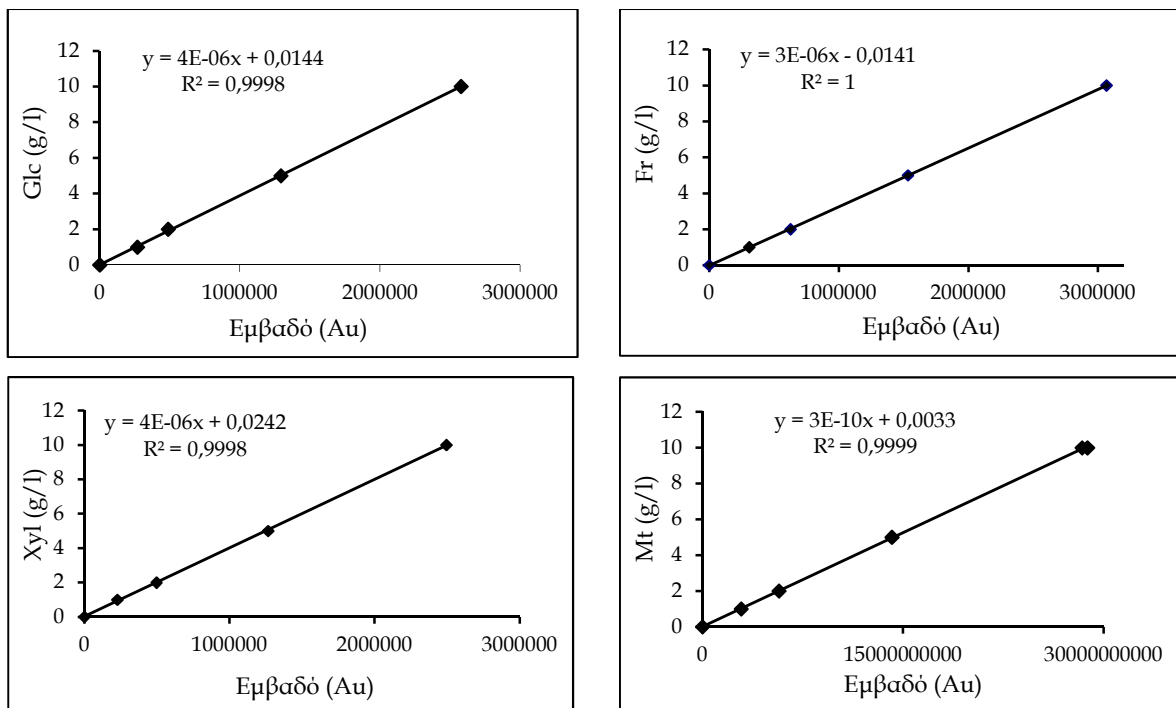
II.6.7. Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography - G.C.)

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με έγχυση 1-2 μl από το διάλυμα των μεθυλεστέρων στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου Fisons 8060 (Fisons Instruments, Manchester, UK). Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν οι εξής: θερμοκρασία φούρνου 200 °C για 13 λεπτά, αύξηση της θερμοκρασίας στους 220 °C (2 °C ανά λεπτό) για 4 λεπτά και περαιτέρω αύξηση στους 240 °C για 3 λεπτά. Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 °C και θερμοκρασία ανιχνευτή 300 °C. Φέρον αέριο He ροή 2 ml/λεπτό, για ενεργοποίηση φλόγας H_2 (60 kPa), O_2 (110 kPa). Χαρακτηριστικά στήλης: Τύπος στήλης Fused silica WCOT:CP-Sill 88 (0,2 μl), μήκος στήλης 50 m, διάμετρος 0,32 m, πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF= 0,25 μm (J&W Scientific).

Τα λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια προτύπου διαλύματος μεθυλεστέρων (F.A.M.E. Mix C8-C22, Supelco Analytical, USA), όπου βάσει του χρόνου κατακράτησής τους και το εμβαδόν της κάθε κορυφής προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος.

II.6.8. Προσδιορισμός σύστασης σακχάρων - Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας (High Performance Liquid Chromatography - H.P.L.C.)

Ο προσδιορισμός των σακχάρων έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC Waters 400) σε στήλη Aminex HPX-87H (BioRad) και σε θερμοκρασία $65 \pm 0,1$ °C. Η ανίχνευση των σακχάρων έγινε με διαφορικό διαθλασίμετρο (RI Waters 410). Ο όγκος δειγματος ήταν 20 μ l, η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα H_2SO_4 0,005 M, η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,8 ml/λεπτό, ενώ η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 λεπτά. Η ταυτοποίηση των σακχάρων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά διαλύματα αυτών. Με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων προέκυψαν οι ακόλουθες εξισώσεις, βάσει των οποίων προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των σακχάρων: $y=4E-06x + 0,0144$ ($R^2=0,9998$) - γλυκόζη, $y=3E-06x - 0,0141$ ($R^2=1$) - φρουκτόζη, $y=4E-06x + 0,0242$ ($R^2=0,9998$) - ξυλόζη και $y=3E-10x + 0,00033$ ($R^2=0,9999$) - μαννιτόλη αντίστοιχα. Οι καμπύλες αναφοράς των σακχάρων γλυκόζη (Glc), φρουκτόζη (Fr), ξυλόζη (Xyl) και μαννιτόλη (Mt) δίνονται στο Γράφημα II.3.

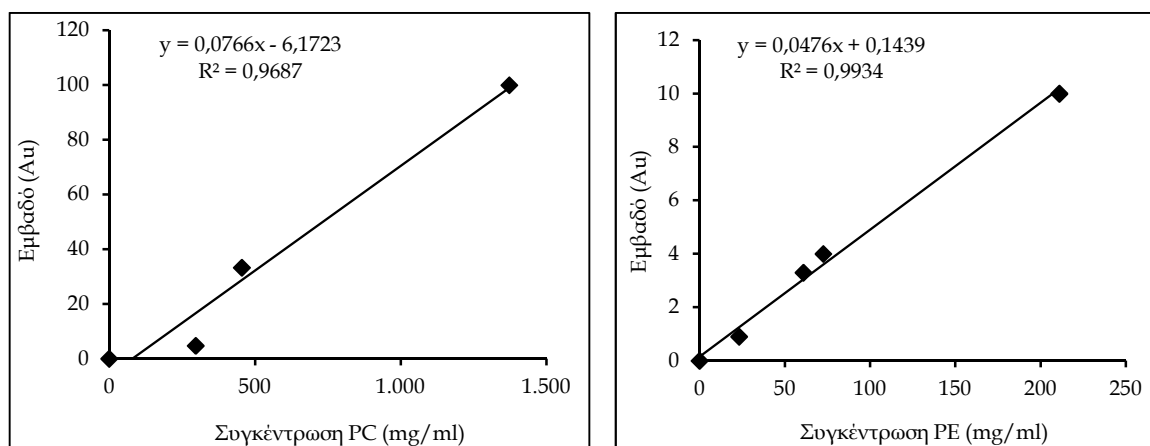


Γράφημα II.3 Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού γλυκόζης (Glc), φρουκτόζης (Fr), ξυλόζης (Xyl) και μαννιτόλης (Mt) με την HPLC

II.6.9. Ανάλυση λιπιδιακών κλάσεων των φωσφολιπιδίων (PL). Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας (H.P.L.C.)

Η ανάλυση του κλάσματος των PL πραγματοποιήθηκε με HPLC (Ultimate 3000, Dionex) που έφερε στήλη Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 (Germering, Germany), (διαστάσεων: 4,6 mm × 150 mm) σε θερμοκρασία 30 °C. Η ανίχνευση των διαφόρων PL έγινε με ανιχνευτή UV (λ=205 nm). Ο όγκος των προς ανάλυση δειγμάτων ήταν 5 μl και η κινητή φάση περιείχε ακετονιτρίλιο-Fluka/μεθανόλη/H₂O/H₂SO₄ (500/450/65/0,25 v/v) με ροή 0,4 ml/min.

Οι πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού χαρακτήθηκαν με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων PL: φωσφατιδυλοχολίνης (phosphatidylcholine-PC, Sigma), φωσφατιδυλινοσιτόλης (phosphatidylinositol-PI, Fluka), φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (Phosphatidyl-ethanolamine-PE, Fluka), φωσφατιδυλσερίνης (phosphatidylserine-PS, Fluka) και φωσφατιδικού οξέος (phosphatidic acid-PA, Fluka). Ενδεικτικά δίνονται οι καμπύλες αναφοράς της PC και της PE (Γράφημα II.4).



Γράφημα II.4 Πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) με την HPLC

II.6.10. Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (G.C.-M.S.)

Κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας, κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω επιβεβαίωση της ύπαρξης δύο λιπαρών οξέων στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μακρομύκητα *V. voluacea* 190. Τούτο κατέστη δυνατό με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας, σε χρωματογράφο Fisons MD 800 (Fisons Instruments, Manchester, UK), ο οποίος έφερε στήλη DB-5 (J&W Scientific) διαστάσεων 30 m × 0,25 mm και πάχος επικάλυψης εσωτερικά της στήλης 0,25 μm. Ως φέρον αέριο

χρησιμοποιήθηκε He υψηλής καθαρότητας με ροή 1,6 ml/λεπτό. Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν ως εξής: αρχική θερμοκρασία στήλης 120 °C, αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης από τους 120 °C στους 250 °C με ρυθμό 3 °C ανά λεπτό και παραμονή στους 250 °C για 5 λεπτά. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 230 °C, ενώ τα ιόντα παρήχθησαν με την μέθοδο του βομβαρδισμού με ηλεκτρόνια ενέργειας 70 eV, με σκοπό την παραλαβή θραυσμάτων εντός του εύρους 40-450 m/z. Τέλος, η συνολική διάρκεια της ανάλυσης ήταν 50 λεπτά. Η ταυτοποίηση των θραυσμάτων των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε με την βοήθεια προτύπου διαλύματος μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (F.A.M.E. Mix C8-C22, Supelco Analytical, USA), αλλά και βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων των βιβλιοθηκών του Wiley (<http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-04-70047852.html>) και του NIST (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.html>).

II.6.11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον δύο ή τρεις φορές με σκοπό τον περιορισμό του τυπικού σφάλματος. Η γενική πειραματική διάταξη περιελάμβανε τρεις επαναλήψεις για κάθε μύκητα και επίπεδο της μελετώμενης παραμέτρου, σε πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS CENTURION XVI (έκδοση 2010) με τις δοκιμασίες απλής (one-way) και παραγοντικής (factorial) ανάλυσης της μεταβλητότητας (ANOVA). Η συγκριτική μελέτη των μέσων τιμών έγινε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (Fisher's least significance difference-LSD), σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στους πίνακες και τα διαγράμματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών των επαναλήψεων και η τυπική τους απόκλιση (standard deviation).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της φυσιολογικής, κινητικής και βιοχημικής συμπεριφοράς στελεχών διαφόρων εδώδιμων και φαρμακευτικών μακρομυκήτων κατά την αύξησή τους σε υγρές καλλιέργειες. Σε πρώτο στάδιο οι μύκητες (*Morchella elata*, *M. esculenta*, *Agrocybe aegerita*, *Ganoderma lucidum*, *G. applanatum*, *Auricularia auricula-judae*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus* και *Volvariella volvacea*) καλλιεργήθηκαν σε 4 θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (GPYS, GYS, GPY και MCM) με σκοπό την επιλογή του υποστρώματος που ευνοεί περισσότερο την αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Στη συνέχεια, επιλεγμένα στελέχη των παραπάνω μυκήτων (*M. esculenta*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *M. esculenta*, *P. pulmonarius* και *V. volvacea*) αξιολογήθηκαν με βάση το δυναμικό παραγωγής μυκηλιακής μάζας, λιπιδίων και πολυσακχαριτών (τόσο ενδοκυτταρικών όσο και εξωκυτταρικών) στο καταλληλότερο υπόστρωμα (GPYS). Θα πρέπει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι, ειδικά για τον μύκητα *V. volvacea* υπήρχε σχεδόν παντελής έλλειψη βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με αυτού του είδους τις μελέτες και γεγονός που αποτέλεσε ακόμη ένα στοιχείο το οποίο μας οδήγησε να μελετήσουμε πιο επισταμένα την κινητική περισσότερων στελεχών του συγκεκριμένου μύκητα. Στη συνέχεια, σε στέλεχος του μακρομύκητα *V. volvacea* στο οποίο, στις ανωτέρω συνθήκες η παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων ήταν πολύ ικανοποιητική, μελετήθηκε εκτενέστερα η επίδραση της φύσης και της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα στην παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, εκτός από τη γλυκόζη μελετήθηκε η αύξηση του μύκητα *V. volvacea* AMRL 190 σε υποστρώματα με βάση τη φρουκτόζη, τη ξυλόζη, τη μαλτόζη, τη σακχαρόζη και το άμυλο, καθώς και σε διάφορες πηγές αζώτου. Ακόμα, μελετήθηκε η αύξηση του παραπάνω μύκητα σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρου, ενώ η συγκέντρωση της πηγής αζώτου παρέμενε σταθερή, ήτοι μελετήθηκε η επίδραση τόσο της αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, όσο και του αυξανόμενου λόγου C/N στην αύξηση και τη βιοχημική απόκριση του συγκεκριμένου μακρομύκητα. Ως συμπληρωματικά των παραπάνω πειραμάτων σε κωνικές φιάλες, πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις της ταχύτητα μυκηλιακής αύξησης και της πυκνότητας στελεχών του *V. volvacea* σε τρυβλία με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (GPYSA), αλλά και του επιλεγμένου στελέχους *V. volvacea* AMRL 190 ποικίλες πηγές άνθρακα και αζώτου.

Οι ζυμώσεις βυθισμένου τύπου πραγματοποιήθηκαν σε κλειστού τύπου καλλιέργειες σε σύστημα φιαλών (batch-flask cultures), τόσο σε στατικές όσο και σε αναδευόμενες συνθήκες και πραγματοποιήθηκαν κινητικές στις οποίες μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- το pH της καλλιέργειας,
- η παραγωγή ξηράς βιομάζας (X , σε g/l),
- η κατανάλωση του υποστρώματος (σε g/l),
- η παραγωγή συνολικών (total) μικροβιακών λιπιδίων (L , σε g/l),
- η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS, σε g/l),
- η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS, σε g/l).

Κατά τη διεργασία των ζυμώσεων υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι της μικροβιακής αύξησης:

- ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής μυκηλιακής μάζας προς αναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$, σε g/g),
- ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς αναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{IPS/S}$, σε g/g),
- ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών προς αναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{EPS/S}$, σε g/g),
- οι συνολικοί ενδοπολυσακχαριτές προς βιομάζα ($Y_{IPS/X}$, σε % κ.β. επί ξηρού),
- οι συνολικοί εξωπολυσακχαριτές προς βιομάζα ($Y_{EPS/X}$, σε % κ.β. επί ξηρού),
- το συνολικό λίπος προς μυκηλιακή μάζα ($Y_{L/X}$, σε % κ.β. επί ξηρού).

Περαιτέρω, σε διάφορα σημεία της κάθε ζύμωσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση των λιπαρών οξέων του συνολικού παραγόμενου μικροβιακού λίπους, κλασμάτωση των μικροβιακών λιπιδίων στις επιμέρους κλάσεις τους (ποσοτικός προσδιορισμός των ουδετέρων λιπιδίων - NL, γλυκολιπιδίων - σφιγκολιπιδίων - G+S και φωσφολιπιδίων - PL) και ανάλυση σε λιπαρά οξέα των επιμέρους κλάσεων. Επίσης, σε ό,τι αφορά τα μικροβιακά παραγόμενα λιπίδια από το μύκητα *V. voluacea* 190, σε επιλεγμένα σημεία της καλλιέργειας αναλύθηκε ποσοτικά το κλάσμα των φωσφολιπιδίων, ώστε να υπάρχει μια πιο εμπεριστατωμένη γνώση για τις επιμέρους κλάσεις οι οποίες το αποτελούν. Τέλος, σε επιλεγμένα σημεία των κινητικών πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιμέρους σακχάρων ή σάκχαρο-αλκοολών τα οποία αποτελούν τις επιμέρους δομικές μονάδες των συνολικών παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών.

III 1.1 Συντομογραφία - μονάδες

- X - ολική ξηρή βιομάζα (g/l)
- Glc - γλυκόζη (g/l); Fr - φρουκτόζη (g/l); Xyl - ξυλόζη; Mt - μαλτόζη (g/l); Suc - σακχαρόζη; St - άμυλο (g/l)
- IPS - ενδοπολυσακχαρίτες (g/l)
- EPS - εξωπολυσακχαρίτες (g/l)
- L - ολικά λιπίδια (g/l)
- ΛΟ - λιπαρό οξύ/λιπαρά οξέα
- NL: ουδέτερα λιπίδια; G+S: γλυκολιπίδια + σφιγκολιπίδια; PL: φωσφολιπίδια
- Glc_c - καταναλωθείσα ποσότητα γλυκόζης (g/l)
- $Y_{X/Glc}$, $Y_{X/S}$ - συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθείσα/έν γλυκόζη/υπόστρωμα (g παραγόμενης βιομάζας προς g καταναλωθείσας γλυκόζης/καταναλωθέν υπόστρωμα)
- $Y_{IPS/Glc}$ - συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς καταναλωθείσα γλυκόζη (g παραγόμενων IPS προς g καταναλωθείσας γλυκόζης)
- $Y_{EPS/Glc}$ - συντελεστής απόδοσης παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών προς καταναλωθείσα γλυκόζη (g παραγόμενων EPS προς g καταναλωθείσας γλυκόζης)
- $Y_{IPS/X}$ - ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών προς τη παραγόμενη βιομάζα (σε % κ.β. επί ξηρής μάζας)
- $Y_{EPS/X}$ - ποσοστό εξωπολυσακχαριτών προς τη παραγόμενη βιομάζα (σε % κ.β. επί ξηρής μάζας)
- $Y_{L/X}$ - ποσοστό ολικών παραγόμενων λιπιδίων προς τη παραγόμενη βιομάζα (σε % κ.β. επί ξηρής μάζας)
- Δείκτες θ , c και max αναφέρονται στη αρχική, καταναλωθείσα και μέγιστη ποσότητα αντίστοιχα των παραγόντων που μελετούνται στην κινητική

III.2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ - ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ 11 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΑ ΥΓΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Διερευνήθηκε η παραγωγή βιομάζας (X , g/l), εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l) και μικροβιακών λιπιδίων (L, g/l και L, % κ.β.) σε συνδυασμό με την κατανάλωση του υποστρώματος γλυκόζης (Glc, g/l) την 12^η και την 16^η ημέρα της καλλιέργειας, σε στατικές και αναδεδόμενες καλλιέργειες των μακρομυκήτων *M. elata*, *M. esculenta*, *A. aegerita*, *G. lucidum*, *A. auricula-judae*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *V. volvacea* στα θρεπτικά μέσα GPYS, GYS, GPY και MCM. Τα θρεπτικά μέσα των καλλιεργειών των 11 μακρομυκήτων ξεκίνησαν με pH 5,6 για το υπόστρωμα GPYS, 5,9 για το υπόστρωμα GYS, 6,4 για το υπόστρωμα MCM και 6,5 για το υπόστρωμα GPY. Στην πορεία της ζύμωσης, παρατηρήθηκε μικρή μεταβολή των τιμών του pH των μέσων καλλιέργειας, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη ρυθμιστική ικανότητα του CaCO_3 των μέσων, ενώ σε λίγες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση (π.χ. στον *A. auricula-judae*) ή μείωση (π.χ. στον *G. applanatum*). Επίσης κοινό χαρακτηριστικό, με ελάχιστες εξαιρέσεις, ήταν η αύξηση της τιμής του pH από τη 12^η στη 16^η ημέρα. Σε κάθε περίπτωση το pH των καλλιεργειών κυμάνθηκε από 5,6 έως 7,2.

Τα αποτελέσματα που αφορούν τη 12^η και τη 16^η ημέρα της καλλιέργειας σε στατικές και αναδεδόμενες καλλιέργειες δίνονται στους Πίνακες III.1α,β και III.2α,β αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική επίδραση τόσο της διάρκειας της καλλιέργειας και της ανάδευσης, όσο και της σύνθεσης του θρεπτικού μέσου στην παραγόμενη βιομάζα (X , g/l) των μακρομυκήτων. Γενικά, σημαντικά μεγαλύτερες τιμές βιομάζας καταγράφηκαν τη 16^η ημέρα της καλλιέργειας και σε συνθήκες ανάδευσης στα περισσότερα θρεπτικά μέσα και στους περισσότερους μύκητες, όπως φαίνεται και από τους Πίνακες III.2α και III.2β. Μάλιστα, στους μακρομύκητες *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *A. auricula-judae* και *L. edodes* παρατηρήθηκε στις αναδεδόμενες φιάλες αύξηση στη τιμή της βιομάζας 3-4 φορές σε σχέση με τη βιομάζα που παράχθηκε υπό στατική κατάσταση. Θετική επίδραση είχε η ανάδευση και στην παραγωγή βιομάζας των μυκήτων *M. elata* και *M. esculenta*, σε μικρότερο όμως βαθμό. Αντίθετα, ο εδώδιμος μύκητας *V. volvacea* δε φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την ανάδευση, ενώ ο *G. applanatum* εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές βιομάζας στις στατικές καλλιέργειες από ό,τι στις αναδεδόμενες.

Όσον αφορά στην επίδραση του θρεπτικού υλικού, οι μεγαλύτερες τιμές μυκηλιακής μάζας καταγράφηκαν στο GPYS που ευνόησε την αύξηση των περισσότερων μυκήτων (*M. elata*, *M. esculenta*, *G. lucidum*, *P. pulmonarius*, *A. auricula-judae*, *A. aegerita*, *P. ostreatus*, *F.*

velutipes και *V. volvacea*). Καλή ανάπτυξη παρουσίασαν οι μακρομύκητες και στα θρεπτικά υλικά GYS (ευνόησε ιδιαίτερα τον *G. applanatum*) και MCM (έδειξε θετική επίδραση στον *L. edodes*, χωρίς ωστόσο να διαφέρει σημαντικά από το GPYS). Το GPY παρουσίασε τις μικρότερες τιμές βιομάζας σε όλους τους μύκητες που μελετήθηκαν. Με βάση την μέση παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας (X , g/l) σε όλα τα θρεπτικά μέσα (στις 16 ημέρες υπό ανάδευση), οι μύκητες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με αύξουσα σειρά σε 3 ομάδες: (α) σε αυτούς που παρήγαγαν λιγότερο από 6 g/l βιομάζας: *L. edodes* < *A. aegerita* < *G. applanatum*, (β) σε αυτούς που παρήγαγαν 6-10 g/l βιομάζας: *A. auricula-judae* < *F. velutipes* < *M. elata* < *G. lucidum* < *M. esculenta* και (γ) σε αυτούς που παρήγαγαν περισσότερο από 10 g/l βιομάζας: *P. ostreatus* < *V. volvacea* < *P. pulmonarius*. Οι μέγιστες τιμές X_{max} που καταγράφηκαν σε συνθήκες ανάδευσης σημειώθηκαν στο GPYS από τους *P. ostreatus* (19,2 g/l) και *P. pulmonarius* (17,7 g/l), στο GYS πάλι από τους *P. ostreatus* (16,9 g/l) και *P. pulmonarius* (16,2 g/l) και στο MCM από τους *P. pulmonarius* (18,8 g/l) και *V. volvacea* (13,4 g/l).

Σε ό,τι αφορά την κατανάλωση του υποστρώματος κατά την καλλιέργεια των μακρομυκήτων, παρατηρήθηκε ότι μία σημαντική ποσότητα γλυκόζης δεν καταναλώθηκε 12 ή/και 16 ημέρες μετά τον εμβολιασμό υπό στατικές συνθήκες (Πίνακες III.1α, III.2α). Για παράδειγμα, στις καλλιέργειες των *L. edodes*, *A. auricula-judae*, *A. aegerita* ή *G. lucidum* η γλυκόζη καταναλώθηκε μόνο σε ποσοστό 2,5-9,5%. Από την άλλη πλευρά, οι μύκητες *M. elata*, *M. esculenta*, *G. applanatum* και *V. volvacea* (η ανάπτυξη των οποίων δεν ευνοήθηκε ιδιαίτερα από την ανάδευση) συνδύασαν την υψηλή παραγωγή βιομάζας με την ικανοποιητική κατανάλωση γλυκόζης (60-90%), κυρίως στα θρεπτικά μέσα GPYS και GYS. Ειδικά για τον *G. applanatum*, η μυκηλιακή μάζα του ήταν σημαντική στις στατικές φιάλες (X_{max} =15,1 g/l και 12,6 g/l στα υποστρώματα GYS και MCM αντίστοιχα, τη 16^η ημέρα). Επίσης, ο συντελεστής βιομετατροπής $Y_{X/Gl}$ (η απόδοση της ξηρής βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθείσας γλυκόζης) κυμάνθηκε από 0,3-0,4 g/g για τους μακρομύκητες *M. elata* και *M. esculenta* και 0,6-0,7 g/g για τους *G. applanatum* και *V. volvacea*. Ωστόσο, η γλυκόζη δεν καταναλώθηκε πλήρως από την πλειοψηφία των μυκήτων και στις αναδεδόμενες καλλιέργειες (Πίνακες III.1β, III.2β), με την κατανάλωση να εμφανίζεται αυξημένη πρώτα στο θρεπτικό μέσο GPYS και μετά στο GYS, κυρίως τη 16^η ημέρα. *M. elata*, *M. esculenta*, *V. volvacea*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* και *F. velutipes* ήταν τα μανιτάρια που κατανάλωσαν περισσότερο τη διαθέσιμη γλυκόζη, σε ποσότητα από 67% (*F. velutipes* και *P. ostreatus*) έως και ~100% (*M. esculenta*). Σε αρκετές περιπτώσεις, η σύνθεση της βιομάζας συνοδεύθηκε από τιμές $Y_{X/Gl}$ που ήταν πραγματικά πολύ υψηλές (π.χ. 0,6-0,9 g/g για τους *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* και *V. volvacea* στο GPYS).

Πίνακας III.1α Μέσες τιμές βιομάζας (X, g/l), εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l), λιπιδίων (L, g/l) και κατανάλωσης γλυκόζης (Glc_c, g/l) 11 μακρομυκήτων κατά την καλλιέργειά τους στα θρεπτικά μέσα GPYS, GPY, GYS και MCM για 12 ημέρες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella voluacea*) υπό στατικές συνθήκες

Είδη μυκήτων/ 12 ^η ημ., στατική	<i>M. elata</i> 63	<i>M. esculenta</i> 36	<i>G. lucidum</i> 330	<i>G. applanatum</i> 341	<i>A. auricula</i> 111	<i>A. aegerita</i> 104	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177	<i>F. velutipes</i> 271	<i>L. edodes</i> 121	<i>V. voluacea</i> 190	
GPYS	X (g/l)	5,4±0,2	9,8±0,5	1,4±0,2	6,1±0,4	0,9±0,0	0,3±0,0	1,5±0,03	2,3±0,4	2,7±0,8	0,7±0,4	10,2±1,5
	Glc _c (g/l)	17,8±1,3	22,7±1,3	1,9±0,4	10,0±1,1	1,5±0,2	0,5±0,1	3,3±0,4	4,4±0,5	5,1±0,7	1,0±0,3	16,5±1,0
	EPS (g/l)	0,45±0,08	0,84±0,22	1,08±0,13	0,87±0,21	0,98±0,32	0,60±0,05	1,16±0,24	0,71±0,20	0,70±0,21	1,31±0,33	1,14±0,21
	L (g/l)	1,23±0,1	1,34±0,13	0,14±0,01	0,84±0,04	0,18±0,02	0,06±0,01	0,28±0,02	0,56±0,05	0,54±0,04	0,15±0,02	0,95±0,08
	Y _{L/X} (% κ.β.)	22,7±1,3	13,7±1,0	10,0±0,8	13,8±0,9	20,0±1,5	21,1±1,6	18,7±0,8	19,6±1,1	20,2±1,4	22,7±1,0	9,3±0,6
GPY	X (g/l)	3,0±0,3	1,4±0,2	0,8±0,1	4,9±0,4	1,7±0,1	0,3±0,1	1,1±0,1	3,5±0,2	0,5±0,2	0,6±0,3	5,2±0,4
	Glc _c (g/l)	9,9±0,6	7,8±0,5	2,8±0,1	7,9±0,6	1,9±0,1	2,9±0,1	1,7±0,1	4,1±0,2	1,9±0,1	0,7±0,2	5,8±±0,4
	EPS (g/l)	0,80±0,09	0,77±0,04	1,04±0,05	0,72±0,06	1,17±0,20	0,30±0,05	1,09±0,09	0,84±0,10	0,89±0,12	1,01±0,13	0,96±0,13
	L (g/l)	0,41±0,05	0,31±0,03	0,18±0,02	0,84±0,10	0,33±0,11	0,07±0,01	0,23±0,05	0,58±0,06	0,10±0,06	0,10±0,01	0,58±0,06
	Y _{L/X} (% κ.β.)	13,6±1,2	22,0±1,0	22,1±1,3	17,1±1,1	19,6±1,3	22,0±1,4	21,0±1,3	16,5±1,2	21,3±1,3	16,7±1,0	11,2±0,9
GYS	X (g/l)	5,7±0,4	5,5±0,4	0,2±0,1	6,7±0,5	0,5±0,1	0,9±0,2	0,9±0,1	1,1±0,2	1,9±0,3	0,3±0,1	10,0±0,7
	Glc _c (g/l)	18,1±1,0	17,6±0,9	1,0±0,2	9,1±0,7	0,6±0,2	0,5±0,01	1,7±0,1	2,1±0,3	4,2±0,3	0,5±0,01	12,9±0,8
	EPS (g/l)	0,41±0,06	0,56±0,07	0,93±0,05	0,59±0,14	0,47±0,06	0,40±0,02	0,80±0,08	1,04±0,06	0,79±0,12	0,50±0,03	0,88±0,01
	L (g/l)	0,87±0,01	0,76±0,06	0,04±0,01	0,33±0,10	0,10±0,01	0,20±0,01	0,18±0,01	0,21±0,02	0,21±0,02	0,40±0,04	1,07±0,01
	Y _{L/X} (% κ.β.)	15,4±0,9	13,9±0,8	18,2±1,1	4,9±0,4	21,0±1,2	22,7±1,0	19,4±1,0	19,1±0,9	19,1±0,9	21,0±1,0	10,7±0,6
MCM	X (g/l)	5,6±0,4	2,8±0,1	1,7±0,1	5,7±0,4	0,4±0,1	0,5±0,1	1,6±0,1	0,3±0,0	2,3±0,1	0,1±0,0	9,2±0,6
	Glc _c (g/l)	17,5±0,8	7,7±0,3	2,1±0,1	9,7±0,5	1,1±0,1	2,0±0,2	2,5±0,1	0,7±0,2	6,1±0,4	1,0±0,1	11,9±0,8
	EPS (g/l)	0,47±0,03	0,55±0,03	1,06±0,06	0,73±0,05	0,46±0,04	0,50±0,04	0,94±0,06	0,58±0,04	0,96±0,07	0,25±0,03	0,83±0,02
	L (g/l)	0,99±0,09	0,56±0,10	0,35±0,05	0,25±0,02	0,08±0,03	0,11±0,02	0,34±0,04	0,06±0,01	0,48±0,06	0,02±0,01	0,68±0,07
	Y _{L/X} (% κ.β.)	17,8±0,9	19,7±0,8	20,5±1,0	4,4±0,2	21,0±0,9	22,5±1,1	22,5±1,1	20,0±0,9	21,0±1,0	16,7±0,8	7,4±0,7

Πίνακας III.1β Μέσες τιμές βιομάζας (X, g/l), εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l), λιπιδίων (L, g/l) και κατανάλωσης γλυκόζης (Glc_c, g/l) 11 μακρομυκήτων κατά την καλλιέργειά τους στα θρεπτικά μέσα GPYS, GPY, GYS και MCM για 12 ημέρες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella voluacea*) υπό αναδεδυόμενες (120±5 rpm) συνθήκες

Είδη μυκήτων/ 12 ^η ημ., αναδεδυόμενη	<i>M. elata</i> 63	<i>M. esculenta</i> 36	<i>G. lucidum</i> 330	<i>G. applanatum</i> 341	<i>A. auricula</i> 111	<i>A. aegerita</i> 104	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177	<i>F. velutipes</i> 271	<i>L. edodes</i> 121	<i>V. voluacea</i> 190	
GPYS	X (g/l)	7,9±0,6	10,5±0,7	8,3±0,6	4,1±0,2	6,5±0,4	2,0±0,1	15,7±0,9	9,0±0,6	7,0±0,5	1,9±0,1	11,2±0,8
	Glc _c (g/l)	13,5±0,8	25,1±1,0	14,6±0,8	6,5±0,4	10,1±0,7	3,0±0,1	18,4±0,8	10,2±0,7	17,5±0,8	2,5±0,1	13,0±0,8
	EPS (g/l)	0,82±0,13	0,84±0,07	1,04±0,10	0,50±0,10	1,03±0,11	0,60±0,04	1,25±0,13	0,62±0,12	1,0±0,11	0,98±0,10	0,94±0,10
	L (g/l)	0,70±0,06	2,42±0,14	1,7±0,12	0,74±0,06	0,95±0,10	0,34±0,04	1,10±0,10	1,08±0,14	0,84±0,07	0,40±0,04	0,65±0,1
	Y _{L/X} (% κ.β.)	8,9±0,6	23,1±0,9	20,6±0,9	18,1±0,8	14,6±0,8	17,0±0,9	7,0±0,6	12,0±0,8	12,0±0,7	21,1±1,0	5,8±0,48
GPY	X (g/l)	5,5±0,4	3,0±0,2	3,5±0,2	0,9±0,1	2,9±0,1	0,9±0,1	1,9±0,1	4,0±0,2	3,9±0,2	0,8±0,1	6,1±0,5
	Glc _c (g/l)	7,9±0,6	6,5±0,4	3,9±0,2	1,1±0,1	3,8±0,1	2,9±0,1	2,1±0,1	4,5±0,1	8,5±0,6	1,9±0,1	6,6±0,2
	EPS (g/l)	1,06±0,12	0,93±0,10	1,64±0,14	1,06±0,13	1,45±0,15	0,38±0,07	1,14±0,16	0,86±0,17	1,29±0,12	1,62±0,17	0,76±0,15
	L (g/l)	0,38±0,03	0,54±0,05	0,74±0,06	0,14±0,05	0,46±0,06	0,19±0,06	0,38±0,06	0,80±0,10	0,59±0,06	0,17±0,05	0,50±0,06
	Y _{L/X} (% κ.β.)	6,9±0,6	18,0±0,9	21,1±1,1	15,6±0,8	15,9±0,9	22,0±1,1	20,0±0,9	19,9±0,8	15,1±0,8	21,3±1,0	8,2±0,6
GYS	X (g/l)	6,9±0,5	9,9±0,6	6,7±0,4	4,9±0,2	4,5±0,2	1,1±0,1	14,5±0,8	12,8±0,7	5,2±0,3	1,9±0,1	10,6±0,8
	Glc _c (g/l)	14,5±0,8	25,5±0,9	16,8±0,8	5,4±0,2	5,6±0,2	1,5±0,1	17,4±0,8	15,9±0,8	8,7±0,6	2,9±0,1	12,7±0,9
	EPS (g/l)	0,40±0,04	1,00±0,04	1,25±0,13	0,40±0,05	0,76±0,02	1,29±0,12	0,73±0,12	1,00±0,13	1,39±0,12	1,77±0,14	0,97±0,12
	L (g/l)	0,55±0,05	1,39±0,16	1,42±0,12	0,49±0,03	0,68±0,03	0,23±0,02	1,13±0,11	1,28±0,12	0,94±0,11	0,36±0,08	1,17±0,15
	Y _{L/X} (% κ.β.)	8,0±0,6	14,0±0,8	21,2±0,8	10,0±0,7	15,1±0,8	20,9±1,0	7,8±0,5	10,0±0,8	18,1±0,9	19,0±0,8	11,0±0,9
MCM	X (g/l)	7,8±0,6	6,2±0,5	5,9±0,4	1,7±0,1	2,4±0,1	2,9±0,1	3,9±0,2	15,9±0,8	4,9±0,4	2,9±0,1	9,9±0,5
	Glc _c (g/l)	14,2±0,8	11,6±0,8	6,8±0,3	2,9±0,1	3,1±0,1	3,7±0,2	5,1±0,4	20,1±0,9	6,6±0,4	3,1±0,1	12,9±0,6
	EPS (g/l)	0,38±0,02	0,81±0,04	1,50±0,09	1,00±0,04	1,16±0,07	0,40±0,03	1,67±0,15	0,84±0,10	1,24±0,11	1,17±0,15	0,62±0,12
	L (g/l)	0,82±0,05	0,94±0,14	1,19±0,1	0,17±0,05	0,46±0,05	0,58±0,04	0,82±0,06	1,59±0,13	0,59±0,04	0,35±0,04	0,62±0,06
	Y _{L/X} (% κ.β.)	10,5±0,8	15,2±0,7	20,1±1,0	10,0±0,8	19,2±0,8	20,0±0,9	21,0±1,2	10,0±0,8	12,0±0,08	21,1±0,7	6,3±0,3

Πίνακας III.2a Μέσες τιμές βιομάζας (X, g/l), εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l), λιπιδίων (L, g/l) και κατανάλωσης γλυκόζης (Glc_c, g/l) 11 μακρομυκήτων κατά την καλλιέργειά τους στα θρεπτικά μέσα GPYS, GPY, GYS και MCM για 16 ημέρες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella volvacea*) υπό στατικές συνθήκες

Είδη μυκήτων/ 16 ^η ημ., στατική	<i>M. elata</i> 63	<i>M. esculenta</i> 36	<i>G. lucidum</i> 330	<i>G. applanatum</i> 341	<i>A. auricula</i> 111	<i>A. aegerita</i> 104	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177	<i>F. velutipes</i> 271	<i>L. edodes</i> 121	<i>V. volvacea</i> 190	
GPYS	X (g/l)	8,6±0,5	10,7±0,9	2,3±0,1	9,2±0,6	3,3±0,1	0,8±0,07	3,8±0,2	8,6±0,7	5,5±0,2	1,1±0,1	14,5±0,8
	Glc _c (g/l)	29,4±1,2	27,7±1,3	2,9±0,1	15,7±0,8	4,1±0,2	1,0±0,1	4,5±0,2	9,9±0,6	7,0±0,5	1,5±0,1	24,7±0,9
	EPS (g/l)	0,26±0,07	0,29±0,08	0,64±0,05	0,40±0,04	0,65±0,06	0,60±0,05	0,69±0,06	0,35±0,06	0,50±0,1	0,68±0,07	0,76±0,06
	L (g/l)	1,55±0,21	1,46±0,18	0,16±0,06	0,80±0,05	0,29±0,03	0,09±0,04	0,50±0,05	0,96±0,08	0,71±0,08	0,18±0,05	0,53±0,05
	Y _{L/X} (% κ.β.)	18,0±1,0	13,6±0,9	7,1±0,5	8,7±0,6	8,9±0,6	11,0±1,2	12,9±0,6	11,1±0,9	12,9±0,8	16,0±1,3	3,0±0,1
GPY	X (g/l)	5,2±0,3	3,2±0,2	1,3±0,6	7,9±0,6	2,8±0,1	0,6±0,1	2,0±0,1	4,4±0,2	5,8±0,4	1,1±0,1	7,2±0,6
	Glc _c (g/l)	13,6±0,7	9,0±0,8	4,1±0,2	11,1±0,8	3,3±0,2	4,1±0,2	3,3±0,2	6,1±0,4	7,0±0,6	1,8±0,1	8,6±0,4
	EPS (g/l)	0,35±0,05	0,30±0,04	0,53±0,06	0,56±0,04	0,81±0,06	0,23±0,04	0,85±0,05	0,61±0,07	0,79±0,1	0,71±0,06	0,50±0,03
	L (g/l)	0,76±0,05	0,53±0,03	0,12±0,02	0,44±0,05	0,50±0,05	0,06±0,02	0,26±0,06	0,49±0,05	0,51±0,05	0,15±0,06	0,33±0,05
	Y _{L/X} (% κ.β.)	14,8±1,2	16,4±1,0	9,5±1,0	5,6±0,4	18,0±0,9	10,0±1,0	13,0±0,8	11,1±0,8	8,8±0,6	14,0±0,8	4,6±0,2
GYS	X (g/l)	6,9±0,5	7,5±0,5	0,5±0,07	15,1±0,7	3,7±0,2	2,1±0,1	4,2±0,1	8,8±0,6	4,0±0,2	0,8±0,04	12,4±0,6
	Glc _c (g/l)	24,1±0,8	23,1±0,9	1,0±0,1	19,2±0,6	4,5±0,2	3,5±0,1	4,9±0,2	10,5±0,7	8,3±0,6	1,7±0,1	14,6±0,7
	EPS (g/l)	0,20±0,05	0,27±0,04	0,68±0,07	0,17±0,03	0,28±0,04	0,69±0,06	0,37±0,05	0,52±0,06	0,66±0,06	0,31±0,02	0,77±0,03
	L (g/l)	0,56±0,04	0,76±0,05	0,05±0,00	1,84±0,11	0,24±0,02	0,23±0,02	0,33±0,04	0,64±0,05	0,64±0,05	0,12±0,03	1,03±0,06
	Y _{L/X} (% κ.β.)	8,3±0,6	10,1±0,8	10,0±0,8	12,2±0,6	6,5±0,5	11,0±0,7	7,9±0,6	7,3±0,5	16,0±1,0	15,0±0,8	8,3±0,5
MCM	X (g/l)	7,2±0,5	4,4±0,2	2,7±0,1	12,6±0,7	1,1±0,08	0,6±0,05	2,2±0,1	4,1±0,2	4,8±0,4	0,1±0,04	12,7±0,6
	Glc _c (g/l)	22,7±0,8	10,1±0,5	3,3±0,2	18,2±0,8	2,7±0,1	2,5±0,2	5,0±0,2	7,9±0,6	7,8±0,6	1,0±0,1	14,8±0,8
	EPS (g/l)	0,21±0,06	0,29±0,03	0,65±0,04	0,44±0,03	0,40±0,04	0,35±0,03	0,84±0,05	0,49±0,03	0,72±0,05	0,13±0,05	0,51±0,02
	L (g/l)	1,07±0,10	0,71±0,06	0,30±0,04	1,36±0,08	0,16±0,04	0,10±0,04	0,33±0,05	0,50±0,04	1,15±0,11	0,01±0,02	0,29±0,04
	Y _{L/X} (% κ.β.)	14,8±0,8	16,2±0,6	14,0±0,9	10,8±0,8	15,2±0,8	16,7±0,8	15,0±0,9	12,3±0,6	17,0±1,3	15,6±0,7	2,3±0,1

Πίνακας III.2β Μέσες τιμές βιομάζας (X, g/l), εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l), λιπιδίων (L, g/l) και κατανάλωσης γλυκόζης (Glc_c, g/l) 11 μακρομυκήτων κατά την καλλιέργειά τους στα θρεπτικά μέσα GPYS, GPY, GYS και MCM για 16 ημέρες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvaceae volvaceae*) υπό αναδεδόμενες (120±5 rpm) συνθήκες

Είδη μυκήτων/ 16 ^η , αναδεδόμενη	<i>M. elata</i> 63	<i>M. esculenta</i> 36	<i>G. lucidum</i> 330	<i>G. applanatum</i> 341	<i>A. auricula</i> 111	<i>A. aegerita</i> 104	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177	<i>F. velutipes</i> 271	<i>L. edodes</i> 121	<i>V. volvaceae</i> 190	
GPYS	X (g/l)	9,6±0,4	12,2±0,8	10,9±0,7	8,0±0,6	10,6±0,6	7,5±0,6	19,2±0,9	17,7±0,6	10,9±0,6	3,7±0,3	13,9±0,7
	Glc _c (g/l)	23,1±1,1	29,7±1,1	18,2±0,9	13,1±0,7	12,9±0,7	8,8±0,6	23,0±0,8	21,2±0,7	20,0±1,2	6,0±0,5	23,6±1,2
	EPS (g/l)	0,51±0,03	0,44±0,05	0,65±0,06	0,54±0,1	0,65±0,08	0,80±0,05	0,78±0,1	0,40±0,06	0,40±0,1	0,92±0,1	0,35±0,04
	L (g/l)	0,83±0,08	2,30±0,41	1,65±0,32	1,12±0,20	1,17±0,10	0,81±0,17	0,95±0,08	1,50±0,11	0,57±0,07	0,60±0,06	0,51±0,06
	Y _{L/X} (% κ.β.)	8,7±0,7	18,8±1,0	15,2±0,8	14,0±0,6	11,0±0,7	10,8±0,8	4,9±0,2	8,5±0,6	5,2±0,4	16,2±0,6	2,8±0,1
GPY	X (g/l)	7,1±0,4	6,0±0,3	6,9±0,4	2,9±0,1	5,8±0,5	1,4±0,1	3,9±0,1	4,9±0,2	7,6±0,5	1,3±0,1	8,0±0,6
	Glc _c (g/l)	12,8±0,6	9,2±0,5	8,5±0,5	4,2±0,2	7,5±0,5	4,0±0,2	5,1±0,2	6,4±0,2	12,2±0,6	1,8±0,07	10,1±0,6
	EPS (g/l)	0,47±0,07	0,70±0,07	0,61±0,03	0,80±0,10	0,29±0,13	0,29±0,05	1,04±0,12	0,80±0,12	0,80±0,12	0,82±0,12	0,47±0,05
	L (g/l)	0,61±0,05	1,10±0,10	1,16±0,11	0,37±0,08	0,54±0,04	0,18±0,04	0,58±0,06	0,78±0,11	0,93±0,10	0,21±0,03	0,30±0,02
	Y _{L/X} (% κ.β.)	8,6±0,5	18,3±0,8	16,8±0,8	12,9±0,6	9,3±0,5	12,5±1,4	15,0±1,0	16,0±1,2	12,2±0,5	16,0±0,9	3,8±0,2
GYS	X (g/l)	9,0±0,6	12,2±0,8	9,4±0,6	7,5±0,5	6,8±0,4	3,0±0,1	16,9±0,8	16,2±0,8	6,9±0,3	3,6±0,1	11,9±0,6
	Glc _c (g/l)	20,9±0,8	28,8±1,4	18,1±0,6	9,0±0,6	8,6±0,5	4,2±0,1	20,1±0,7	19,3±0,9	13,1±0,8	4,4±0,2	15,1±0,5
	EPS (g/l)	0,46±0,05	0,36±0,06	0,49±0,04	0,35±0,03	0,39±0,04	1,67±0,18	0,75±0,14	0,64±0,06	0,35±0,1	0,47±0,05	0,35±0,04
	L (g/l)	0,50±0,04	1,26±0,10	1,56±0,13	0,75±0,04	0,67±0,50	0,51±0,05	0,72±0,07	1,00±0,11	1,00±0,12	0,56±0,06	1,16±0,10
	Y _{L/X} (% κ.β.)	5,7±0,4	10,4±0,6	16,6±0,4	10,0±0,8	9,9±0,7	17,0±0,9	4,3±0,2	6,2±0,4	14,5±0,8	15,6±0,8	9,8±0,4
MCM	X (g/l)	9,1±0,6	7,2±0,6	8,5±0,5	3,9±0,2	4,0±0,2	4,4±0,2	5,9±0,4	18,8±0,8	6,5±0,4	4,6±0,2	13,4±0,7
	Glc _c (g/l)	20,1±1,0	16,6±0,8	10,5±0,5	6,1±0,3	5,0±0,2	5,1±0,3	6,9±0,4	21,6±0,8	9,8±0,5	5,9±0,2	17,7±0,7
	EPS (g/l)	0,45±0,08	0,56±0,06	0,62±0,04	0,61±0,06	0,44±0,05	0,47±0,03	0,88±0,12	0,53±0,04	0,71±0,06	0,83±0,11	0,38±0,05
	L (g/l)	0,90±0,08	0,90±0,07	1,45±0,10	0,70±0,04	0,60±0,04	0,72±0,09	0,94±0,10	1,15±0,12	0,55±0,05	0,38±0,04	0,45±0,03
	Y _{L/X} (% κ.β.)	9,9±0,5	12,5±0,6	17,0±1,2	17,8±0,8	15,1±0,7	16,3±0,7	16,0±1,1	6,1±0,4	8,4±0,6	8,3±0,6	3,4±0,2

Η παραγωγή των EPS (Πίνακες III.1.α,β και III.2.α,β), σε αντίθεση με αυτή της βιομάζας, εμφανίστηκε σε σημαντικά υψηλότερες ποσότητες τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας, με τις τιμές να δείχνουν πιθανή αποδόμηση ποσότητας EPS στη συνέχεια της καλλιέργειας. Ακόμα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική θετική επίδραση της ανάδευσης στην παραγωγή EPS, καθώς οι μέγιστες τιμές τους παράχθηκαν στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες (με εξαίρεση τον *P. pulmonarius*). Συγκρίνοντας τη βιοσύνθεση των EPS στα διάφορα θρεπτικά μέσα (στις 12 ημέρες υπό ανάδευση), δεικνύεται ότι το πιο κατάλληλο υπόστρωμα για την πλειοψηφία των υπό εξέταση μυκήτων ήταν το GPY, ενώ ακολούθησαν με φθίνουσα σειρά τα GYS > MCM > GPYS, χωρίς ωστόσο να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Διαπιστώνεται δηλαδή ότι η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών μεγιστοποιείται στα θρεπτικά μέσα που δεν ευνοούν την μεγάλη παραγωγή βιομάζας. Με βάση την μέση παραγωγή EPS (g/l) σε όλα τα θρεπτικά μέσα (στις 12 ημέρες υπό ανάδευση), οι μύκητες που μελετήθηκαν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με αύξουσα σειρά σε 3 ομάδες: (α) σε αυτούς που παρήγαγαν λιγότερο από 0,75 g/l EPS: *M. elata* < *A. aegerita* < *G. applanatum*, (β) σε αυτούς που παρήγαγαν 0,75-1 g/l EPS *V. voluacea* < *P. pulmonarius* < *M. esculenta* και (γ) σε αυτούς που παρήγαγαν περισσότερο από 1 g/l EPS *A. auricula-judae* < *P. ostreatus* < *F. velutipes* < *G. lucidum* < *L. edodes*. Αναλυτικότερα, οι μέγιστες τιμές EPS καταγράφηκαν στο θρεπτικό μέσο GPY από τους *G. lucidum* (1,64 g/l), *L. edodes* (1,62 g/l) και *A. auricula-judae* (1,45 g/l), στο GYS από τους *L. edodes* (1,77 g/l), *F. velutipes* (1,39 g/l), *A. aegerita* (1,29 g/l) και *G. lucidum* (1,25 g/l) και στο MCM από τους *P. ostreatus* (1,67 g/l), *G. lucidum* (1,5 g/l) και *F. velutipes* (1,24 g/l).

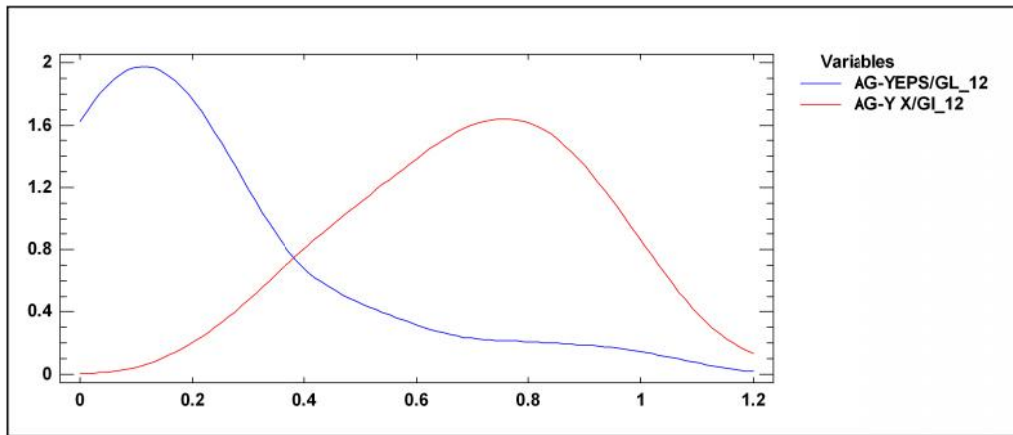
Επιπλέον, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης εξωπολυσακχαριτών βάση της καταναλωθείσης γλυκόζης ($Y_{EPS/Glc}$ - εκφράζει την ικανότητα του μύκητα να χρησιμοποιεί την γλυκόζη του υποστρώματος προς σχηματισμό εξωπολυσακχαριτών) τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας των μακρομυκήτων, για το θρεπτικό μέσο GPY όπου ευνόησε τη βιοσύνθεση EPS και για το GPYS όπου ευνόησε την παραγωγή βιομάζας (Πίνακας III.3). Τα δεδομένα του πίνακα δείχνουν ότι η εφαρμογή της ανάδευσης είχε θετική επίδραση στους περισσότερους μακρομύκητες (με ελάχιστες εξαιρέσεις π.χ. τους *M. elata* και *G. lucidum*), με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης του υποστρώματος (Glc/d), με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα αργά αναπτυσσόμενα στελέχη *L. edodes* και *G. applanatum*. Ακόμα, συγκρίνοντας τα δύο θρεπτικά μέσα διαπιστώνουμε ότι στο GPYS ο ρυθμός Glc/d είναι αυξημένος σε σχέση με το GPY, ιδιαίτερα στους μακρομύκητες *M. elata*, *M. esculenta*, *F. velutipes*, *G. applanatum* και *V. voluacea* τόσο σε στατικές όσο και αναδεδυόμενες συνθήκες, αλλά και στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες των *A. auricula-judae*, *L. edodes* και *G. lucidum*.

Πίνακας III.3 Συντελεστής απόδοσης εξωπολυσακχαριτών βάσει της καταναλωθείσης γλυκόζης ($Y_{EPS/Glc}$) στα θρεπτικά μέσα GPY και GPYS και αντίστοιχος ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ανά ημέρα (Glc/d) των 11 ειδών μακρομυκήτων κατά την καλλιέργειά τους για 12 ημέρες, υπό στατικές (Σ) και αναδεδυόμενες (A) συνθήκες (120 ± 5 rpm) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *Volvariella voluacea*)

Μακρομύκητες		12ημ - GPY		12ημ - GPYS	
		$Y_{EPS/Glc}$	Glc/d	$Y_{EPS/Glc}$	Glc/d
<i>M. elata</i>	Σ	0,08	0,80	0,03	1,48
	A	0,08	0,70	0,04	1,13
<i>M. esculenta</i>	Σ	0,10	0,70	0,03	1,19
	A	0,14	0,50	0,08	2,09
<i>A. aegerita</i>	Σ	1,20	0,20	0,60	0,04
	A	0,86	0,20	0,09	0,25
<i>P. ostreatus</i>	Σ	0,64	0,10	0,26	0,28
	A	0,54	0,20	0,20	0,25
<i>P. pulmonarius</i>	Σ	0,83	0,30	0,10	0,37
	A	0,19	0,40	0,13	0,87
<i>F. velutipes</i>	Σ	0,47	0,20	0,11	0,43
	A	0,15	0,70	0,07	1,46
<i>A. auricula</i>	Σ	0,78	0,20	0,37	0,13
	A	0,38	0,30	0,05	0,84
<i>L. edodes</i>	Σ	1,44	0,10	1,30	0,08
	A	0,85	0,20	0,46	1,15
<i>G. lucidum</i>	Σ	0,93	0,20	0,68	0,16
	A	0,42	0,30	0,07	1,22
<i>G. applanatum</i>	Σ	0,09	0,70	0,05	0,83
	A	0,96	0,10	0,19	0,54
<i>V. voluacea</i>	Σ	0,17	0,40	0,07	1,38
	A	0,12	0,60	0,05	0,86

Ωστόσο, διαπιστώνεται ότι η αυξημένη αυτή κατανάλωση του υποστρώματος δε συνάδει με τη βιομετατροπή του σε EPS, καθώς στο GPY ο $Y_{EPS/Glc}$ είναι σαφώς υψηλότερος.

Σε σχέση με το συντελεστή απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθείσα γλυκόζη ($Y_{X/Gl}$) που αναφέρθηκε πιο πάνω, για τον οποίο καταγράφηκαν υψηλές τιμές, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι η καταναλισκόμενη γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την αύξηση της βιομάζας των μυκήτων και δευτερευόντως για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, καθώς οι τιμές του συντελεστή $Y_{EPS/Glc}$ ήταν αρκετά χαμηλές. Μάλιστα, όπως φαίνεται και στο παρακάτω Γράφημα II.1 που αποτυπώνει τη διακύμανση των



Γράφημα II.1 Διακύμανση των παραμέτρων $Y_{EPS/Glc}$ και $Y_{X/Glc}$ κατά τη 12^η ημέρα καλλιέργειας των 11 μακρομυκήτων στα 4 υποστρώματα (GPYS, GYS, MCM, GPS) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *Volvariella volvacea*) υπό ανάδευση (120 ± 5 rpm)

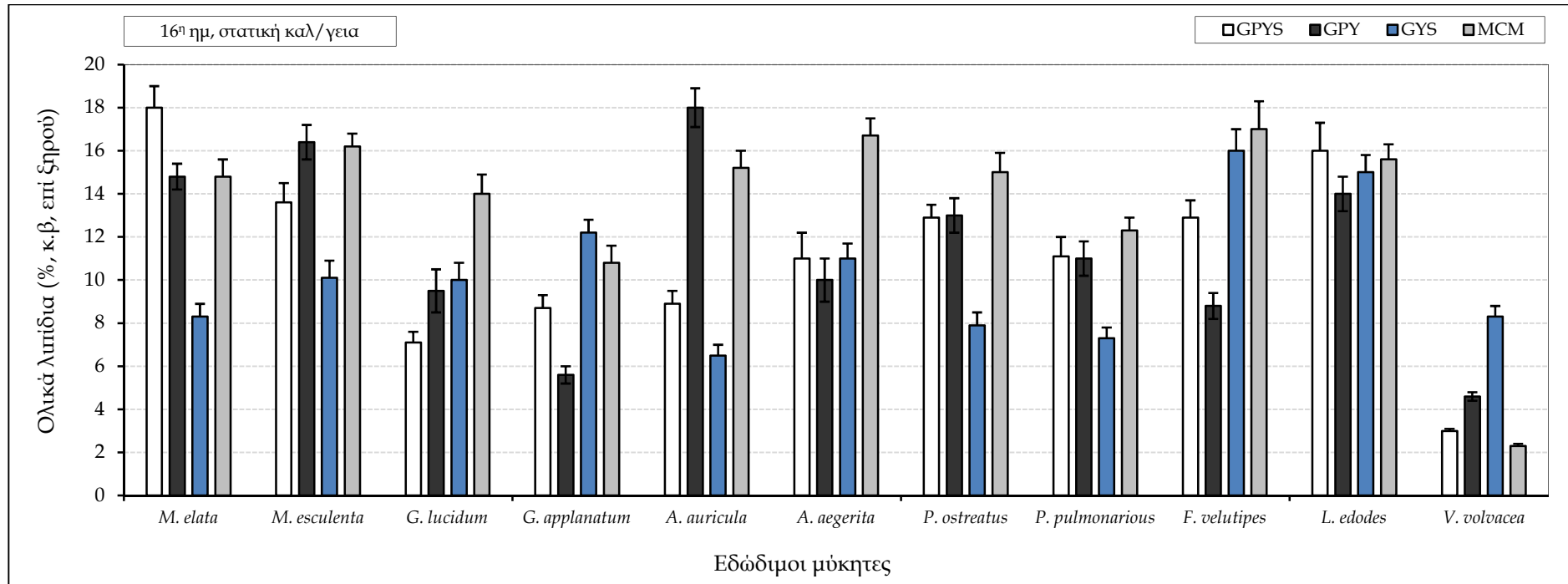
παραμέτρων $Y_{EPS/Glc}$ και $Y_{X/Glc}$ (στις 12 ημέρες υπό ανάδευση), αυτές ακολουθούν αντίστροφη πορεία, με μεγιστοποίηση της $Y_{EPS/Glc}$ σε χαμηλές τιμές $Y_{X/Glc}$ και αντίστροφα.

Σε ό,τι αφορά τη σύνθεση των ολικών λιπιδίων (g/l), η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε σημαντική επίδραση τόσο της διάρκειας της καλλιέργειας και της ανάδευσης, όσο και της σύνθεσης του θρεπτικού μέσου. Γενικά, όπως φαίνεται και στους Πίνακες III.1α,β και III.2α,β, σημαντικά μεγαλύτερες τιμές καταγράφηκαν υπό ανάδευση τη 16^η ημέρα της καλλιέργειας στα περισσότερα θρεπτικά μέσα και στους περισσότερους μύκητες, δηλαδή σε συνθήκες που ευνοούν την μεγιστοποίηση της παραγόμενης βιομάζας. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι το πιο κατάλληλο θρεπτικό μέσο σε απόλυτες τιμές (g/l) ήταν το GPYS, ακολουθούμενο με σημαντική διαφορά από τα GYS και MCM. Κατά τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας, οι 11 εξεταζόμενοι μακρομύκητες παρήγαγαν μικρές ποσότητες λιπιδίων (0,02-1,34 g/l στις στατικές και 0,14-2,42 g/l στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες), ενώ η αύξηση της βιομάζας τους τη 16^η ημέρα οδήγησε σε αύξηση της ποσότητας των ολικών λιπιδίων (0,06-1,55 g/l στις στατικές και 0,21-2,30 g/l στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες). Αναλυτικότερα, με βάση την μέση παραγωγή λιπιδίων (g/l) σε όλα τα θρεπτικά μέσα (στις 16 ημέρες υπό ανάδευση), οι μύκητες που μελετήθηκαν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με αύξουσα σειρά σε 2 ομάδες; (α) σε αυτούς που παρήγαγαν ολικά λιπίδια λιγότερα από 1 g/l: *L. edodes* < *V. volvacea* < *A. aegerita* < *M. elata* < *G. applanatum* < *A. auricula-judae* < *F. velutipes* < *P. ostreatus* και (β) σε αυτούς που παρήγαγαν περισσότερο από 1 g/l: *P. pulmonarius* < *M. esculenta* < *G. lucidum*.

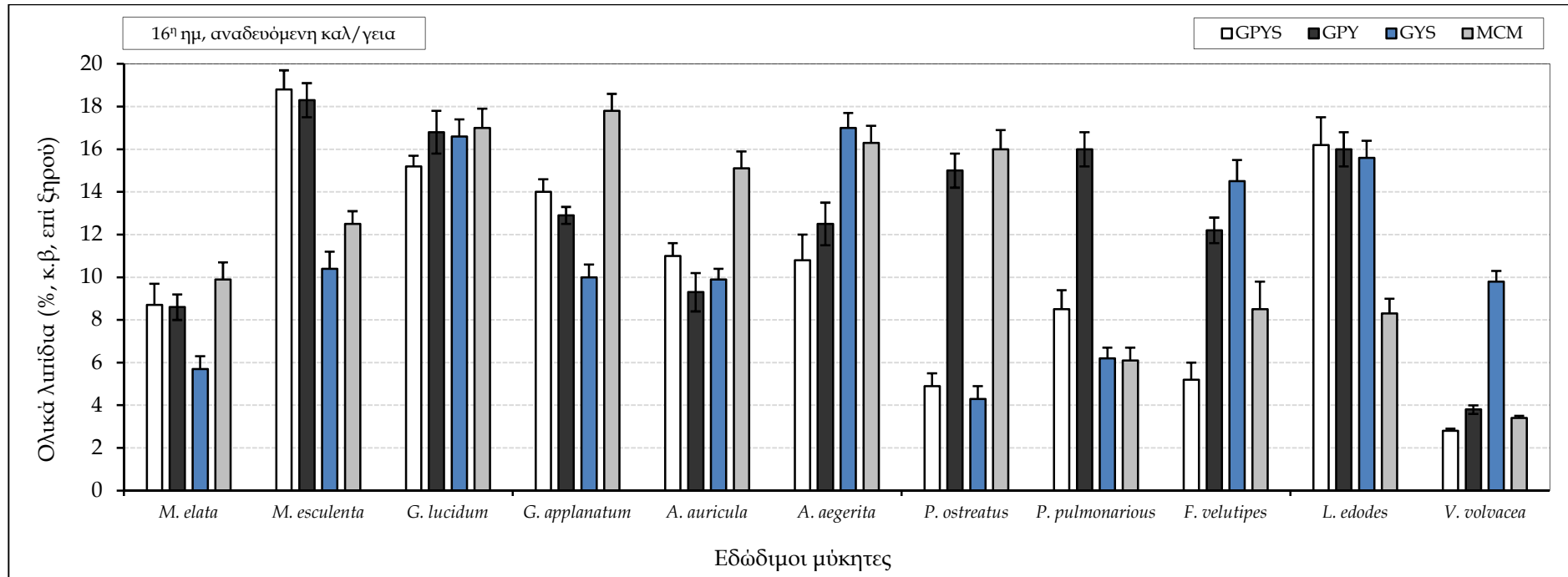
Σε ό,τι αφορά την περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιπίδια (% , κ.β.), φαίνεται πως συνολικά υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας σε σχέση με τη 16^η,

δεικνύοντας πιθανή αποικοδόμησή τους, με τις τιμές να κυμαίνονται από 4,4 έως 23,1% (12^η) και 2,3 έως 18,0%, κ.β. (16^η ημέρα). Ακόμα, η ανάδευση δεν ευνόησε τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών λιπιδίων τη 12^η ημέρα, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων (π.χ. στους μύκητες *M. esculenta*, *G. lucidum* στο GPYS, *P. pulmonarius* και *L. edodes* στο GPY, *G. applanatum* και *G. lucidum* στο GYS και *L. edodes* και *G. applanatum* στο MCM). Σε τιμές % κ.β. ξηρής βιομάζας το υπόστρωμα GPY έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, ακολουθούμενο από το MCM. Στο Διάγραμμα III.2.α,β, όπου δίνεται η συγκέντρωση (% κ.β. επί ξηρού) των ολικών λιπιδίων των μυκηλίων μετά από ανάπτυξη των μακρομυκήτων στα τέσσερα υποστρώματα τη 16^η ημέρα της καλλιέργειας σε στατικές και αναδευόμενες συνθήκες, φαίνεται ακόμα ότι ορισμένοι μακρομύκητες π.χ. οι *G. lucidum*, *G. applanatum* ευνοήθηκαν σημαντικά από την ανάδευση, καθώς οι τιμές των % κ.β. λιπιδίων τους σχεδόν διπλασιάστηκαν στις αναδευόμενες φιάλες σε σύγκριση με τις στατικές, ενώ άλλοι π.χ. οι *M. elata*, *F. velutipes* παράγαγαν περισσότερα λιπίδια υπό στατική κατάσταση. Γενικά, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια παρουσίασαν με φθίνουσα σειρά οι *A. aegerita* < *G. lucidum* < *L. edodes*. Ειδικότερα για τον τελευταίο μακρομύκητα, η σημαντική ποσότητα % κ.β. ολικών λιπιδίων (~20-23%) που παρουσίασε τόσο σε στατική όσο και αναδευόμενη καλλιέργεια θα μπορούσε να αποδοθεί και στη μικρή ποσότητα παραγόμενης βιομάζας του.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα III.4, στις καλλιέργειες (στατικές και αναδευόμενες) που πραγματοποιήσαν οι 11 μακρομύκητες στο θρεπτικό μέσο GPYS τη 16^η ημέρα, τα ακόρεστα ΛΟ αποτέλεσαν το ~74%, κ.β. των ολικών λιπαρών οξέων τους, ενώ τα κορεσμένα μόνο το ~26%, κ.β.. Τα γένη των μυκήτων με το πιο υψηλό ποσοστό ακόρεστων ΛΟ ήταν τα *M. elata*, *G. applanatum*, *P. pulmonarius* (σε στατικές και αναδευόμενες καλλιέργειες), τα *L. edodes*, *A. aegerita* και *A. auricula-judae* (σε αναδευόμενες) και το *P. ostreatus* (σε στατικές). Αντίθετα, τα λιπίδια του *V. voluacea* περιείχαν 49% κορεσμένα ΛΟ, του *M. esculenta* 38% και του *F. velutipes* 33%, κ.β.. Ως αποτέλεσμα, ο λόγος κορεσμένων/ακόρεστων ΛΟ κυμάνθηκε από ~1,0 (στον *V. voluacea*) με ~4,0 (σε *M. elata*, *A. aegerita*, *A. auricula*, *P. ostreatus*), ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 9,20 (στον *L. edodes*). Σε ό,τι αφορά τα ακόρεστα ΛΟ, η λιπιδιακή ανάλυση έδειξε ότι η ποσότητα του $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ προσδιορίστηκε από 74,1 έως 83,5% κ.β. στον *L. edodes*, 73,4% στον *P. ostreatus*, 72,9% στον *G. lucidum*, 70,0% στον *A. auricula-judae* και 67,4%, κ.β. στον *G. applanatum*. Όταν το $\Delta^9\text{C18:1}$ παράχθηκε σε σημαντικές ποσότητες, όπως στις αναδευόμενες καλλιέργειες των *M. esculenta* και *A. aegerita*, το $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ παρουσιάστηκε ελαττωμένο στα ποσοστά 27,3 και 38,2% αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, το $\Delta^9\text{C18:1}$ στους μακρομύκητες *L. edodes*, *P. ostreatus* και *G. lucidum* ανιχνεύτηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1,4-7,4% κ.β.). Από τα κορεσμένα ΛΟ, κυρίαρχη



Γράφημα III.2α Μέσες τιμές ολικών λιπιδίων (% κ.β. επί ξηρού) μυκηλίων παραγόμενων από 11 είδη μακρομυκήτων που έχουν καλλιεργηθεί στα θρεπτικά μέσα GPYS, GPY, GYS και MCM για 16 ημέρες υπό στατικές συνθήκες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella volvacea*). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (τυπική απόκλιση <math><5\%</math>)



Γράφημα III.2β Μέσες τιμές ολικών λιπιδίων (% κ.β. επί ξηρού) μυκηλίων παραγόμενων από 11 είδη μακρομυκήτων που έχουν καλλιεργηθεί στα θρεπτικά μέσα GPYS, GPY, GYS και MCM για 16 ημέρες υπό αναδεδόμενες (120±5 rpm) συνθήκες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella voluacea*). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (τυπική απόκλιση <5%)

θέση είχε το παλμιτικό (C16:0) με το ποσοστό του να κυμαίνεται από 12,4 έως 28,4% κ.β. ανάλογα το είδος του μύκητα και μόνο στις αναδεδόμενες καλλιέργειες του *L. edodes* το ποσοστό του εμφανίστηκε μειωμένο στο 4,5%. Το στεατικό (C18:0) υπήρχε σε πολύ μικρότερα ποσοστά (π.χ. <4%, κ.β.), με εξαίρεση τα λιπίδια των μακρομυκήτων *M. elata*, *M. esculenta*, *G. lucidum* και *A. auricula-judae* στα οποία διαπιστώθηκαν υψηλότερες ποσότητες. Άλλα ΛΟ, όπως τα καπρυλικό (C8:0), καπρικό (C10:0), λαυρικό (C12:0) και αραχιδικό (C20:0) αποτέλεσαν το 2 με 5,5%, κ.β. των λιπιδίων της πλειοψηφίας των μακρομυκήτων που εξετάστηκαν, με εξαίρεση τον *V. voluacea* όπου το ποσοστό αυτό έφτασε το 16-20% κ.β..

Ενδιαφέρον και διαφορετικό από αυτό των άλλων στελεχών ήταν το προφίλ της ανάλυσης των ΛΟ του *V. voluacea*, καθώς αξιοσημείωτες ποσότητες κορεσμένων ΛΟ μικρής ή μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (π.χ. C8:0, C10:0, C20:0) παράχθηκαν σε στατική και αναδεδόμενη καλλιέργεια. Επίσης, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στη σύσταση των ΛΟ των λιπιδίων στα διάφορα είδη εδώδιμων μυκήτων γεγονός που μας οδήγησε στη διαπίστωση ότι αυτή εξαρτάται από το γένος ή και το είδος του μύκητα. Τέλος, τα δεδομένα δείχνουν ότι η ανάδευση ευνόησε την ακορεστότητα στα λιπίδια, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ακόρεστων ΛΟ στις καλλιέργειες πολλών μακρομυκήτων, όπως π.χ. στους *L. edodes*, *G. lucidum*, *A. auricula-judae* και *A. aegerita*. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι μύκητες *M. esculenta*, *V. voluacea* και *F. velutipes* οι οποίοι παρήγαγαν περισσότερο κορεσμένα ΛΟ υπό αναδεδόμενες συνθήκες.

Πίνακας III.4 Ανάλυση των λιπαρών οξέων (ΛΟ, %, κ.β.) των ολικών λιπιδίων που παράχθηκαν από 11 γένη μακρομυκήτων τη 16^η ημέρα της καλλιέργειας τους στο θρεπτικό μέσο GPYS σε στατικές και αναδεδόμενες (120±5 g/m) συνθήκες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella volvacea*)

Είδη μυκήτων/ ΛΟ (% κ.β.)		<i>M. elata</i>	<i>M. esculenta</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>A. auricula</i>	<i>A. aegerita</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. pulmonarius</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. edodes</i>	<i>V. volvacea</i>
Στατικές καλ/γείες	C14:0	-	-	1,0	1,0	-	-	-	-	0,3	-	1,5
	C16:0	12,4	18,4	16,5	16,4	15,4	23,0	12,9	18,8	15,6	17,5	14,8
	Δ ⁹ C16:1	0,3	-	-	-	-	-	1,7	-	0,3	-	-
	C18:0	5,6	7,2	12,5	1,1	11,0	0,8	2,6	3,4	4,1	1,6	5,0
	Δ ⁹ C18:1	28,0	29,0	11,6	9,0	10,3	24,5	5,7	19,7	14,7	1,4	3,3
	Δ ^{9,12} C18:2	51,5	41,9	56,1	67,4	60,6	49,8	73,4	55,7	61,3	74,1	54,6
	Λοιπά*	2,2	3,5	2,3	5,1	2,7	1,9	3,7	2,4	3,7	5,4	20,8
Αναδεδόμενες καλ/γείες	C14:0	-	-	0,8	0,8	0,3	-	0,3	-	-	0,7	2,1
	C16:0	16,6	23,8	14,6	14,8	13,0	17,2	13,4	14,3	28,4	4,5	23,1
	Δ ⁹ C16:1	1,1	-	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-
	C18:0	4,5	9,0	1,0	1,6	5,2	1,2	4,9	5,8	1,0	0,3	6,2
	Δ ⁹ C18:1	17,3	35,1	5,6	8,4	7,6	41,8	11,3	16,2	17,2	7,4	3,2
	Δ ^{9,12} C18:2	58,4	27,3	72,9	66,3	70,0	38,2	65,2	61,1	49,4	82,8	48,2
	Λοιπά	2,1	4,8	5,1	3,5	3,9	1,6	4,9	2,6	4,0	4,3	17,2

*Λοιπά ΛΟ: κυρίως C8:0, C:10, C12:0, C20:0

Επιπλέον, το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων που υπάρχει στα λιπαρά οξέα που προσδιορίστηκαν χρωματογραφικά για το κάθε είδος μύκητα μπορεί να υπολογιστεί μέσω του δείκτη ακορεστότητας (unsaturation index - U.I.). Αυτός ορίζεται ως εξής:

$$U.I. = [\% \text{ monoene} + 2 (\% \text{ diene}) + 3 (\% \text{ triene})]/100$$

Στον Πίνακα III.5 καταγράφονται οι τιμές του U.I. των ΛΟ των έντεκα ανώτερων μυκήτων που παράχθηκαν στο υπόστρωμα GPYS τη 16^η ημέρα της καλλιέργειάς τους σε στατική και αναδεδόμενη κατάσταση. Παρατηρείται ότι ο συγκεκριμένος δείκτης είναι αρκετά υψηλός και κυμαίνεται στις στατικές φιάλες από 1,13 (μύκητες *M. esculenta*, *V. volvacea*) μέχρι 1,54 (*P. ostreatus*) και στις αναδεδόμενες από 0,90 (*M. esculenta*) μέχρι 1,73 (*L. edodes*). Κατά συνέπεια και σε συμφωνία με τον παραπάνω Πίνακα III.4, οι μακρομύκητες με τη μεγαλύτερη ποσότητα ακόρεστων ΛΟ ήταν οι *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. applanatum*, *G. lucidum* και *A. auricula-judae*, ενώ αυτοί με τα περισσότερα κορεσμένα ΛΟ ήταν οι *V. volvacea*, *M. esculenta*, *A. aegerita* και *F. velutipes*. Τέλος, φαίνεται ότι η ανάδευση σε κάποιες καλλιέργειες αύξησε τον U.I. (π.χ. μύκητας *L. edodes*), ενώ σε άλλες είχε αρνητική (π.χ. *F. velutipes*) ή καμία επίδραση (π.χ. *M. elata*).

Πίνακας III.5 Δείκτης ακορεστότητας (U.I.) των λιπαρών οξέων των 11 μακρομυκήτων που βιοσυντέθηκαν στο υπόστρωμα GPYS τη 16^η ημέρα της καλλιέργειάς στους σε στατικές (Σ) και αναδεδόμενες (Α) φιάλες (120±5 rpm) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella volvacea*)

Είδος μύκητα	U.I.	
	Σ	Α
<i>M. elata</i>	1,31	1,35
<i>M. esculenta</i>	1,13	0,90
<i>A. aegerita</i>	1,24	1,18
<i>P. ostreatus</i>	1,54	1,42
<i>P. pulmonarius</i>	1,31	1,38
<i>F. velutipes</i>	1,37	1,16
<i>A. auricula-judae</i>	1,32	1,48
<i>L. edodes</i>	1,50	1,73
<i>G. lucidum</i>	1,24	1,51
<i>G. applanatum</i>	1,44	1,41
<i>V. volvacea</i>	1,13	1,00

III.3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ GPYS

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα του προηγούμενου κεφαλαίου, πραγματοποιήθηκε επιλογή κατά την οποία οι μακρομύκητες *A. aegerita* AMRL 104, *F. velutipes* AMRL 271, *G. applanatum* AMRL 341, *M. esculenta* AMRL 36, *P. pulmonarius* AMRL 177 και *V. voluacea* AMRL 190 καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα GPYS ($Glc_0=30$ g/l), με τις ζυμώσεις να επεκτείνονται μέχρι και τις 24 ημέρες προκειμένου να αυξηθεί περαιτέρω η κατανάλωση γλυκόζης και η παραγωγή μικροβιακής μάζας από τα υπό μελέτη στελέχη. Επίσης, στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη κινητική ανάλυση της αύξησης των μικροοργανισμών τόσο σε στατικές όσο και σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες, ενώ μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε πέρα από τις παραμέτρους X (g/l), EPS (g/l) και L (g/l) που παρουσιάστηκαν από το κεφάλαιο III.2 και η παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών (IPS, g/l) οι οποίοι παράγονται κατά την αύξηση των μυκήτων.

Πριν τον εμβολιασμό του υγρού θρεπτικού μέσου των καλλιεργειών (GPYS) με τον εκάστοτε μακρομύκητα, μετρήθηκε το αρχικό pH, η τιμή του οποίου ήταν $\sim 6,0$. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των έξι στελεχών παρατηρήθηκε σε ορισμένες καλλιέργειες αύξηση της τιμής του (π.χ. στον *A. aegerita*, $pH=6-7$), ενώ σε κάποιες άλλες μείωση (*G. applanatum*, $pH=5-6$) ή μικρή διακύμανση (*F. velutipes*, $pH=5,8-6,2$; *V. voluacea*, $pH=5,6-6,1$). Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές του pH των καλλιεργειών κυμάνθηκαν από 5,5 έως 7,0.

Στον Πίνακα III.6α,β δίνονται συνοπτικά κινητικά δεδομένα της καλλιέργειας όπου οι μακρομύκητες σημείωσαν (α) τη μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.), (β) τη μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l) και (γ) τη μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l) κατά την αύξησή τους σε στατικές και σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Με βάση τα δεδομένα του παρακάτω πίνακα, φαίνεται ότι η ανάδευση κατά τη διεργασία της ζύμωσης είχε επίδραση στην παραγωγή βιομάζας των εξεταζόμενων μακρομυκήτων ανάλογα με το στέλεχος. Έτσι, η ανάδευση σαφώς ευνόησε την παραγωγή βιομάζας στους μύκητες *F. velutipes* και *P. pulmonarius*, ενώ μικρότερη επίδραση παρατηρήθηκε για τους μύκητες *A. aegerita* και *M. esculenta* και καθόλου για τον *V. voluacea*. Από την άλλη πλευρά, ο μύκητας *G. applanatum* παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές παραγόμενης βιομάζας και καταναλωθείσας γλυκόζης κατά την αύξηση του σε συνθήκες ακινησίας. Περαιτέρω, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιμήκυνση του χρόνου ζύμωσης για πολλές από τις πραγματοποιηθείσες καλλιέργειες είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της κατανάλωσης της γλυκόζης και αύξηση της παραγόμενης βιομάζας (π.χ. στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες των *F. velutipes* και *P. pulmonarius* η παραγόμενη ποσότητα ξηρής βιομάζας ήταν πραγματικά

Πίνακας III.6α Παράμετροι αύξησης επιλεγμένων μακρομυκήτων σε υγρή καλλιέργεια (υπόστρωμα GPYS) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη ($Glc_0=30$ g/l), στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *Volvariella volvacea*) υπό στατικές συνθήκες

Είδος μακρομύκητα	Χρόνος (ημ)		X (g/l)	L (g/l)	Glc _c (g/l)	IPS (g/l)	Y _{L/X} (% κ.β.)	Y _{IPS/X} (% κ.β.)
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	α	1,26	0,26	3,1	0,32	20,63	25,40
	24 ^η	β,γ	9,10	0,88	10,5	5,50	9,67	60,44
<i>F. velutipes</i>	11 ^η	α	3,33	0,63	6,3	1,33	18,92	39,94
	24 ^η	β,γ	12,08	1,80	24,1	5,47	14,90	45,29
<i>G. applanatum</i>	12 ^η	α	5,93	0,60	8,2	2,30	10,12	38,78
	24 ^η	β,γ	15,40	1,08	30,0	6,30	7,02	40,91
<i>M. esculenta</i>	16 ^η	α	9,91	1,97	27,1	3,10	19,88	31,28
	20 ^η	β,γ	12,70	1,60	29,0	3,86	12,60	30,39
<i>P. pulmonarius</i>	11 ^η	α	3,00	0,59	3,8	1,20	19,67	40,00
	24 ^η	β,γ	13,90	1,03	16,5	6,10	7,41	43,88
<i>V. volvacea</i>	8 ^η	α	6,9	0,59	7,5	2,02	8,50	29,28
	16 ^η	β	15,13	0,52	23,8	5,45	3,41	36,02
	24 ^η	γ	16,00	0,43	29,0	3,55	2,71	22,19

X: Η παραγόμενη βιομάζα (g/l), L: το παραγόμενο λίπος (g/l), Glc_c: η καταναλωθείσα ποσότητα της γλυκόζης (g/l), IPS: οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/l), Y_{L/X}: το ποσοστό συνολικού λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.), Y_{IPS/X}: το ποσοστό συνολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

α: μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.)

β: μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l)

γ: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)

σημαντική π.χ. $X \geq 20$ g/l), ενώ επίσης σε πολλές περιπτώσεις ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς την αναλωθείσα γλυκόζη για το συγκεκριμένο σημείο της

κινητικής ($Y_{X/Glc} = \frac{X}{Glc_{cons}}$) (π.χ. *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *A. aegerita*,) ήταν πολύ υψηλός

φθάνοντας (ή και ξεπερνώντας) τιμές $\sim 0,7$ g/g. Ωστόσο και σε άλλες καλλιέργειες (π.χ. στους μακρομύκητες *V. volvacea*, *M. esculenta*, *G. applanatum*) η ποσότητα της παραχθείσας ξηρής βιομάζας ήταν σημαντική ($X \sim 13-16$ g/l, $Y_{X/Glc} = 0,45-0,60$). Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις (καλλιέργεια των μυκήτων *P. pulmonarius*, *A. aegerita*) ο συνολικός συντελεστής βιομετατροπής $Y_{X/Glc}$ που υπολογίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης ήταν πραγματικά εντυπωσιακός (0,8-0,9 g/g) ανεξαρτήτως από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης στη ζύμωση (Γράφημα III.3). Επιπλέον, στα παρακάτω Γραφήματα III.4α,β όπου δίνεται ενδεικτικά η κινητική εξέλιξης της παραγόμενης βιομάζας και της αναλωθείσας γλυκόζης για τους

Πίνακας III.6β Παράμετροι αύξησης επιλεγμένων μακρομυκήτων σε υγρή καλλιέργεια (υπόστρωμα GPYS) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη ($\text{Glc}_0=30 \text{ g/l}$), στους $26\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ($32\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ για τον *Volvariella voluacea*) υπό αναδεδόμενες ($120\pm 5 \text{ rpm}$) συνθήκες

Είδος μακρομύκητα	Χρόνος (ημ)		X (g/l)	L (g/l)	Glc _c (g/l)	IPS (g/l)	Y _{L/X} (% κ.β.)	Y _{IPS/X} (% κ.β.)
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	α	6,82	0,87	5,5	1,81	12,75	26,54
	24 ^η	β,γ	10,50	1,26	13,2	5,80	11,80	55,24
<i>F. velutipes</i>	8 ^η	α	2,01	0,28	3,85	0,45	13,93	22,37
	20 ^η	β,γ	19,87	1,79	29,2	7,50	9,01	37,74
<i>G. applanatum</i>	8 ^η	α	2,20	0,37	7,2	0,50	16,82	22,73
	24 ^η	β	13,06	1,10	23,5	5,89	8,42	45,10
	20 ^η	γ	13,34	1,60	23,0	5,88	11,99	44,09
<i>M. esculenta</i>	12 ^η	α	9,32	2,10	21,4	2,40	22,54	25,76
	16 ^η	β,γ	13,59	2,30	29,7	3,78	16,92	27,85
<i>P. pulmonarius</i>	8 ^η	α	3,96	0,71	3,5	0,78	17,93	19,69
	24 ^η	β,γ	22,50	3,70	24,1	10,90	16,45	48,44
<i>V. voluacea</i>	11 ^η	α	8,10	1,03	8,6	3,03	12,70	37,41
	14 ^η	β	14,10	0,67	22,7	5,60	4,80	40,00
	24 ^η	γ	16,00	0,46	29,0	4,00	2,90	25,00

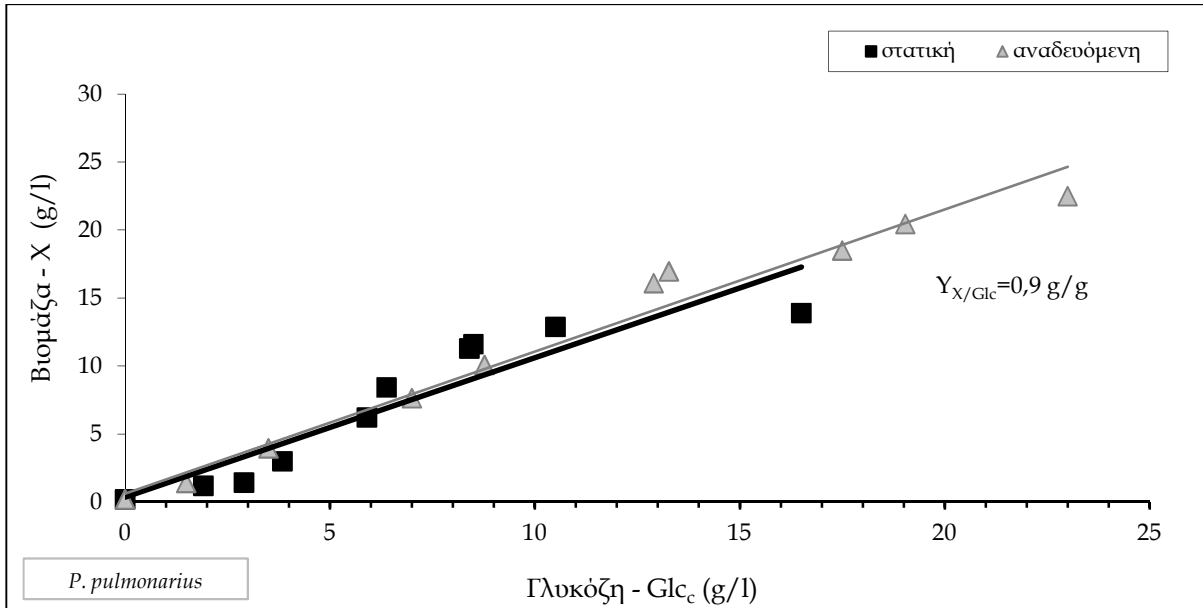
X: Η παραγόμενη βιομάζα (g/l), L: το παραγόμενο λίπος (g/l), Glc_c: η καταναλωθείσα ποσότητα της γλυκόζης (g/l), IPS: οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/l), Y_{L/X}: το ποσοστό συνολικού λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.), Y_{IPS/X}: το ποσοστό συνολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

α: μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.)

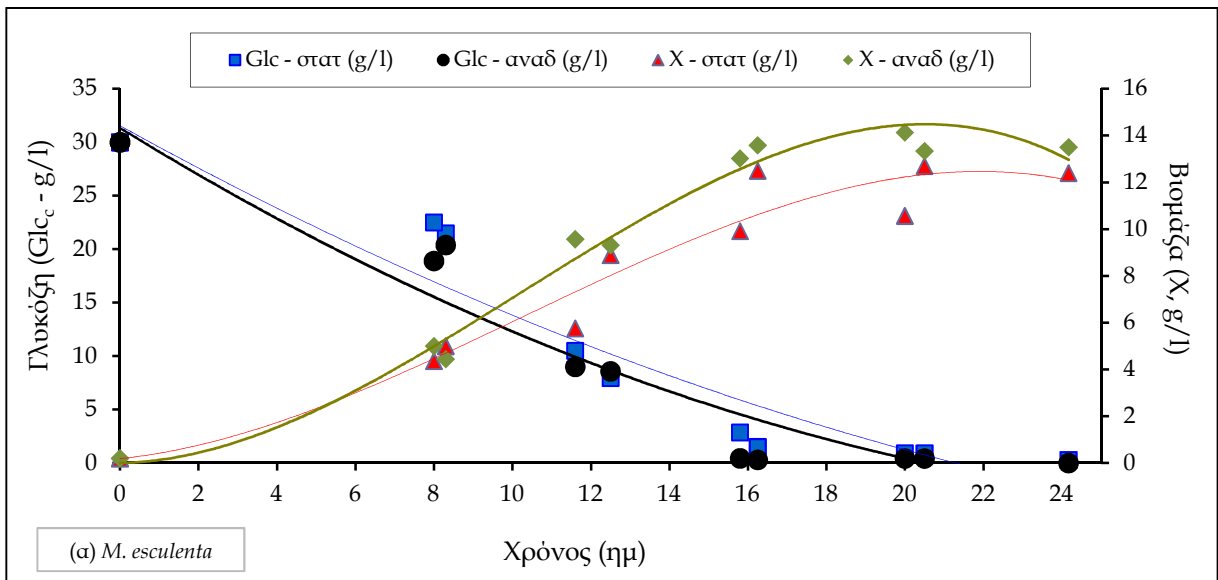
β: μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l)

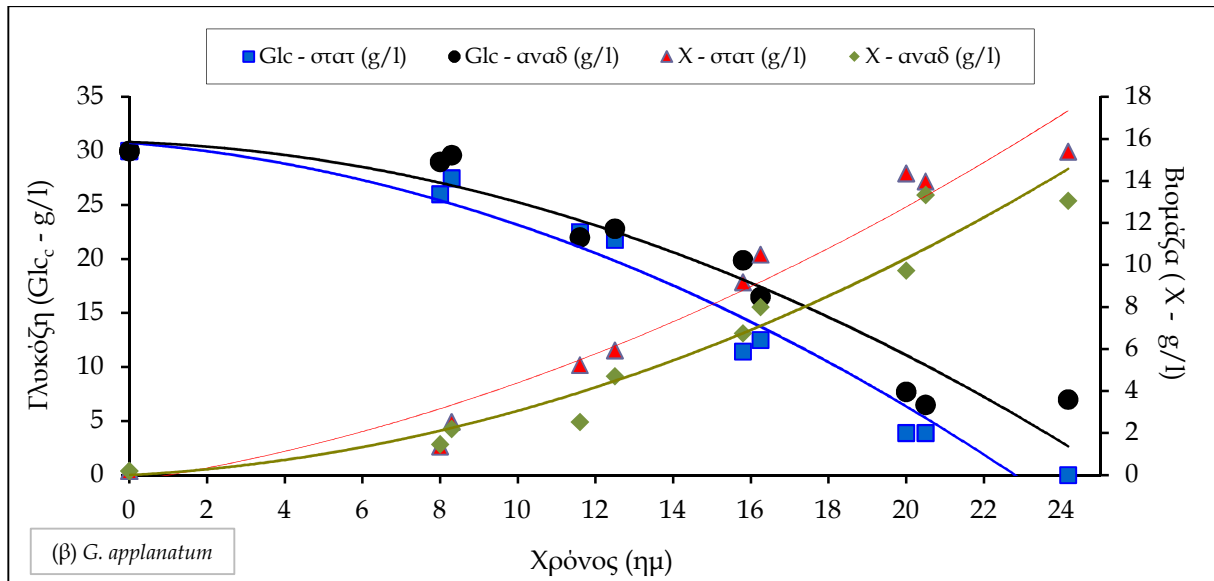
γ: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)

M. esculenta και *G. applanatum* αντίστοιχα, γίνεται αντιληπτό ότι αυτές ήταν σχεδόν ταυτόσημες, τόσο στις αναδεδόμενες όσο και στις στατικές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, κατά την αύξηση του *M. esculenta* (Γράφημα III.4α) παρατηρείται ότι η παραγωγή βιομάζας υπήρξε ταχεία μέχρι την 20^η ημέρα της καλλιέργειας όπου και παρουσίασε 'πλατώ' και ταυτόχρονα η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν σχεδόν ολική ήδη από τη 16^η ημέρα, ενώ η ανάδευση ενόησε την παραγωγή μυκηλιακής μάζας σε όλα τα στάδια της κινητικής. Οι συνολικοί συντελεστές $Y_{X/\text{Glc}}$ ήταν 0,38 για τη στατική και 0,45 για την αναδεδόμενη καλλιέργεια αντίστοιχα. Αντίθετα, στον *G. applanatum* (Γράφημα III.4β) η παραγωγή μυκηλιακής μάζας και η κατανάλωση σακχάρου ευνοήθηκαν σαφώς κατά τις στατικές σε σχέση με τις αναδεδόμενες καλλιέργειες. Η κινητική του μακρομύκητα *G. applanatum* στις στατικές και αναδεδόμενες φιάλες, δεικνύει τη συνεχή αύξηση στην παραγωγή βιομάζας



Γράφημα III.3 Παραγόμενη μυκηλιακή μάζα (X - g/l) ως συνάρτηση της αναλωθείσας γλυκόζης (Glc_c g/l) κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Pleurotus pulmonarius* στο θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_o=30$ g/l), σε στατικές και αναδευόμενες (120 ± 5 rpm) φιάλες, σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων





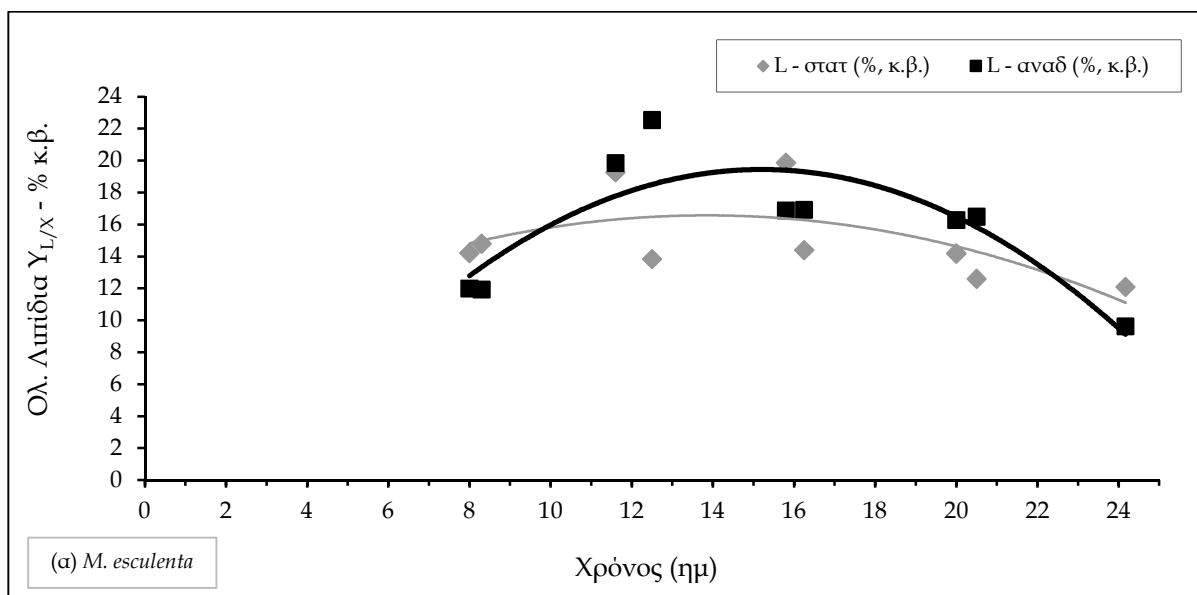
Γράφημα III.4α,β Κινητική παραγόμενης μυκηλιακής μάζας ($X - g/l$) και καταναλωθείσας γλυκόζης ($Glc - g/l$) κατά την αύξηση των μακρομυκήτων (α) *Morchella esculenta* και (β) *Ganoderma applanatum* σε στατικές και αναδεδόμενες φιάλες στους 26 ± 1 °C σε θρεπτικό μέσο GPYS με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτητών πειραμάτων

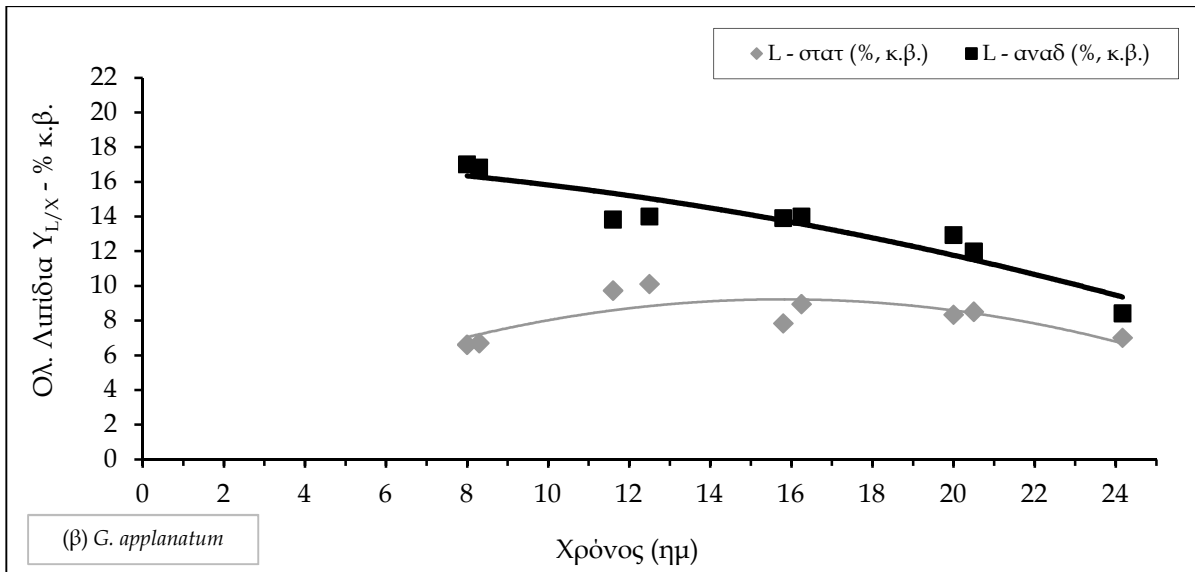
μέχρι το τέλος της ζύμωσης, με αντίστοιχα ικανοποιητική κατανάλωση γλυκόζης (~75% της Glc_0 καταναλώθηκε στην ανακινούμενες και 87-100% στη στατικές φιάλες στα τελευταία σημεία της κινητικής). Ο συνολικός συντελεστής απόδοσης $Y_{X/Glc}$ ήταν 0,51 (τόσο στη στατική όσο και στην αναδεδόμενη καλλιέργεια).

Περαιτέρω, η κινητική μελέτη της σύνθεσης μικροβιακών λιπιδίων από τα εξεταζόμενα στελέχη έδειξε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις παράχθηκαν μη-αμελητέες ποσότητες λιπιδίων σε απόλυτες τιμές (g/l) (π.χ. $L=3,7$ g/l - *P. pulmonarius*), κυρίως σε ό,τι αφορά στις αναδεδόμενες καλλιέργειες (Πίνακας III.6α,β). Πράγματι, οι χαμηλές τιμές των λιπιδίων που συντέθηκαν στις στατικές φιάλες (έως ~2 g/l) αυξήθηκαν σημαντικά κατά την ανάδευση στις περισσότερες καλλιέργειες των μακρομυκήτων που εξετάστηκαν, με χαρακτηριστικότερη την περίπτωση του *P. pulmonarius* όπου το L (g/l) σχεδόν τετραπλασιάστηκε.

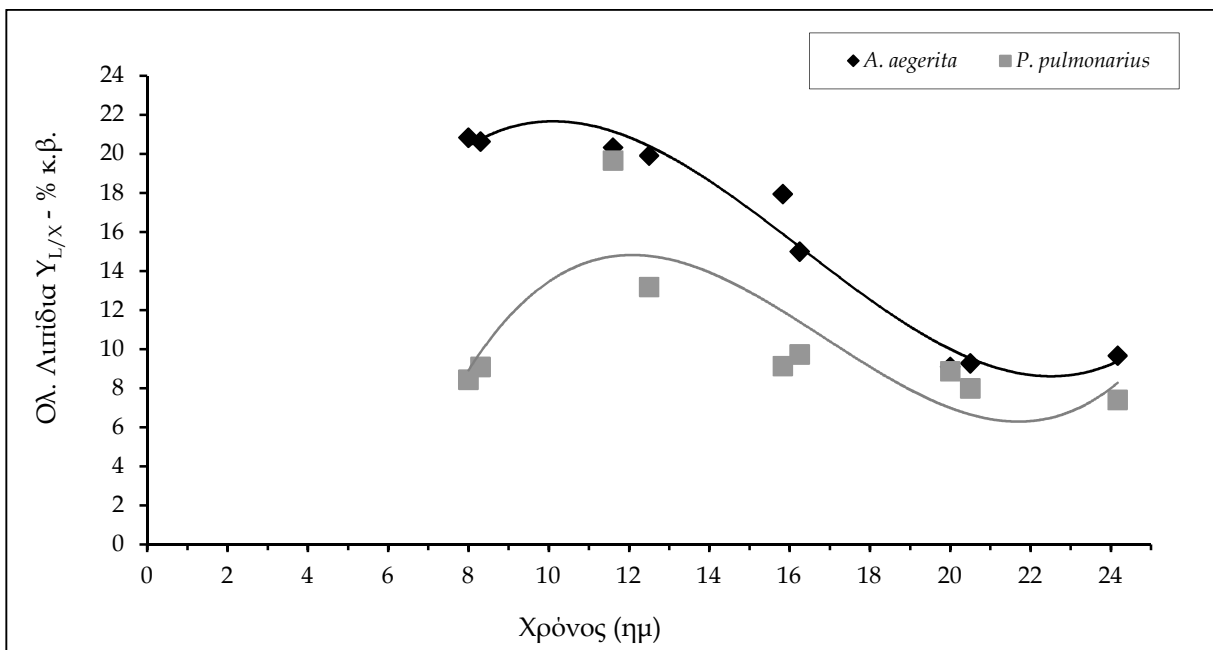
Από την άλλη πλευρά, οι ποσότητες των κυτταρικών λιπιδίων επί ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/X}$, % κ.β.) επηρεάστηκαν από την ανάδευση ανάλογα με το είδος του μακρομυκήτα (Πίνακας III.6α,β), καθώς εμφανίστηκαν αυξημένες αφενός στις αναδεδόμενες φιάλες των *G. applanatum*, *M. esculenta*, *V. voluacea* (έως 22,5%, κ.β.), αφετέρου στις στατικές των *A. aegerita*, *F. velutipes* και *P. pulmonarius* (έως 20,5%, κ.β.). Ακόμα, η βιοσύνθεση των λιπιδίων πραγματοποιείται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των μακρομυκήτων στο μέσο

καλλιέργειας (έως 12^η ημέρα) ανεξάρτητα της εφαρμογής ή όχι ανάδευσης, ενώ και στους έξι μακρομύκητες η ποσότητα του συνολικού μικροβιακού λίπους επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/X}$, % κ.β.) μειωνόταν (ενίοτε κατά τρόπο αρκετά αξιοσημείωτο) ήδη από τα σχετικά πρώιμα στάδια της καλλιέργειας, χωρίς η μείωση αυτή (ήτοι η ανακατανάλωση των κυτταρικών λιπιδίων) να συνάδει με μειωμένες συγκεντρώσεις υποστρώματος στο περιβάλλον της αύξησης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σε ορισμένες από τις καλλιέργειες η βιοσύνθεση λιπιδίων (% επί ξηρού κ.β.) ευνοήθηκε με την ανάδευση της καλλιέργειας. Χαρακτηριστικές είναι οι περιπτώσεις των μακρομυκήτων *M. esculenta* και *G. arplanatum* οι κινητικές των οποίων δίνονται στο Γράφημα III.5α και β αντίστοιχα. Στις καλλιέργειες αυτές, όπως και στην πλειονότητα των υπόλοιπων μακρομυκήτων, η ποσότητα του συνολικού μικροβιακού λίπους επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/X}$, % κ.β.) μειωνόταν στην πορεία της καλλιέργειας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποικοδόμησης του ενδοκυτταρικού λίπους παρουσιάζονται για τους μακρομύκητες *P. pulmonarius* και *A. aegerita* κατά την αύξησή τους σε στατικές καλλιέργειες στο Γράφημα III.6.





Γράφημα III.5α,β Κινητική εξέλιξης των κυτταρικών λιπιδίων προς τη ξηρά μυκηλιακή μάζα ($Y_{L/X}$ - %, κ.β.) κατά την αύξηση των μακρομυκητών (α) *Morchella esculenta* και (β) *Ganoderma applanatum* σε στατικές και αναδεδόμενες καλλιέργειες στους 26 ± 1 °C στο θρεπτικό μέσο GPYS με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων



Γράφημα III.6 Κινητική εξέλιξη του κυτταρικών λιπιδίων προς τη ξηρά μυκηλιακή μάζα ($Y_{L/X}$ - % κ.β.) κατά την αύξηση των μακρομυκητών *Pleurotus pulmonarius* και *Agrocybe aegerita* σε στατικές καλλιέργειες στους 26 ± 1 °C στο θρεπτικό μέσο GPYS με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις (βλ. Πίνακα III.6α,β) όπου η σύνθεση μέγιστων συνολικών λιπιδίων ήταν σχετικά περιορισμένη, η αντίστοιχη τιμή των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (ανά g ξηράς μυκηλιακής μάζας) ήταν αρκετά υψηλή. Χαρακτηριστικές είναι οι περιπτώσεις των *F. velutipes*, *G. applanatum* και *V. voluacea* κυρίως στις αναδεδόμενες καλλιέργειες. Από την άλλη πλευρά, όταν οι τιμές των παραγόμενων λιπιδίων ήταν ίσες ή και ελαφρώς μεγαλύτερες από 20% επί ξηρού κ.β. και η αντίστοιχη συσσώρευση ενδοκυτταρικών συνολικών πολυσακχαριτών ήταν αντίστοιχα σχετικά περιορισμένη. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του μακρομύκητα *M. esculenta* στις αναδεδόμενες καλλιέργειες, όπου ενώ η $Y_{L/X}$ (% κ.β.) ήταν η υψηλότερη που καταγράφηκε (22,54%), η μέγιστη τιμή $Y_{IPS/X}$ (27,85%) ήταν από τις χαμηλότερες.

Η ανάλυση σε λιπαρά οξέα (ΛΟ) των ολικών μικροβιακών λιπιδίων των έξι επιλεγμένων μακρομυκήτων εμφανίζεται στους Πίνακες III.7α (στατικές καλλιέργειες) και III.7β (αναδεδόμενες καλλιέργειες). Εξετάζοντας τους μύκητες στο σύνολό τους και στα δύο είδη καλλιεργειών, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι τα ακόρεστα ΛΟ αποτέλεσαν το ~72-74%, κ.β. των ολικών ΛΟ τους, ενώ τα κορεσμένα μόνο το ~26-28%, κ.β. Τα γένη με το πιο υψηλό ποσοστό ακόρεστων ΛΟ ήταν τα *G. applanatum*, *A. aegerita* (σε στατικές και αναδεδόμενες καλλιέργειες) και το *P. pulmonarius* (σε αναδεδόμενες), καθώς το ποσοστό των ακόρεστων ΛΟ τους ήταν μεγαλύτερο από 80% κ.β.. Κατ' αντιδιαστολή, οι μακρομύκητες *V. voluacea* και *M. esculenta* περιείχαν λιπίδια με το μεγαλύτερο ποσοστό κορεσμένων ΛΟ (~34-50% και 28-34%, κ.β. αντίστοιχα). Επίσης, σε συνέχεια των αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, επιβεβαιώνεται ότι το κύριο ΛΟ που ανιχνεύτηκε στα κυτταρικά λιπίδια των μακρομυκήτων ήταν το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9,12\text{C}18:2$), καθώς τα ποσοστά του υπερέβαιναν το 50%, κ.β. του συνόλου των ΛΟ, ενώ ακολούθησε το ελαϊκό οξύ ($\Delta^9\text{C}18:1$) με ποσοστά έως 40%, κ.β. και ακολούθησε το κορεσμένο ελαϊκό C16:0 (10-30%, κ.β.). Εξαιρέση αποτέλεσαν τα λιπίδια των *M. esculenta* και *V. voluacea* καθώς υπό αναδεδόμενες συνθήκες περιείχαν ποσοστό $\Delta^9,12\text{C}18:2$ μικρότερο από 50% κ.β. (Πίνακας III.7β).

Περαιτέρω, φάνηκε ότι η ανάδευση ευνόησε τη σύνθεση πιο ακόρεστων ΛΟ, ενώ επίσης η ούσταση των ΛΟ διαφοροποιείτο ως συνάρτηση του χρόνου ζύμωσης. Ο μύκητας *A. aegerita* παρήγαγε πιο ακόρεστα ΛΟ στις αναδεδόμενες καλλιέργειες σε σχέση με τις στατικές, ενώ και στους δυο τύπους των καλλιεργειών το ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ καταγράφηκε σε υψηλά ποσά στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, μειούμενο στη συνέχεια σε αξιοσημείωτα χαμηλές ποσότητες (36-47%, κ.β.). Ταυτόχρονη ήταν η αύξηση των ΛΟ $\Delta^9\text{C}18:1$ και C16:0. Μάλιστα, το ποσοστό του $\Delta^9\text{C}18:1$ στα τελευταία στάδια της αναδεδόμενης καλλιέργειας (16^η και 20^η ημέρα) εμφανίστηκε ιδιαίτερα υψηλό (40-45%, κ.β.), από τα υψηλότερα που καταγράφηκαν στην

Πίνακας III.7α Κινητική εξέλιξης της σύστασης σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων επιλεγμένων μακρομυκήτων σε υγρή καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη (Glc_o=30 g/l), υπό στατικές συνθήκες στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella volvacea*)

Είδος μακρομύκητα	Χρόνος (ημέρες)	Λιπαρά οξέα (% κ.β.)				
		C16:0	C18:0	Δ ⁹ C18:1	Δ ^{9,12} C18:2	Λοιπά *
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	14,6	ιχνη**	10,2	74,2	1,0
	12 ^η	20,9	ιχνη	9,5	67,5	2,0
	16 ^η	24,0	ιχνη	25,5	49,0	1,5
	20 ^η	24,8	ιχνη	26,6	47,3	1,3
<i>F. velutipes</i>	8 ^η	29,2	ιχνη	20,0	49,8	1,0
	12 ^η	18,3	ιχνη	19,9	59,9	1,9
	16 ^η	19,7	5,5	16,5	55,1	3,2
	20 ^η	15,1	4,0	16,5	60,1	4,3
<i>G. applanatum</i>	8 ^η	5,5	ιχνη	10,4	75,1	9,0
	12 ^η	16,2	ιχνη	16,5	66,1	1,2
	16 ^η	16,1	ιχνη	22,0	61,1	0,8
	20 ^η	12,5	ιχνη	20,1	63,5	3,9
<i>M. esculenta</i>	8 ^η	13,6	6,9	21,6	57,7	0,2
	12 ^η	17,6	9,1	29,0	43,0	1,3
	16 ^η	21,8	10,2	35,1	32,3	0,6
	20 ^η	20,1	8,6	34,5	35,1	1,7
<i>P. pulmonarius</i>	8 ^η	14,5	5,1	20,0	60,1	0,3
	12 ^η	17,4	4,5	14,1	56,4	7,6
	16 ^η	20,1	7,4	16,8	55,1	0,6
	20 ^η	19,2	6,0	19,1	54,5	1,2
<i>V. volvacea</i>	8 ^η	14,8	4,2	2,5	60,4	18,1
	12 ^η	17,0	3,2	2,8	62,3	14,7
	16 ^η	15,5	5,3	3,6	56,9	18,8
	20 ^η	14,3	6,0	6,2	58,0	15,5

Το κάθε σημείο της ζύμωσης που παρουσιάζεται είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων μετρήσεων
 *: Τα λοιπά ΛΟ κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 και C20:0, **Ιχνη: <0,4%

Πίνακας III.7β Κινητική εξέλιξης της σύστασης σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων επιλεγμένων μακρομυκήτων σε υγρή καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη (Glc_o=30 g/l), σε αναδεδόμενες συνθήκες (120±5 rpm) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *V. voluacea*)

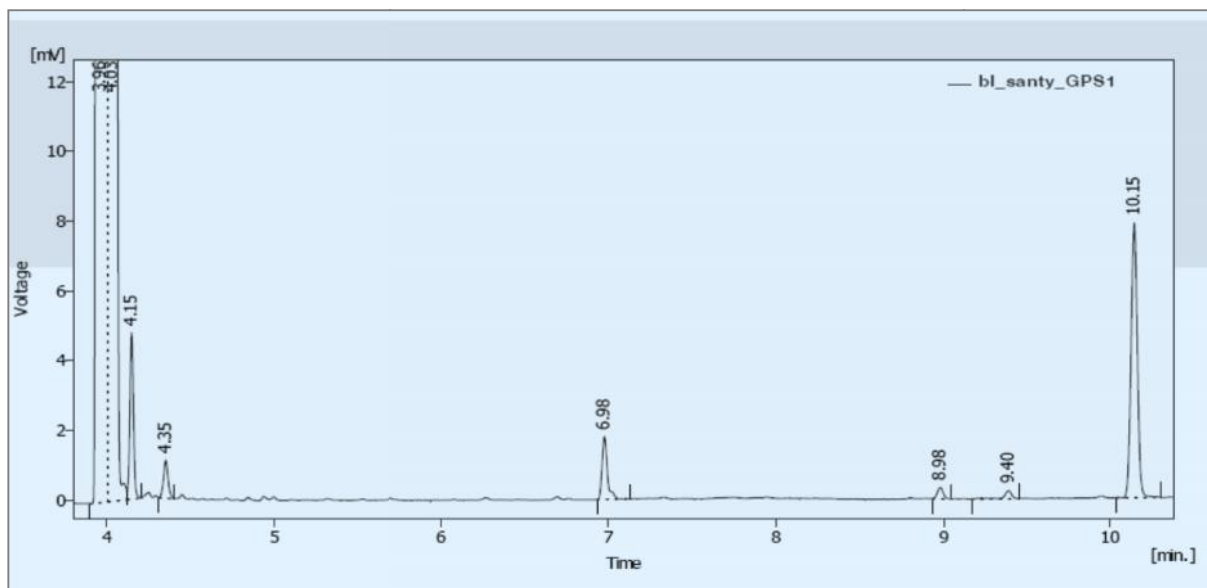
Είδος μακρομύκητα	Χρόνος (ημέρες)	Λιπαρά οξέα (% κ.β.)				
		C16:0	C18:0	Δ ⁹ C18:1	Δ ^{9,12} C18:2	Λοιπά*
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	10,3	ιχνη**	5,5	79,0	5,2
	12 ^η	15,2	ιχνη	5,6	77,5	1,7
	16 ^η	18,2	ιχνη	40,9	38,3	2,6
	20 ^η	18,1	ιχνη	45,0	36,0	0,9
<i>F. velutipes</i>	8 ^η	22,1	ιχνη	10,0	65,9	2,0
	12 ^η	20,1	ιχνη	20,2	59,1	0,6
	16 ^η	30,2	ιχνη	17,1	51,2	1,5
	20 ^η	24,5	ιχνη	17,0	56,9	1,6
<i>G. applanatum</i>	8 ^η	5,3	ιχνη	9,5	78,8	6,4
	12 ^η	7,3	ιχνη	10,0	74,9	7,8
	16 ^η	14,6	ιχνη	9,6	72,8	3,0
	20 ^η	17,1	ιχνη	7,1	73,9	1,9
<i>M. esculenta</i>	8 ^η	20,8	10,0	33,2	35,0	1,0
	12 ^η	23,4	11,0	39,8	24,6	1,2
	16 ^η	23,7	9,1	35,4	27,6	4,2
	20 ^η	19,1	12,5	42,1	25,7	0,6
<i>P. pulmonarius</i>	8 ^η	16,1	ιχνη	25,1	57,9	0,9
	12 ^η	17,5	4,7	15,8	61,1	0,9
	16 ^η	10,1	4,4	15,1	69,9	0,5
	20 ^η	17,1	5,0	9,8	66,0	2,1
<i>V. voluacea</i>	8 ^η	17,2	8,6	1,0	48,5	24,7
	12 ^η	21,6	6,3	2,7	47,1	22,3
	16 ^η	24,0	6,1	1,5	45,4	23,0
	20 ^η	29,2	6,1	3,5	42,5	18,7

Το κάθε σημείο της ζύμωσης που παρουσιάζεται είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων μετρήσεων
 *: Τα λοιπά ΛΟ κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 και C20:0, **Ιχνη: <0,4%

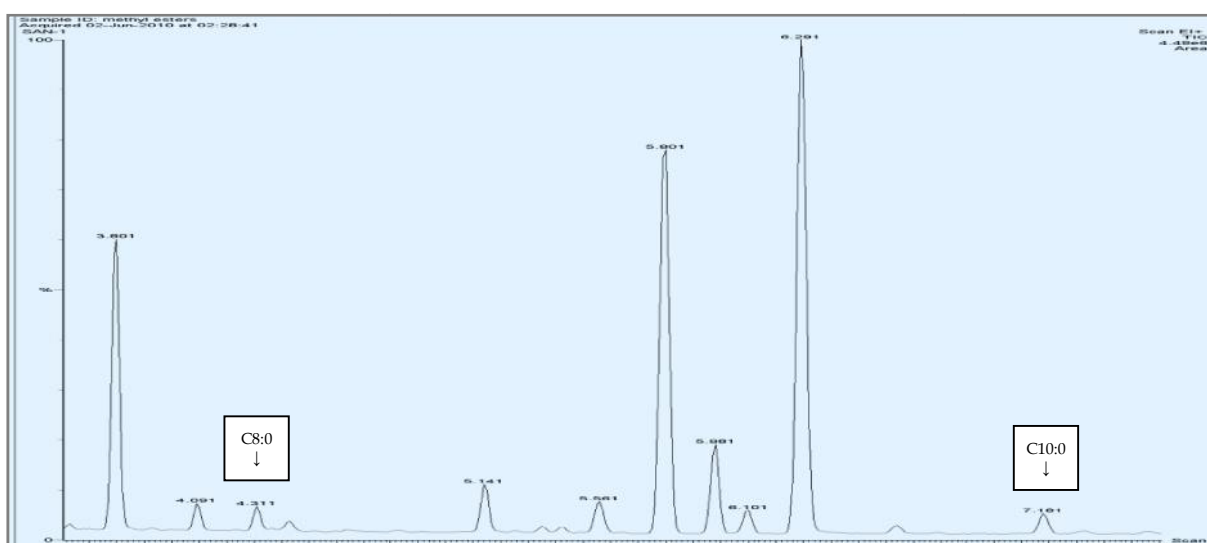
παρούσα εργασία. Στις στατικές καλλιέργειες του μύκητα *F. velutipes* φάνηκε ότι η συγκέντρωση του ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ αύξανε σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης, ενώ η αντίστοιχη του $\Delta^9\text{C}18:1$ και κυρίως του $\text{C}16:0$ μειωνόταν. Η αντίστροφη τάση παρατηρήθηκε για τον μακρομύκητα στις αναδεδόμενες καλλιέργειες. Αναφορικά με το μύκητα *G. applanatum*, κατά τις μη αναδεδόμενες καλλιέργειες αυτού, η συγκέντρωση του ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ μειωνόταν, ενώ αυτή των $\text{C}16:0$ και $\Delta^9\text{C}18:1$ αυξανόταν με το χρόνο της ζύμωσης. Αντίστοιχη σύσταση σε ΛΟ παρατηρήθηκε και κατά τις αναδεδόμενες καλλιέργειες, παρά το γεγονός ότι οι διαφοροποιήσεις των συγκεντρώσεων του ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ ήταν μικρότερες σε σύγκριση με τις στατικές καλλιέργειες. Χαρακτηριστική ήταν και η βαθμιαία αύξηση του ποσοστού του $\text{C}16:0$ με το χρόνο ζύμωσης. Επίσης, οι στατικές καλλιέργειες του μύκητα *P. pulmonarius* έδειξαν μια σύσταση σε ΛΟ μάλλον σταθερή σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης σε ό,τι αφορά το $\Delta^9\text{C}18:1$, μικρή αύξηση του $\text{C}16:0$ και αντίστοιχα μικρή μείωση του $\Delta^9,12\text{C}18:2$. Σε αντιδιαστολή, οι αναδεδόμενες καλλιέργειες του παραπάνω μύκητα συνοδεύτηκαν από σύνθεση λιπιδίων στα οποία η συγκέντρωση του ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ αύξανε βαθμιαία σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης, ενώ αντίστοιχη ήταν η μείωση του ΛΟ $\Delta^9\text{C}18:1$. Ακόμα, στα λιπίδια του *P. pulmonarius* ανιχνεύτηκαν μικρές ποσότητες (~4-7%, κ.β.) του κορεσμένου ΛΟ $\text{C}18:0$.

Διαφορετική σε σχέση με τις προηγούμενες καλλιέργειες ήταν η σύσταση σε ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων των μακρομυκήτων *M. esculenta* και *V. voluacea* στη στατική και κυρίως στην αναδεδόμενη καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, το ΛΟ $\Delta^9\text{C}18:1$ εμφάνισε στα λιπίδια του *M. esculenta* τα υψηλότερα ποσοστά που καταγράφηκαν στην παρούσα ανάλυση, τα οποία και αυξάνονταν βαθμιαία στη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ το $\Delta^9,12\text{C}18:2$ εμφάνισε τα χαμηλότερα, τα οποία αντιστρόφως μειώνονταν. Επίσης, η συγκέντρωση του κορεσμένου ΛΟ $\text{C}18:0$ καταγράφηκε στον μακρομύκητα αυτόν σε σημαντική ποσότητα (9-12%, κ.β.). Τέλος, η ανάδευση δεν ευνόησε την ακορεστότητα των παραγόμενων κυτταρικών ΛΟ, καθώς όπως αναφέρθηκε, το ποσοστό των κορεσμένων ΛΟ του *M. esculenta* ήταν σημαντικά υψηλότερο στις αναδεδόμενες καλλιέργειες, ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια της ζύμωσης (16^η, 20^η ημέρα). Σε ό,τι αφορά τον μακρομύκητα *V. voluacea*, το $\Delta^9,12\text{C}18:2$ αποτέλεσε το κύριο παραγόμενο ΛΟ, με δεύτερο (σε σημαντικά μικρότερο ποσοστό) το κορεσμένο $\text{C}16:0$, ενώ σε σημαντικές ποσότητες (13-16% στις στατικές και 20-25%, κ.β. στις αναδεδόμενες φιάλες) παράχθηκαν κορεσμένα ΛΟ μικρής, μεσαίας και μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (το σύνολο των παραγόμενων ΛΟ $\text{C}8:0$, $\text{C}10:0$, $\text{C}12:0$, $\text{C}14:0$, $\text{C}16:0$, $\text{C}18:0$ και $\text{C}20:0$ συνιστούσε το 40-50%, κ.β., των συνολικών λιπιδίων). Ωστόσο, η συγκέντρωσή του $\Delta^9,12\text{C}18:2$ βρισκόνταν στα χαμηλότερα ποσοστά που καταγράφηκαν για τους έξι μακρομύκητες στην παρούσα

ανάλυση (μετά τον *M. esculenta*) και δεν παρουσίαζε σημαντική διαφοροποίηση στη διάρκεια του χρόνου ζύμωσης. Επιπλέον, στις αναδεδόμενες καλλιέργειες του *V. voluacea* υπήρξε βαθμιαία αύξηση του ποσοστού του C16:0, ενώ παράχθηκε και αξιόλογη ποσότητα C18:0. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση των λιπιδίων του *V. voluacea* δίνεται στην Εικόνα III.1. Επίσης, η περαιτέρω επιβεβαίωση της ύπαρξης των λιπαρών οξέων C8:0 και C10:0 στην σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μακρομύκητα *V. voluacea* 190 έγινε με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (Εικόνα III.2).



Εικόνα III.1 Χρωματογράφημα των λιπαρών οξέων του μακρομύκητα *Volvariella voluacea*, όπου $R_t=4,15-4,35-6,98-8,98-9,4-10,15$ min αντιστοιχεί στα λιπαρά οξέα C8=0, C10=0, C16=0, C18=0 και $\Delta^9,12$ C18:2



Εικόνα III.2 Χρωματογράφημα των ταυτοποιημένων θραυσμάτων (4.311 και 7.181) των λιπαρών οξέων C8=0, C10=0 του μακρομύκητα *Volvariella voluacea*

Επιπλέον, από τον παρακάτω Πίνακα III.8 όπου δίνεται η τιμή του δείκτη ακορεστότητας (U.I.) των λιπιδίων των επιλεγμένων έξι μακρομοκλήτων στις στατικές και αναδεδυόμενες καλλιέργειες, ενισχύονται τα αποτελέσματα της σύστασης των λιπιδίων σε ΛΟ που αναλύθηκαν προηγουμένως. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα στελέχη που ευνοήθηκαν από την ανάδευση για παραγωγή περισσότερο ακόρεστων λιπαρών οξέων είχαν υψηλότερο U.I. σε σχέση με τον αντίστοιχο της στατικής φάσης (π.χ. *A. aegerita*, *G. applanatum* και *P. pulmonarius*), ενώ οι μακρομοκλήτες *M. esculenta* και *V. voluacea* που δεν ευνοήθηκαν είχαν υψηλότερο U.I. στις στατικές καλλιέργειες. Όσον αφορά στο U.I. του *F. velutipes*, αυτός δεν επηρεάστηκε από την ανάδευση της καλλιέργειας. Τέλος, τα δεδομένα του πίνακα δείχνουν ότι σε αρκετές καλλιέργειες, όπως των μακρομοκλήτων *A. aegerita*, *G. applanatum* και *M. esculenta*, ο U.I. μειωνόταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ εν πολλοίς η μείωση αυτή οφειλόταν σε ανάλογη μείωση του ποσοστού του λινελαϊκού οξέος.

Πίνακας III.8 Δείκτης ακορεστότητας (U.I.) των λιπαρών οξέων έξι επιλεγμένων μακρομοκλήτων που βιοσυντέθηκαν στο υπόστρωμα GPYS κατά την καλλιέργειά στους σε στατικές (Σ) και αναδεδυόμενες (Α) φιάλες (120±5 rpm) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella voluacea*)

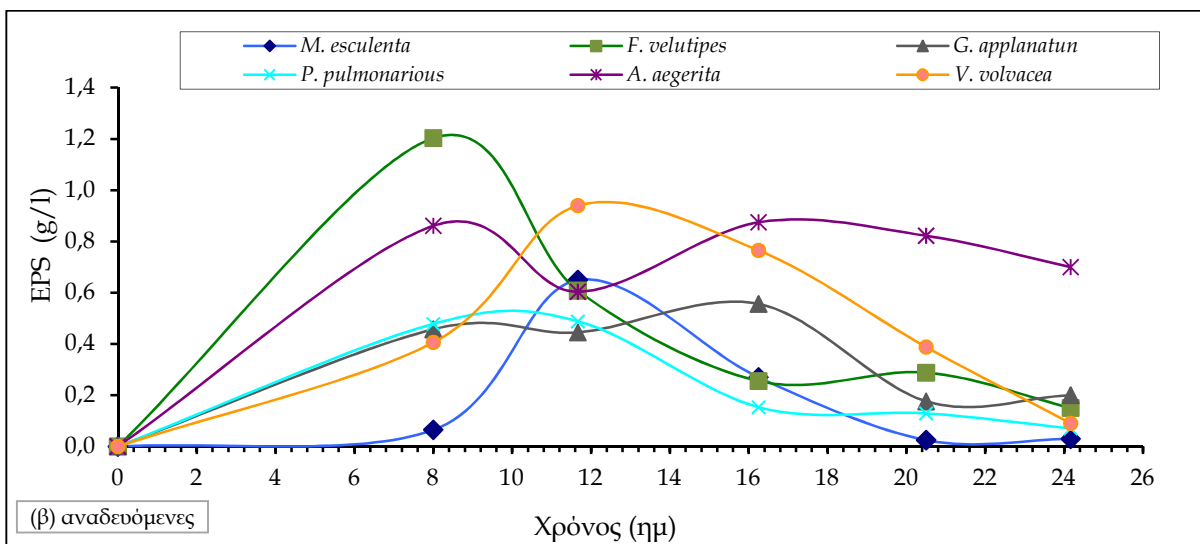
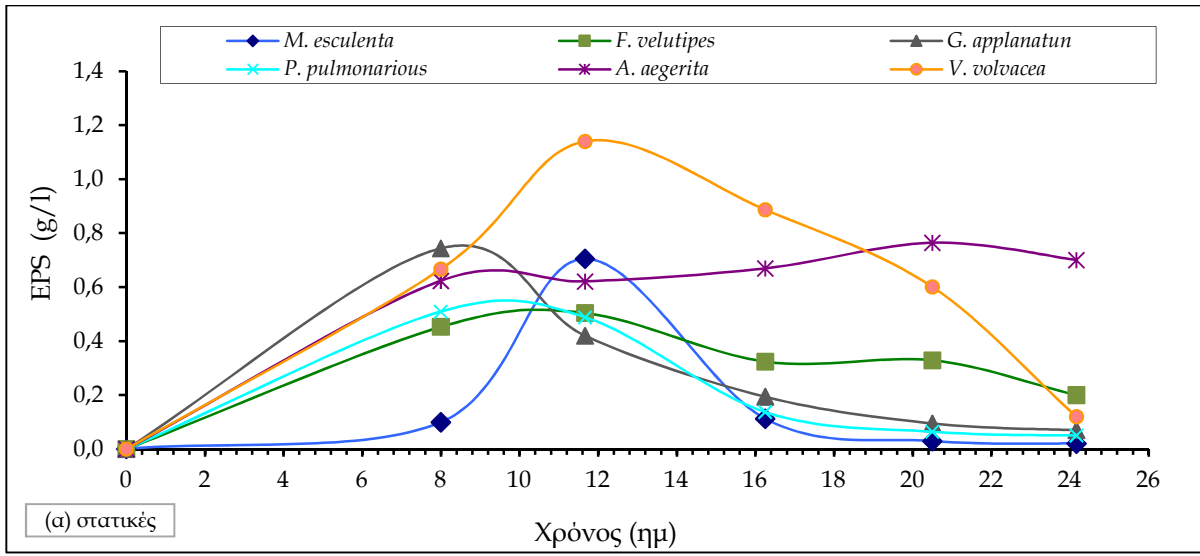
Είδος μακρομοκλήτα	Ημέρες	U.I.	
		Σ	Α
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	1,59	1,64
	12 ^η	1,45	1,61
	16 ^η	1,24	1,18
	20 ^η	1,21	1,17
<i>F. velutipes</i>	8 ^η	1,20	1,42
	12 ^η	1,40	1,38
	16 ^η	1,27	1,20
	20 ^η	1,37	1,31
<i>G. applanatum</i>	8 ^η	1,61	1,67
	12 ^η	1,49	1,60
	16 ^η	1,44	1,55
	20 ^η	1,47	1,55
<i>M. esculenta</i>	8 ^η	1,37	1,03
	12 ^η	1,15	0,89
	16 ^η	1,00	0,91
	20 ^η	1,05	0,94
<i>P. pulmonarius</i>	8 ^η	1,40	1,41
	12 ^η	1,27	1,38
	16 ^η	1,27	1,55
	20 ^η	1,28	1,42
<i>V. voluacea</i>	8 ^η	1,20	0,96
	12 ^η	1,28	0,95
	16 ^η	1,13	0,94
	20 ^η	1,20	0,84

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η βιοσύνθεσης εξωπολυσακχαριτών (EPS) στο μέσο καλλιέργειας GPYS των έξι μελετώμενων μακρομυκήτων, τόσο υπό στατικές (Γράφημα III.7α) όσο και υπό αναδεδόμενες (Γράφημα III.7β) συνθήκες για 24 ημέρες. Όπως φαίνεται και από τα δεδομένα του παρακάτω γραφήματος, οι τιμές των παραγόμενων EPS διαφοροποιούνταν αξιοσημείωτα, τόσο σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα στελέχη, τον τρόπο καλλιέργειας (στατικές ή αναδεδόμενες καλλιέργειες), όσο και το χρόνο ζύμωσης. Σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα στελέχη, οι μέγιστες τιμές EPS που επιτεύχθηκαν κομάνονταν μεταξύ των τιμών 0,16 (*M. esculenta* σε στατικές καλλιέργειες) και 1,20 g/l (*F. velutipes* σε αναδεδόμενες καλλιέργειες). Η μέγιστη συσσώρευση EPS στο μέσο της καλλιέργειας καταγράφηκε στους μακρομύκητες *A. aegerita* ($EPS_{max}=0,86$ g/l στις αναδεδόμενες και $EPS_{max}=0,76$ g/l στις στατικές καλλιέργειες), *F. velutipes* ($EPS_{max}=1,20$ g/l στις αναδεδόμενες και $EPS_{max}=0,50$ g/l στις στατικές καλλιέργειες), *G. applanatum* ($EPS_{max}=0,56$ g/l στις αναδεδόμενες και $EPS_{max}=0,74$ g/l στις στατικές καλλιέργειες), *M. esculenta* ($EPS_{max}=0,65$ g/l στις αναδεδόμενες και $EPS_{max}=0,71$ g/l στις στατικές καλλιέργειες) και *V. voluacea* ($EPS_{max}=0,94$ g/l στις αναδεδόμενες και $EPS_{max}=1,14$ g/l στις στατικές καλλιέργειες). Μικρότερες EPS_{max} συγκεντρώσεις (<0,50 g/l) παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του *P. pulmonarius*.

Ωστόσο, ο χρόνος παραγωγής της μέγιστης τιμής των EPS διέφερε ανάλογα με το είδος του μακρομύκητα και την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης στην καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το Γράφημα III.7α, δεικνύεται ότι στις στατικές καλλιέργειες οι EPS_{max} επιτεύχθηκαν στους *G. applanatum* και *P. pulmonarius* την 8^η ημέρα της ζύμωσης, ενώ στους *V. voluacea*, *M. esculenta* και *F. velutipes* τη 12^η. Στις αναδεδόμενες καλλιέργειες (Γράφημα III.7β) παρατηρήθηκε ότι οι EPS_{max} παράχθηκαν στον *F. velutipes* την 8^η ημέρα (με σημαντική αύξηση στη τιμή τους), αλλά στον *P. pulmonarius* και στους *V. voluacea* και *M. esculenta* τη 12^η ημέρα. Μεγαλύτερη ήταν η επίδραση της ανάδευσης στον *G. applanatum* καθώς φάνηκε καθαρά ότι στο πρώιμο αυτό στάδιο της καλλιέργειας η ανάδευση είχε αρνητική επίδραση, αφού αφενός προκάλεσε μείωση της τιμής των EPS_{max} , αφετέρου μετατόπισε χρονικά την εμφάνισή τους στη 16^η της ζύμωσης. Όσον αφορά στην παραγωγή EPS στον μακρομύκητα *A. aegerita*, αυτή εμφανίστηκε σχεδόν σταθερή καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (στατική, αναδεδόμενη). Επίσης, δεικνύεται ότι οι τιμές των παραγόμενων EPS των μακρομυκήτων *A. aegerita*, *G. applanatum*, *F. velutipes* και *M. esculenta* παράχθηκαν υπό ανάδευση σε σημαντικά υψηλότερες ποσότητες στα περισσότερα σημεία της κινητικής (π.χ. *A. aegerita*, *F. velutipes* την 8^η ημέρα, *G. applanatum* τη 16^η), ενώ και για τα υπόλοιπα σημεία οι τιμές των EPS ήταν υψηλότερες των αντίστοιχων στις στατικές φιάλες (χωρίς όμως να διαφέρουν σημαντικά από

αυτές). Ακόμα, η παραγωγή των EPS στον *P. pulmonarius* δε φάνηκε να επηρεάζεται από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης, ενώ όσον αφορά στον *V. volvacea*, στις στατικές φιάλες σαφώς παράχθηκε μεγαλύτερη ποσότητα EPS και αυτό παρατηρήθηκε για όλα τα στάδια της καλλιέργειας που εξετάστηκαν.

Τέλος, ένα αξιοσημείωτο γεγονός, το οποίο παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλες τις καλλιέργειες των μελετώμενων μακρομυκήτων σχετίζεται με τη σχετικά υψηλή παραγωγή



Γράφημα III.7α,β Εξέλιξη παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS - g/l) κατά την αύξηση των μακρομυκήτων *Agrocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Morchella esculenta*, *Pleurotus pulmonarius* και *Volvariella volvacea* σε θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30 g/l) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *V. volvacea*) σε (α) στατικές και (β) αναδεδυόμενες (120±5 rpm) φιάλες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτητών πειραμάτων

εξωπολυσακχαριτών στα πρώιμα στάδια της καλλιέργειας (8^η, 12^η ημέρα), όπου η παραγωγή ξηράς βιομάζας ήταν περιορισμένη. Αντίθετα, όσο εξελισσόταν η καλλιέργεια και αυξανόταν η συγκέντρωση της παραγόμενης μυκηλιακής μάζας, βαθμιαία (ή/και απότομα) λάμβανε χώρα μείωση της συγκέντρωσης των EPS (πιθανώς πραγματοποιείται αποικοδόμηση αυτών). Φαίνεται όμως πως η αποικοδόμηση αυτή δε σχετιζόταν με έλλειψη γλυκόζης από το περιβάλλον αύξησης, αφού στις περισσότερες από τις καλλιέργειες η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν αρκετά υψηλή όταν λάμβανε χώρα η βιο-αποικοδόμηση των EPS.

Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης εξωπολυσακχαριτών ως προς την καταναλωθείσα γλυκόζη ($Y_{EPS/Glc}$, g/g) στο σημείο της ζύμωσης όπου σημειώθηκε η μέγιστη συγκέντρωση των EPS (Πίνακας III.9). Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι ανάλογα τον μακρομύκητα, γίνεται καλύτερη εκμετάλλευση της γλυκόζης του υποστρώματος προς σχηματισμό EPS, είτε στις αναδεδυόμενες (μύκητες *A. aegerita*, *F. velutipes*), είτε στις στατικές καλλιέργειες (μύκητες *G. applanatum*, *P. pulmonarius*), ενώ υπήρξαν και περιπτώσεις όπου οι τιμές του $Y_{EPS/Glc}$ ήταν παρόμοιες και για τα δύο είδη καλλιέργειας (μύκητες *M. esculenta*, *V. voluacea*). Στη συνέχεια και σε επιβεβαίωση των δεδομένων του Γραφήματος III.7α,β, φαίνεται ότι οι μέγιστες τιμές $Y_{EPS/Glc}$ επιτεύχθηκαν στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (8^η, 12^η ημέρα), όπου καταγράφηκε και η μεγαλύτερη παραγωγή EPS (με εξαίρεση τον μακρομύκητα *A. aegerita* που παρουσίασε και την πιο αργή ανάπτυξη μεταξύ των μελετώμενων στελεχών).

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS), τόσο στις στατικές όσο και στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα των κινητικών μελετών (Πίνακας III.6α,β, Διάγραμμα III.8), η παραγωγή των IPS σε απόλυτες τιμές (σε g/l) συνεχώς αυξανόταν σε σχέση με το χρόνο της

Πίνακας III.9 Σχέση παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών και κατανάλωσης γλυκόζης (μέγιστη τιμή συντελεστή απόδοσης εξωπολυσακχαριτών βάσει της καταναλωθείσας γλυκόζης, $Y_{EPS/Glc}$) των έξι επιλεγμένων μακρομυκήτων που βιοσυντέθηκαν στο υπόστρωμα GPYS κατά την καλλιέργειά τους σε στατικές (Σ) και αναδεδυόμενες (Α) φιάλες (120±5 rpm) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *V. voluacea*)

Είδος μακρομύκητα	$Y_{EPS/Glc}$			
	Σ	Ημέρα	Α	Ημέρα
<i>A. aegerita</i>	0,09	20 ^η	0,22	16 ^η
<i>F. velutipes</i>	0,11	8 ^η	0,24	8 ^η
<i>G. applanatum</i>	0,19	8 ^η	0,04	16 ^η
<i>M. esculenta</i>	0,04	12 ^η	0,03	12 ^η
<i>P. pulmonarius</i>	0,18	8 ^η	0,07	12 ^η
<i>V. voluacea</i>	0,08	12 ^η	0,07	12 ^η

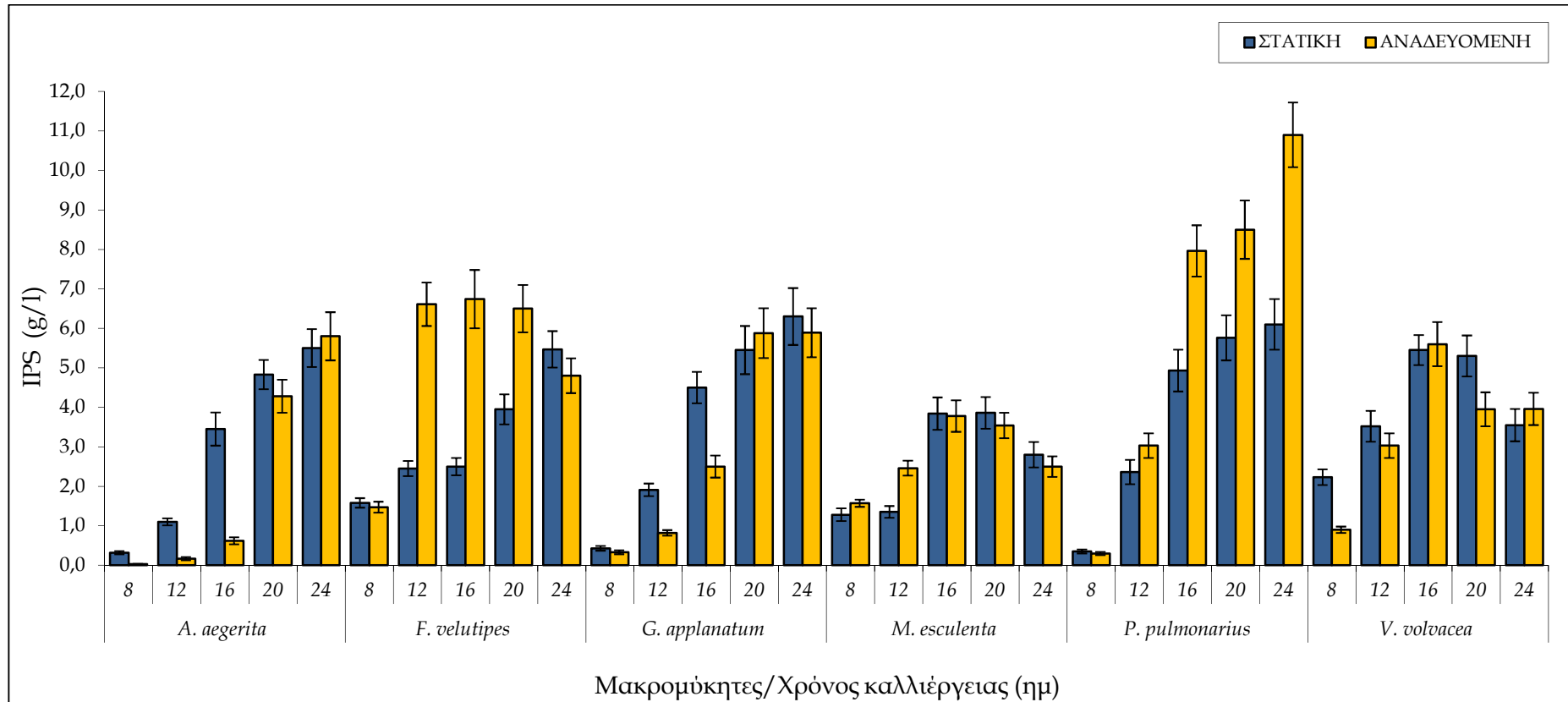
ζύμωσης για τους μακρομυκήτες *P. pulmonarius*, *A. aegerita* και *G. applanatum*, ενώ στους *M. esculenta*, *F. velutipes* και κυρίως στον *V. voluacea* παρατηρήθηκε μείωση προς το τέλος της ζύμωσης, γεγονός που πιθανότατα συνδέεται με την απουσία υπολειπόμενης ποσότητας γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας. Σε ορισμένες δε από τις πραγματοποιηθείσες καλλιέργειες (π.χ. περίπτωση των μακρομυκήτων *F. velutipes* και *P. pulmonarius* σε αναδευόμενες φιάλες), η IPS_{max} συγκέντρωση που επιτεύχθηκε ήταν πράγματι πολύ υψηλή (6,7 και 10,9 g/l αντίστοιχα). Δεδομένου ότι στις περισσότερες από τις καλλιέργειες η ανάδευση ευνόησε σε απόλυτες τιμές (g/l) την παραγωγή μυκηλιακής μάζας σε σχέση με τις στατικές καλλιέργειες, πιθανότατα και η παραγωγή IPS (σε απόλυτες τιμές - g/l) ευνοήθηκε με την εφαρμογή ανάδευσης στις καλλιέργειες (βλ. Γράφημα III.8). Χαρακτηριστικά παραδείγματα όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση παραγόμενων IPS κατά την ανάδευση αποτελούν οι καλλιέργειες των μακρομυκήτων *P. pulmonarius* και *F. velutipes*. Ωστόσο, η ανάδευση δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγή των IPS (g/l) του μύκητα *M. esculenta*, ενώ στους *A. aegerita*, *G. applanatum* και *V. voluacea* παρατηρήθηκε μικρή ή και αρνητική επίδραση ανάλογα με το στάδιο της αύξησης τους. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση που καταγράφηκε στους παραγόμενους IPS (g/l) τη 12^η και 16^η ημέρα της στατικής καλλιέργειας των μακρομυκήτων *A. aegerita* (~85%) και *G. applanatum* (45-55%), καθώς και την 8^η και 16^η ημέρα του *V. voluacea* (60 και 25% αντίστοιχα).

Επίσης, η ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS/X}$, % κ.β.) αυξανόταν με το χρόνο καλλιέργειας στους *A. aegerita*, *P. pulmonarius* και *G. applanatum* (Πίνακας III.6α,β, Γράφημα III.9), ενώ για τους *F. velutipes*, *M. esculenta* και *V. voluacea* παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή των IPS σταθεροποιήθηκε την 16^η-20^η ημέρα και μετά υπήρξε μείωση - ανακατανάλωση των ήδη παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών. Ακόμα, η ανάδευση δε φάνηκε να ευνοεί τη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών καθώς η εφαρμογή της δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγή IPS (% κ.β.), για το σύνολο των εξεταζόμενων μακρομυκήτων (με εξαίρεση τον *F. velutipes* - 16^η ημέρα), ενώ αντιθέτως σε αρκετές καλλιέργειες υπό στατικές συνθήκες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ποσότητάς τους (π.χ. 60-80% στον *A. aegerita*, ~30% στον *G. applanatum* και 27-37%, κ.β. στον *V. voluacea*). Όσον αφορά στο συντελεστή απόδοσης των παραγόμενων IPS ανά μονάδα αναλωθείσας γλυκόζης ($Y_{IPS/Glc}$, g/g), ο Πίνακας III.10 δεικνύει ότι στο στάδιο της κινητικής που σημειώθηκε η μέγιστη παραγόμενη τιμή IPS (g/l), ο $Y_{IPS/Glc}$ παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη τιμή μόνο στη στατική καλλιέργεια του *A. aegerita* και στην αναδευόμενη του *P. pulmonarius*, ενώ στις άλλες καλλιέργειες η εκμετάλλευση της γλυκόζης προς σχηματισμό ενδοπολυσακχαριτών ήταν παρόμοια. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για το συνολικό

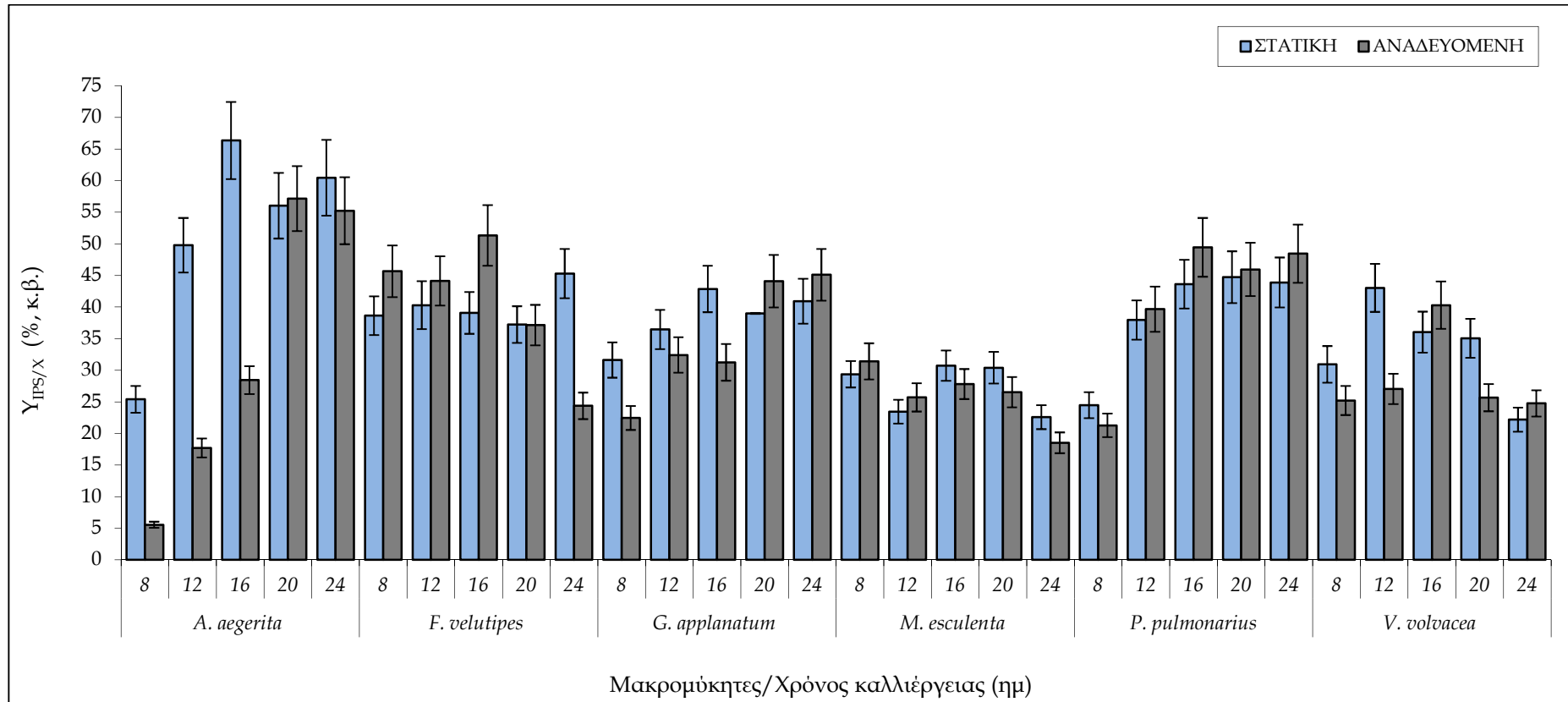
συντελεστή απόδοσης των παραγόμενων IPS ανά μονάδα αναλωθείσας γλυκόζης στους μύκητες *A. aegerita* και *P. pulmonarius*, όπου και αυτοί ήταν υψηλότεροι στις στατικές και τις αναδεδόμενες καλλιέργειες αντίστοιχα (Γράφημα III.10α,β).

Πίνακας III.10 Σχέση παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών και κατανάλωσης γλυκόζης (μέγιστη τιμή συντελεστή απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών ως προς την καταναλωθείσα γλυκόζη, $Y_{IPS/Glc}$) των έξι επιλεγμένων μακρομυκήτων που βιοσυντέθηκαν στο υπόστρωμα GPGS κατά την καλλιέργειά τους σε στατικές (Σ) και αναδεδόμενες (Α) φιάλες (120±5 gpm) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *V. voluacea*)

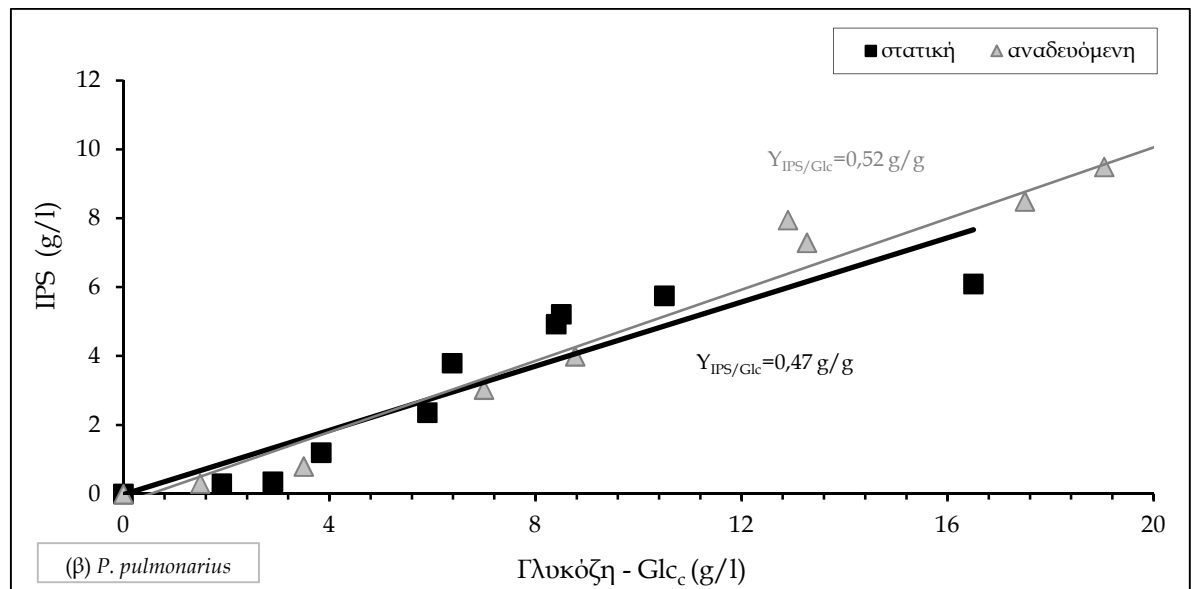
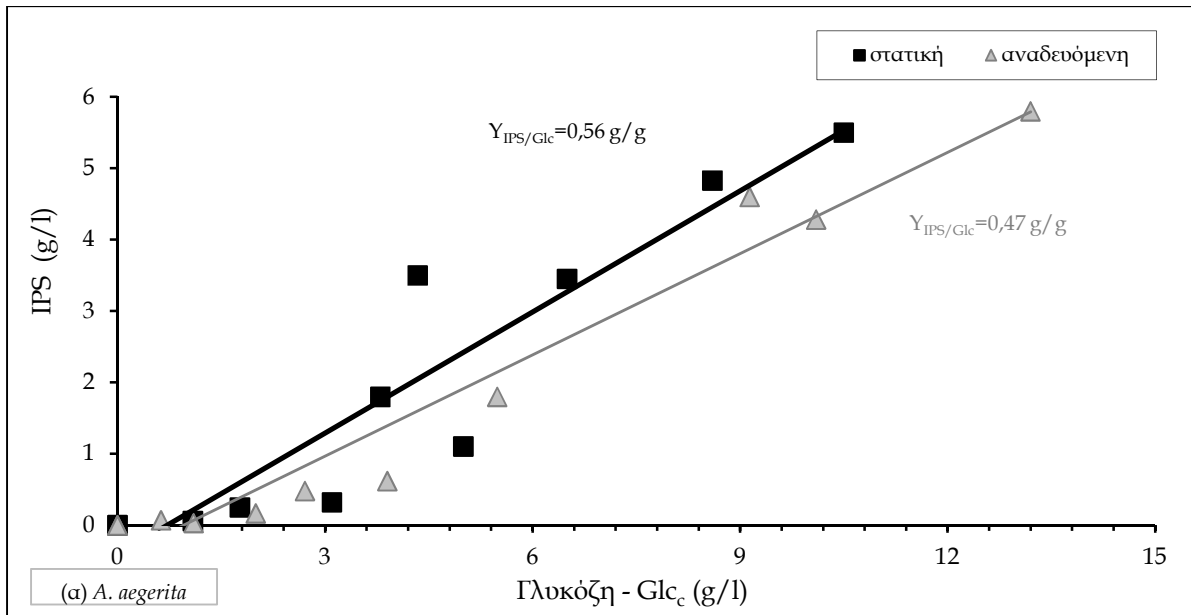
Είδος μακρομύκητα	$Y_{IPS/Glc}$			
	Σ	Ημέρα	Α	Ημέρα
<i>A. aegerita</i>	0,52	24 ^η	0,44	24 ^η
<i>F. velutipes</i>	0,23	24 ^η	0,28	16 ^η
<i>G. applanatum</i>	0,21	24 ^η	0,26	24 ^η
<i>M. esculenta</i>	0,13	16 ^η	0,12	12 ^η
<i>P. pulmonarius</i>	0,37	24 ^η	0,47	24 ^η
<i>V. voluacea</i>	0,24	16 ^η	0,24	16 ^η



Γράφημα III.8 Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (IPS - g/l) κατά την αύξηση των μακρομυκήτων *Agrocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Morchella esculenta*, *Pleurotus pulmonarius* και *Volvariella voluacea* σε θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30 g/l) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *V. voluacea*) σε στατικές και αναδευόμενες (120±5 rpm) καλλιέργειες για 24 ημέρες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων



Γράφημα III.9 Συντελεστής απόδοσης παραγόμενων IPS ως προς τη παραγόμενη βιομάζα ($Y_{IPS/X}$, % κ.β.) κατά την αύξηση των μακρομυκήτων *Agrocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Morchella esculenta*, *Pleurotus pulmonarius* και *Volvariella voluacea* σε θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_0=30$ g/l) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *V. voluacea*) σε στατικές και αναδευόμενες (120 ± 5 rpm) καλλιέργειες για 24 ημέρες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

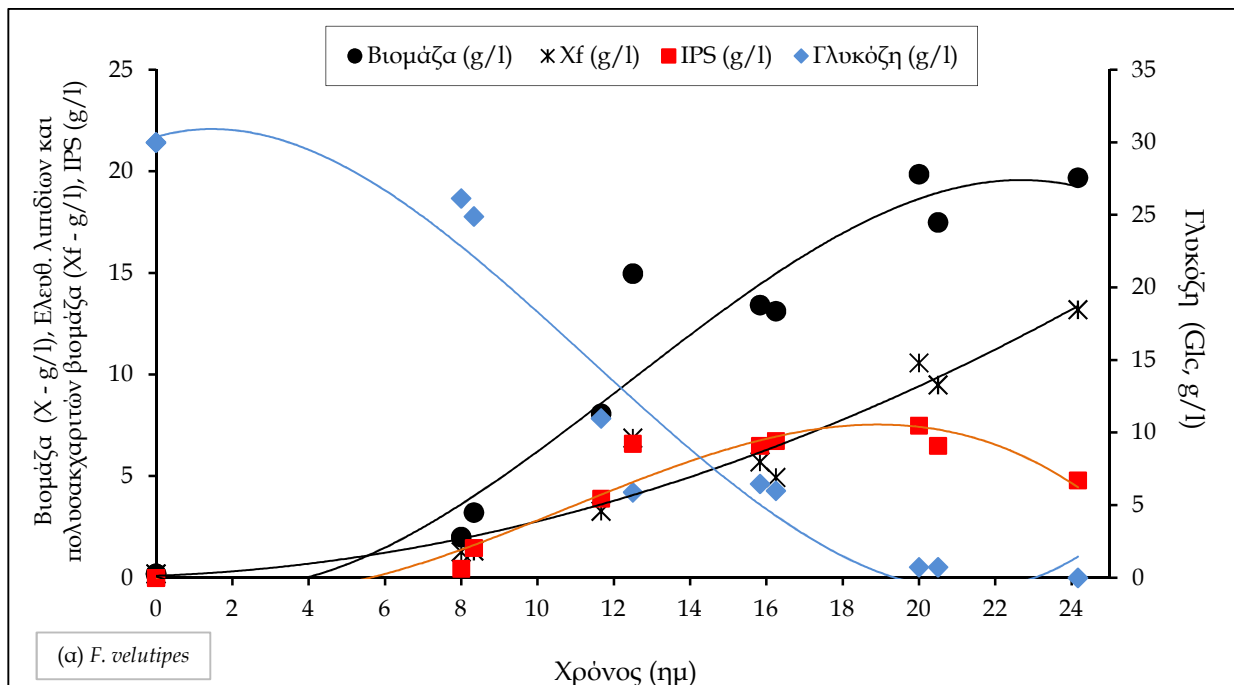


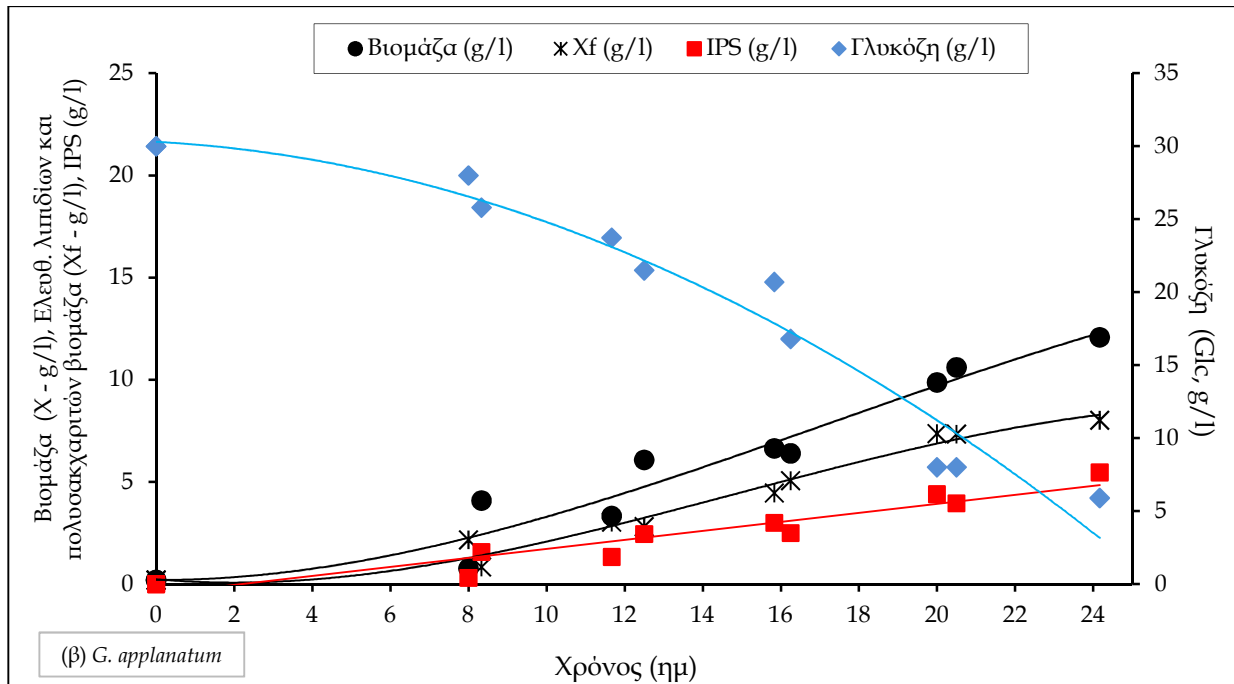
Γράφημα III.10α,β Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS - g/l) ως συνάρτηση της αναλωθείσας γλυκόζης (Glc_c - g/l) κατά την αύξηση των μακρομυκήτων (α) *Agrocybe aegerita* και (β) *Pleurotus pulmonarius* σε στατικές και αναδεδυόμενες ($120 \pm 5 \text{ rpm}$) καλλιέργειες σε φιάλες στους $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ σε θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_o = 30 \text{ g/l}$). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Άλλο ένα ενδιαφέρον δεδομένο το οποίο ανέκυψε από τη μελέτη της κινητικής αύξησης των μακρομυκήτων στο υπόστρωμα GPYS, σχετίζεται με την διεργασία παραγωγής IPS, η οποία φαίνεται να είναι διεργασία συνδεδεμένη με τη μικροβιακή αύξηση (π.χ. αναδεδυόμενη καλλιέργεια του μύκητα *F. velutipes* ή στατική του *G. applanatum* - Γραφήματα

III.11α,β). Στα γραφήματα αυτά δεικνύεται ότι η παραγωγή ελεύθερης λίπους και ενδοπολυσακχαριτών βιομάζας (το «ενεργό» μέρος αυτής, δηλαδή οι πρωτεΐνες και τα νουκλείικά οξέα) παράγεται ταυτοχρόνως με τη σύνθεση των IPS, συμφωνώντας με την προηγούμενη προσέγγιση (θα πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι όλες οι ποσότητες των παραγόμενων λιπιδίων και πολυσακχαριτών δεν είναι «αποθηκευτικές» καθώς υπάρχουν και ποσότητες δομικών - «structural» ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων, όμως οι ποσότητες αυτές ειδικά για τους ενδοπολυσακχαριτες είναι μικρές και σε κάθε περίπτωση πολύ μικρότερες σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των IPS που παράχθηκαν κατά την παρούσα εργασία).

Τέλος, ένα ενδιαφέρον κινητικό και φυσιολογικό δεδομένο το οποίο προκύπτει κυρίως από την καλλιέργεια του μακρομύκητα *F. velutipes* σε αναδεδόμενες καλλιέργειες σχετίζεται με τη βιο-αποικοδόμηση των IPS στα τελευταία στάδια της αύξησης, η οποία συνάδει με τη μειωμένη παρουσία του διαθέσιμου ανθρακικού υποστρώματος στο περιβάλλον της αύξησης (Γράφημα III.11α). Η βιο-αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών συνοδεύτηκε από βιοσύνθεση ελεύθερης λίπους και ενδοπολυσακχαριτών βιομάζας, υποδεικνύοντας και αυτή σημαντική πρωτεΐνοσύνθεση κατά τα στάδια αυτά της ζύμωσης.





Γράφημα III.11α,β Κινητική αύξησης του μακρομύκητα (α) *Flammulina velutipes* σε αναδεδυόμενες (120 ± 5 rpm) και του (β) *Ganoderma applanatum* σε στατικές καλλιέργειες. Εξέλιξη συνολικής βιομάζας ($X - g/l$), ελεύθερης λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών βιομάζας ($X_f - g/l$), γλυκόζης ($Glc - g/l$) και ενδοπολυσακχαριτών ($IPS - g/l$) ως συνάρτηση του χρόνου ζύμωσης. Συνθήκες καλλιέργειας: θερμοκρασία 26 ± 1 °C, θρεπτικό μέσο GPYS με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτητών πειραμάτων

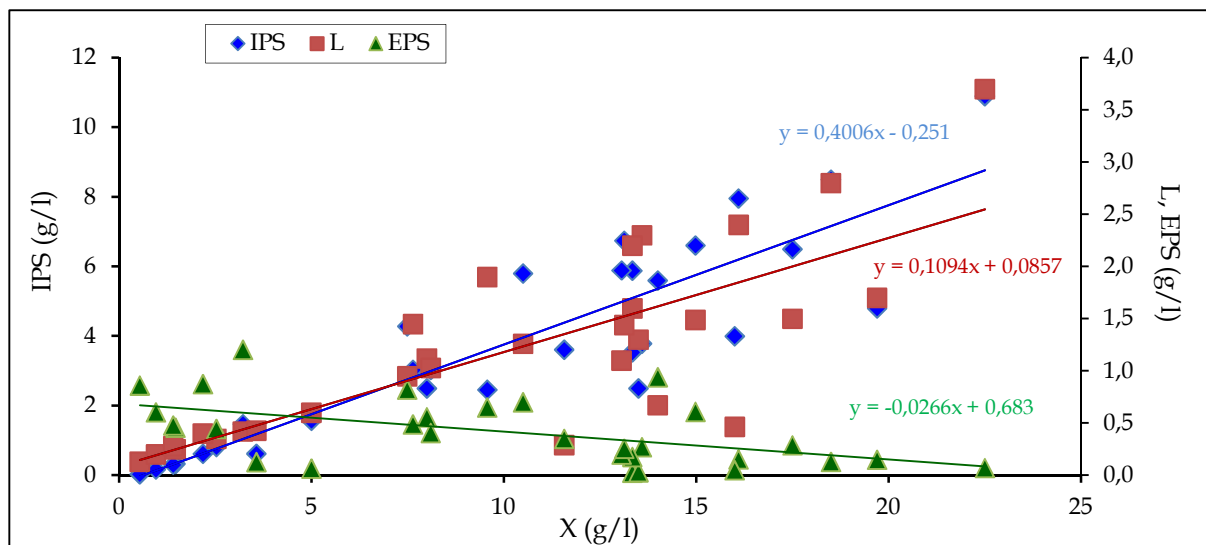
Η στατιστική διερεύνηση της σχέσης των μελετώμενων μεταβλητών (X , EPS , IPS , $Y_{IPS/X}$, L , $Y_{L/X}$), καθώς και οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης και τα επίπεδα σημαντικότητας ($p < 0,05$) παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα III.11α. Είναι εμφανές ότι η παραγωγή βιομάζας (X), παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) και με την περιεκτικότητα του μυκηλίου σε (% κ.β.) λιπίδια ($Y_{L/X}$) και στατιστικά πολύ σημαντική θετική συσχέτιση με τη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων (L) στο μυκήλιο. Ακόμη, η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) σχετίζεται αρνητικά με τη βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων (L), ενώ η παραγωγή IPS σε απόλυτες τιμές (g/l) και η ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS/X}$, % κ.β.) έδειξαν θετική συσχέτιση με τη βιοσύνθεση λιπιδίων (L). Τέλος, αρνητική βρέθηκε η συσχέτιση των λιπιδίων (L) με τους εξωπολυσακχαριτές (EPS) και θετική με τους ενδοπολυσακχαριτές (IPS) και μάλιστα στατιστικά σημαντική. Η θετική συσχέτιση της βιομάζας (X) με τη συσσώρευση

Πίνακας III.11α Ανάλυση συσχέτισης των μεταβλητών (X - g/l, EPS - g/l, IPS - g/l, Y_{IPS/X} - g/g, L - g/l, Y_{L/X} - %, κ.β.) από τους έξι επιλεγμένους μακρομύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30 g/l) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella voluacea*) σε στατικές και αναδευόμενες (120±5 rpm) καλλιέργειες για ~24 ημέρες

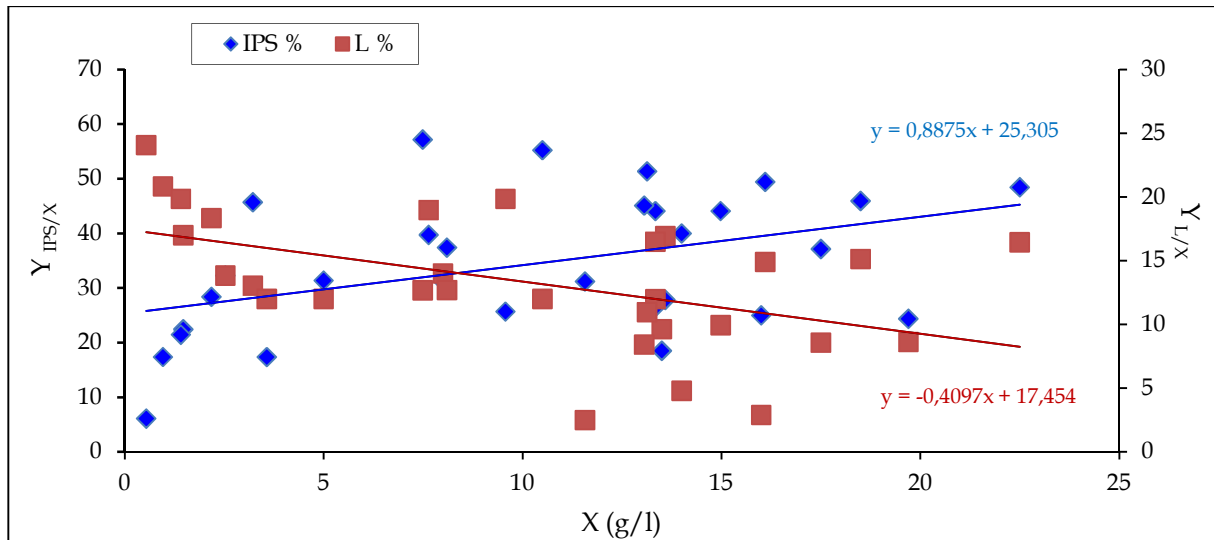
	X	EPS	IPS	Y _{IPS/X}	L	Y _{L/X}
X		-0,5150*	0,8825	0,2500	0,6970	-0,4802
		0,0000***+	0,0000+	0,0541	0,0000+	0,0001+
EPS	-0,5150		-0,3497	0,1284	-0,4642	0,1570
	0,0000+		0,0062+	0,3283	0,0002+	0,2310
IPS	0,8825	-0,3497		0,5950	0,7043	-0,3752
	0,0000+	0,0062+		0,0000+	0,0000+	0,0031+
Y _{IPS/X}	0,2500	0,5950	0,5950		0,2733	-0,1742
	0,0541	0,0000+	0,0000+		0,0346+	0,1830
L	0,6970	-0,4642	0,7043	0,2733		0,1909
	0,0000+	0,0002+	0,0000+	0,0346+		0,1440
Y _{L/X}	-0,4802	0,1570	-0,3752	-0,1742	0,1909	
	0,0001+	0,2310	0,0031+	0,1830	0,1440	

*: Συντελεστής συσχέτισης, **Επίπεδο σημαντικότητας (p<0,05, τιμές μικρότερες από 0,05 είναι στατιστικά σημαντικές*)

ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων (L) στο μυκήλιο και η αρνητική συσχέτισή της με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) παρουσιάζεται και στο ακόλουθο Γράφημα III.12.



Γράφημα III.12 Σχέση της βιομάζας (X - g/l) με τη βιοσύνθεση EPS - g/l, IPS - g/l και L - g/l από τους έξι μακρομύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30 g/l) στους 26±1 °C (32±2 °C για τον *Volvariella voluacea*) σε αναδευόμενες (120±5 rpm) καλλιέργειες για ~24 ημέρες



Γράφημα III.13 Σχέση της βιομάζας (X - g/l) με την περιεκτικότητα του μυκηλίου σε ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{IPS/X}$ - %, κ.β.) και λιπίδια ($Y_{L/X}$ - %, κ.β.) κατά την καλλιέργεια των έξι επιλεγμένων μακρομυκήτων σε θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_0=30$ g/l) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *Volvariella volvacea*) σε αναδεδόμενες (120 ± 5 rpm) καλλιέργειες για ~ 24 ημέρες

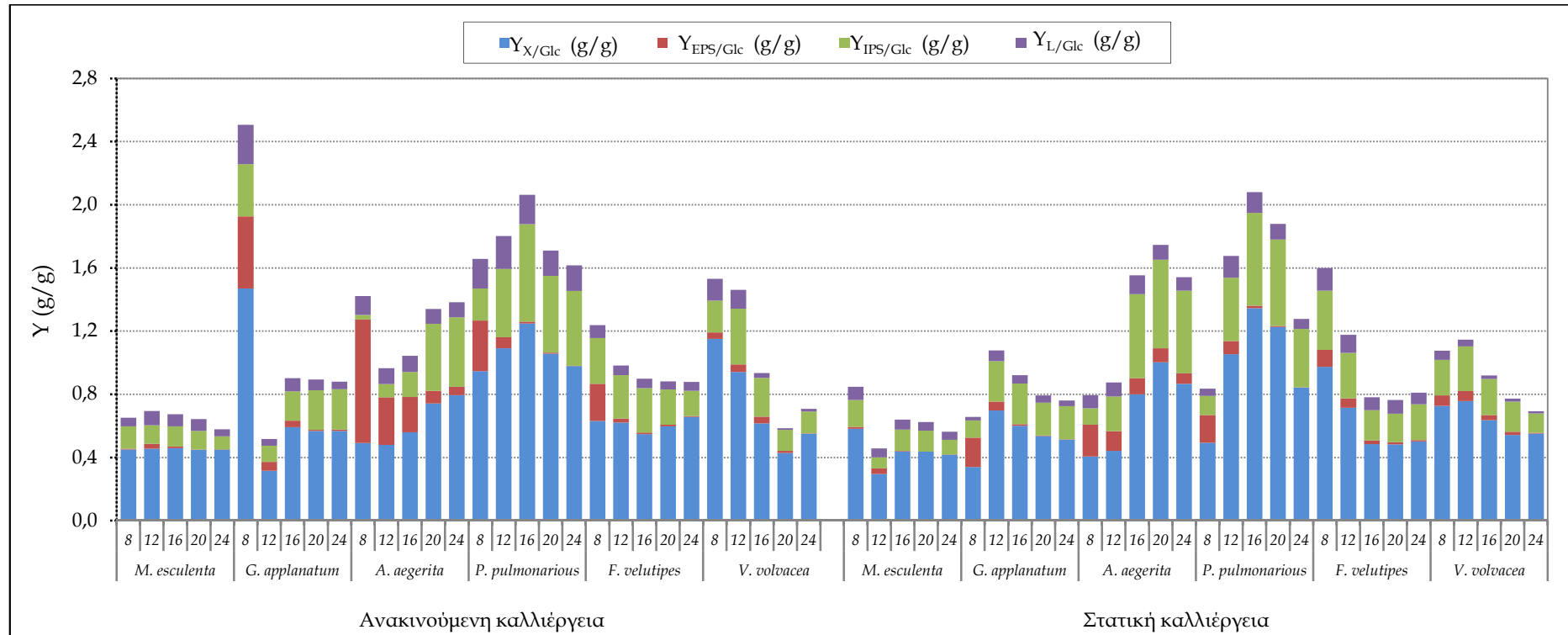
Ακόμη, όπως φαίνεται στο Γράφημα III.13, στις αναδεδόμενες καλλιέργειες των μυκήτων, η αύξηση της μυκηλιακής μάζας δείχνει να σχετίζεται θετικά με την περιεκτικότητα του μυκηλίου σε ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{IPS/X}$) και αρνητικά με την περιεκτικότητα του μυκηλίου σε λιπίδια ($Y_{L/X}$).

Τέλος, η ανάλυση των συσχετισμών των αποδόσεων των μελετώμενων παραμέτρων σε σχέση με την κατανάλωση γλυκόζης ($Y_{X/Glc}$, $Y_{EPS/Glc}$, $Y_{IPS/Glc}$, $Y_{L/Glc}$, g/g) (Πίνακας III.11β) επιβεβαίωσε τη στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της εκμετάλλευσης της γλυκόζης προς σχηματισμό βιομάζας ($Y_{X/Glc}$) με τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών ($Y_{IPS/Glc}$) και λιπιδίων ($Y_{L/Glc}$), τόσο στις στατικές όσο και στις ανακινούμενες καλλιέργειες, καθώς και τη θετική συσχέτιση των συντελεστών απόδοσης των παραγόμενων EPS και IPS ανά μονάδα αναλωθείσας γλυκόζης ($Y_{EPS/Glc}$ και $Y_{IPS/Glc}$ αντίστοιχα) με τον αντίστοιχο των λιπιδίων ($Y_{L/Glc}$), κυρίως στις ανακινούμενες καλλιέργειες. Στις αναδεδόμενες καλλιέργειες είναι περισσότερο εμφανής και η αρνητική σχέση μεταξύ των συντελεστών απόδοσης $Y_{EPS/Glc}$ και $Y_{IPS/Glc}$, ιδιαίτερα στους μύκητες *A. aegerita*, *G. applanatum*, *P. pulmonarius* (Γράφημα III.14) όπου την καλύτερη εκμετάλλευση της γλυκόζης του υποστρώματος προς σχηματισμό EPS στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας διαδέχεται αύξηση του συντελεστή σύνθεσης ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών ($Y_{IPS/Glc}$) μετά τη 12^η-16^η ημέρα της καλλιέργειας.

Πίνακας III.11β Ανάλυση συσχέτισης των αποδόσεων Y σε σχέση με την κατανάλωση γλυκόζης ($Y_{X/Glc}$, $Y_{EPS/Glc}$, $Y_{IPS/Glc}$, $Y_{L/Glc}$ - g/g) από τους έξι επιλεγμένους μακρομύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_0=30$ g/l) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *Volvariella voluacea*) σε στατικές και αναδεδυόμενες (120 ± 5 rpm) καλλιέργειες για ~24 ημέρες

	$Y_{X/Glc}$	$Y_{EPS/Glc}$	$Y_{IPS/Glc}$	$Y_{L/Glc}$
$Y_{X/Glc}$		0,0880*	0,8089	0,7534
		0,5036**	0,0000+	0,0000+
$Y_{EPS/Glc}$	0,0880		-0,1650	0,3799
	0,5036		0,2078	0,0028+
$Y_{IPS/Glc}$	0,8089	-0,1650		0,5218
	0,0000+	0,2078		0,0000+
$Y_{L/Glc}$	0,7534	0,3799	0,5218	
	0,0000+	0,0028+	0,0000+	

*: Συντελεστής συσχέτισης, **Επίπεδο σημαντικότητας ($p<0,05$, τιμές μικρότερες από 0,05 είναι στατιστικά σημαντικές+)



Γράφημα III.14 Συντελεστές απόδοσης βιομάζας, EPS, IPS και λιπιδίων σε σχέση με την κατανάλωση γλυκόζης ($Y_{X/Glc}$, $Y_{EPS/Glc}$, $Y_{IPS/Glc}$, $Y_{L/Glc}$ - g/g) κατά την αύξηση των μακρομυκήτων *Agrocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Morchella esculenta*, *Pleurotus pulmonarius* και *Volvariella voluacea* σε θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_0=30$ g/l) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *V. voluacea*) σε στατικές και αναδεδόμενες (120±5 rpm) καλλιέργειες για 24 ημέρες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων

Επιπλέον, η σύνθεση των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών σε απλά σάκχαρα μελετήθηκε για όλους τους ανωτέρω μακρομύκητες, τόσο σε στατικές (Πίνακας III.12α) όσο και σε αναδεδυόμενες (Πίνακας III.12β) καλλιέργειες σε τέσσερα στάδια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα ποσοτικά δεδομένα των αναλύσεων έδειξαν ότι το κύριο σάκχαρο το οποίο ανιχνεύτηκε ήταν η γλυκόζη, σε ποσοστό που κυμαινόταν από 72 έως 95%, κ.β. στις στατικές και 77 έως 100%, κ.β. στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Αυτό το σάκχαρο ήταν ο μοναδικός υδατάνθρακας που ανιχνεύτηκε στους πολυσακχαρίτες του μακρομύκητα *A. aegerita* κάτω από αναδεδυόμενες συνθήκες, ενώ και στον *G. applanatum* στα πρώτα στάδια της ζύμωσης στις αναδεδυόμενες φιάλες παράχθηκε μόνο γλυκόζη. Σε μικρότερη ποσότητα από ό,τι η γλυκόζη (έως 20%, κ.β.) ανιχνεύτηκε η φρουκτόζη, ενώ άλλα συστατικά σακχαρούχου φύσης που ανιχνεύτηκαν σε σχετικά μικρότερες ποσότητες ήταν η σακχαρο-αλκοόλες μαννιτόλη και ξυλιτόλη (έως 10%, κ.β.). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μαννιτόλη παράχθηκε σε σημαντική ποσότητα τόσο στον μακρομύκητα *M. esculenta* (20-40%, κ.β.), όσο και στον *P. pulmonarius* (20% κ.β.). Ωστόσο, τόσο η μαννιτόλη όσο και η ξυλιτόλη παράχθηκαν κυρίως στις στατικές καλλιέργειες, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον μακρομύκητα *G. applanatum* όπου παρατηρήθηκε πλήρης απουσία των σακχάρων αυτών στις αναδεδυόμενες φιάλες. Αντίστοιχα, στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες του *A. aegerita* δεν ανιχνεύθηκε καθόλου μαννιτόλη, αν και υπήρχε στις στατικές. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα των σακχάρων που παράχθηκαν από την υδρόλυση των IPS του *A. aegerita* δίνεται στις Εικόνες III.3 (στατικές) και III.4 (αναδεδυόμενες καλλιέργειες).

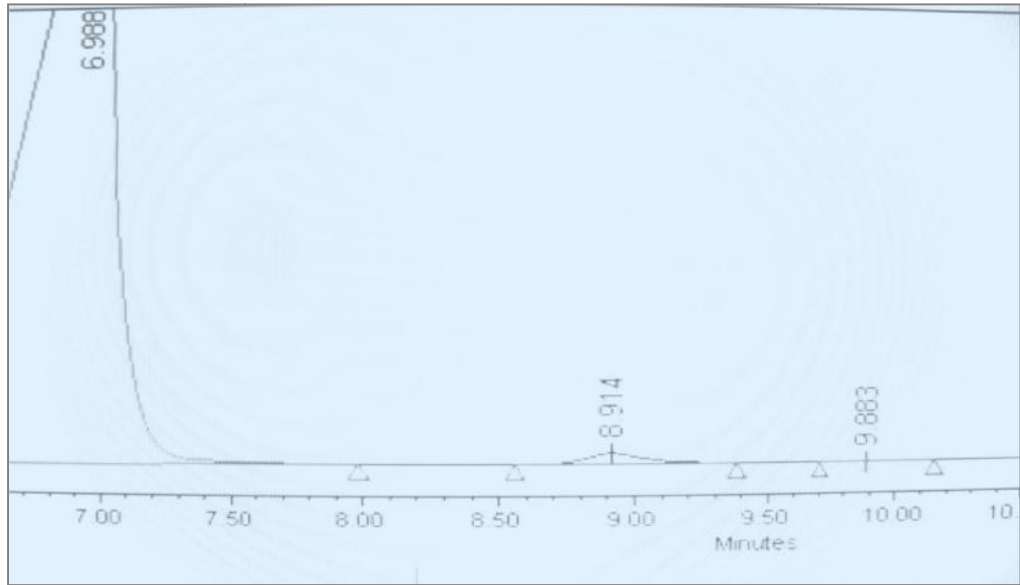
Επίσης, η σύσταση των ενδοπολυσακχαριτών κατά την κινητική αύξηση των μακρομυκήτων στον χρόνο καλλιέργειας έδειξε τάσεις αυξομείωσης των απλών σακχάρων ανάλογα το στέλεχος και την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης. Ειδικότερα, κατά την καλλιέργεια των μακρομυκήτων *G. applanatum* και *P. pulmonarius* παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της γλυκόζης στις στατικές φιάλες αλλά μείωσή της στις αναδεδυόμενες, ενώ στον *V. voluacea* η γλυκόζη μειώνονταν ανεξάρτητα της εφαρμογής ή όχι ανάδευσης. Επίσης, η ποσότητα της μαννιτόλης μειώνονταν κατά την καλλιέργεια των *M. esculenta* και *P. pulmonarius* υπό στατικές συνθήκες, ενώ αντίθετα αυξάνονταν υπό αναδεδυόμενες.

Πίνακας III.12α Σύσταση ολικών ενδοσακχαριτών σε απλά σάκχαρα κατά την καλλιέργεια έξι μακρομυκήτων σε θρεπτικό μέσο GPYS ($\text{Gl}_c=30$ g/l) στους 26 ± 1 °C (32 ± 2 °C για τον *Volvariella volvacea*) σε στατικές καλλιέργειες για 20 ημέρες. Το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων

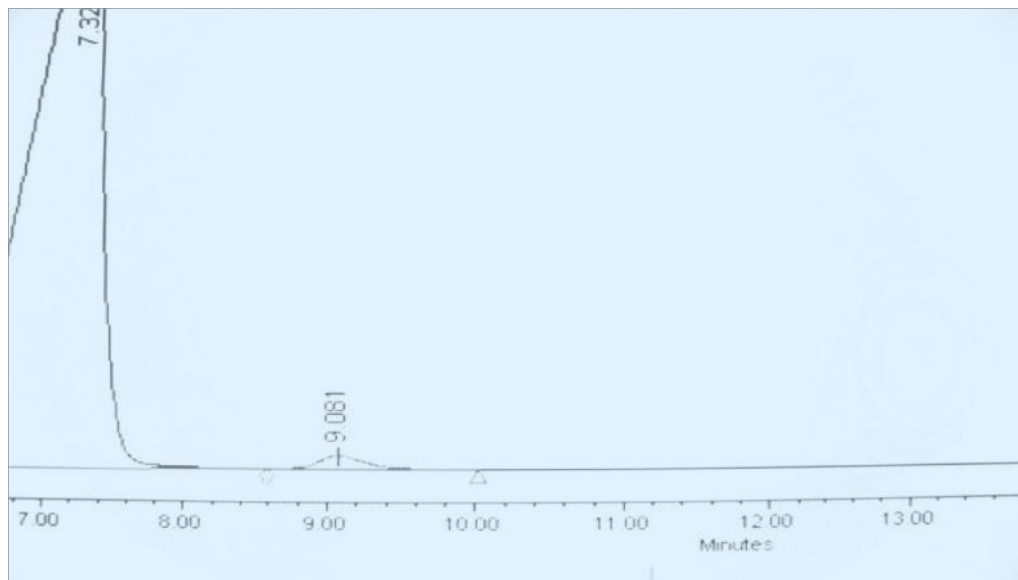
Στατική/		Σάκχαρα (% κ.β. των ολικών ενδοσακχαριτών)			
Μακρομύκητας	Χρόνος (ημ)	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαννιτόλη	Ξυλιτόλη
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	89,50	-	10,50	-
	12 ^η	92,40	-	7,60	-
	16 ^η	93,26	-	6,74	-
	20 ^η	96,90	-	3,10	-
<i>F. velutipes</i>	8 ^η	78,95	-	-	21,05
	12 ^η	69,34	8,89	7,13	14,65
	16 ^η	70,20	11,00	10,00	8,80
	20 ^η	74,47	13,94	11,60	-
<i>G. applanatum</i>	8 ^η	72,00	7,00	6,00	15,00
	12 ^η	73,37	8,70	7,07	10,87
	16 ^η	79,50	10,50	5,00	5,00
	20 ^η	82,36	13,27	-	4,37
<i>M. esculenta</i>	8 ^η	79,90	-	20,10	-
	12 ^η	58,31	8,96	27,50	5,22
	16 ^η	65,53	7,00	24,47	3,00
	20 ^η	77,01	6,38	16,61	-
<i>P. pulmonarius</i>	8 ^η	80,62	-	19,38	-
	12 ^η	79,50	-	20,50	-
	16 ^η	84,00	-	16,00	-
	20 ^η	88,49	-	11,51	-
<i>V. volvacea</i>	8 ^η	95,00	-	5,00	-
	12 ^η	95,30	-	4,70	-
	16 ^η	79,55	20,45	-	-
	20 ^η	81,15	18,85	-	-

Πίνακας III.12β Σύσταση ολικών ενδοσακχαριτών σε απλά σάκχαρα κατά την καλλιέργεια έξι μακρομυκήτων σε θρεπτικό μέσο GPYS ($\text{Gl}_c=30 \text{ g/l}$) στους $26\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ($32\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ για τον *Volvariella volvacea*) σε αναδεδόμενες ($120\pm 5 \text{ rpm}$) καλλιέργειες για 20 ημέρες. Το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων

Αναδεδόμενη/		Σάκχαρα (% κ.β. των ολικών ενδοσακχαριτών)			
Μακρομύκητας	Χρόνος (ημ)	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαννιτόλη	Ξυλιτόλη
<i>A. aegerita</i>	8 ^η	100,00	-	-	-
	12 ^η	100,00	-	-	-
	16 ^η	100,00	-	-	-
	20 ^ή	100,00	-	-	-
<i>F. velutipes</i>	8 ^η	95,00	5,00	-	-
	12 ^η	77,37	7,16	6,24	9,24
	16 ^η	80,00	10,00	5,00	5,00
	20 ^ή	85,11	14,89	-	-
<i>G. applanatum</i>	8 ^η	100,00	-	-	-
	12 ^η	100,00	-	-	-
	16 ^η	95,00	5,00	-	-
	20 ^ή	82,21	11,79	-	-
<i>M. esculenta</i>	8 ^η	77,82	2,00	18,18	-
	12 ^η	62,91	6,62	38,47	-
	16 ^η	70,00	5,00	25,00	-
	20 ^ή	78,46	-	21,54	-
<i>P. pulmonarius</i>	8 ^η	95,00	-	5,00	-
	12 ^η	94,60	-	4,40	-
	16 ^η	92,63	-	7,37	-
	20 ^ή	81,48	4,76	13,76	-
<i>V. volvacea</i>	8 ^η	96,00	-	4,00	-
	12 ^η	96,70	-	3,30	-
	16 ^η	86,67	11,33	-	-
	20 ^ή	84,57	15,43	-	-



Εικόνα III.3 Χρωματογράφημα των απλών σακχάρων των ενδοπολυσακχαριτών που παράχθηκαν κατά την 8^η ημέρα καλλιέργειας του μακρομύκητα *Agrocybe aegerita* στο θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30g/l) στους 26±1 °C υπό στατικές, όπου Rt=8,914 min αντιστοιχεί στη γλυκόζη και 9,883 min αντιστοιχεί στη μαννιτόλη



Εικόνα III.4 Χρωματογράφημα των απλών σακχάρων των ενδοπολυσακχαριτών που παράχθηκαν κατά την 8^η ημέρα καλλιέργειας του μακρομύκητα *Agrocybe aegerita* στο θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30g/l) στους 26±1 °C υπό αναδευόμενες συνθήκες (120±5 rpm) όπου Rt=9,081 min αντιστοιχεί στη γλυκόζη

III.4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ *VOLVARIELLA VOLVACEA* ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ GPYS

Με βάση τα κεφάλαια III.2 και III.3 δεικνύεται ότι ο μακρομύκητας *V. volvacea* AMRL 190 απέτελεσε ένα αξιόλογο στέλεχος σχετικά με τη δυναμική του ως προς την παραγωγή βιομάζας και εξωπολυσακχαριτών. Περαιτέρω, η ανάλυση σε ΛΟ των κοτταρικών λιπιδίων του μύκητα αυτού έδειξε σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με την τυπική σύσταση σε ΛΟ των λοιπών εδωδιμών και φαρμακευτικών μυκήτων. Στο παρόν κεφάλαιο, μελετήθηκαν η κινητική συμπεριφορά και άλλων στελεχών του μακρομύκητα *V. volvacea* (ήτοι AMRL 188, AMRL 191, AMRL 192) και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα με το στέλεχος AMRL 190. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη ανάλυση των κοτταρικών λιπιδίων και των λιπιδιακών κλασμάτων των μακρομυκήτων αυτών. Όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια, υπάρχει έλλειψη βιβλιογραφικών δεδομένων για αυτού του είδους την προσέγγιση και για αυτό το λόγο ήταν επιθυμητή η περαιτέρω μελέτη και άλλων στελεχών του μύκητα *V. volvacea*.

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ταχύτητα μυκηλιακής αύξησης (K_r (mm/ημ) σε τέσσερα στελέχη του μύκητα *V. volvacea* (AMRL 188, AMRL 190, AMRL 191, AMRL 192) σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (GPYSA). Το pH του θρεπτικού μέσου μετά την αποστείρωση ήταν 5,65. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.13, σύμφωνα με τον οποίο η τιμή της ταχύτητας γραμμικής αύξησης δε διέφερε για τα τρία (AMRL 188, AMRL 190 και AMRL 191) και με μικρή διαφορά το AMRL 190 ήταν πρώτο με ταχύτητα $8,77 \pm 0,40$ mm/ημ. Αυτό που διέφερε, ώστε να χαρακτηριστεί το πιο αργό, ήταν το στέλεχος AMRL 192.

Πίνακας III.13 Γραμμική ταχύτητα του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* (K_r - στελέχη AMRL 188, AMRL 190, AMRL 191 και AMRL 192) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό GPYSA ($\text{Glc}_0=30$ g/l) στους $32 (\pm 2)^\circ\text{C}$

Στέλεχη <i>Volvariella volvacea</i>	K_r (mm/ημ)
AMRL 188	$8,58 \pm 0,43$
AMRL 190	$8,77 \pm 0,40$
AMRL 191	$8,37 \pm 0,39$
AMRL 192	$7,30 \pm 0,40$

Σε επόμενο στάδιο, τα τέσσερα στελέχη του μύκητα *V. voluacea* (AMRL 188, AMRL 190, AMRL 191 και AMRL 192) καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης (GPYS). Οι καλλιέργειες ήταν βυθού, κλειστού τύπου και σε μη αναδεδόμενη (στατική). Στον Πίνακα III.14 δίνονται συνοπτικά κινητικά δεδομένα της καλλιέργειας όπου (α) οι μακρομύκητες σημείωσαν τη μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας ($Y_{L/X}$, σε %, κ.β.) και (β) την μέγιστη τιμή παραγόμενης ξηράς βιομάζας (σε g/l). Στον πίνακα αναγράφεται και η ταχύτητα κατανάλωσης της γλυκόζης (r_{Glc} , σε g/l/ημ) για τη χρονική περίοδο της ζύμωσης όπου πραγματοποιήθηκε η κατανάλωση αυτή. Όπως φαίνεται, τα τεσσάρα μελετώμενα στελέχη κατανάλωσαν τη διαθέσιμη ποσότητα της γλυκόζης με σχετικά διαφορετικές ταχύτητες κατανάλωσης του υποστρώματος, καθώς η μεγαλύτερη r_{Glc} καταγράφηκε στον

Πίνακας III.14 Κινητική τεσσάρων στελεχών του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* σε υγρή μη-αναδεδόμενη καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη ($Glc_0=30$ g/l) στους 32 ± 2 °C. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

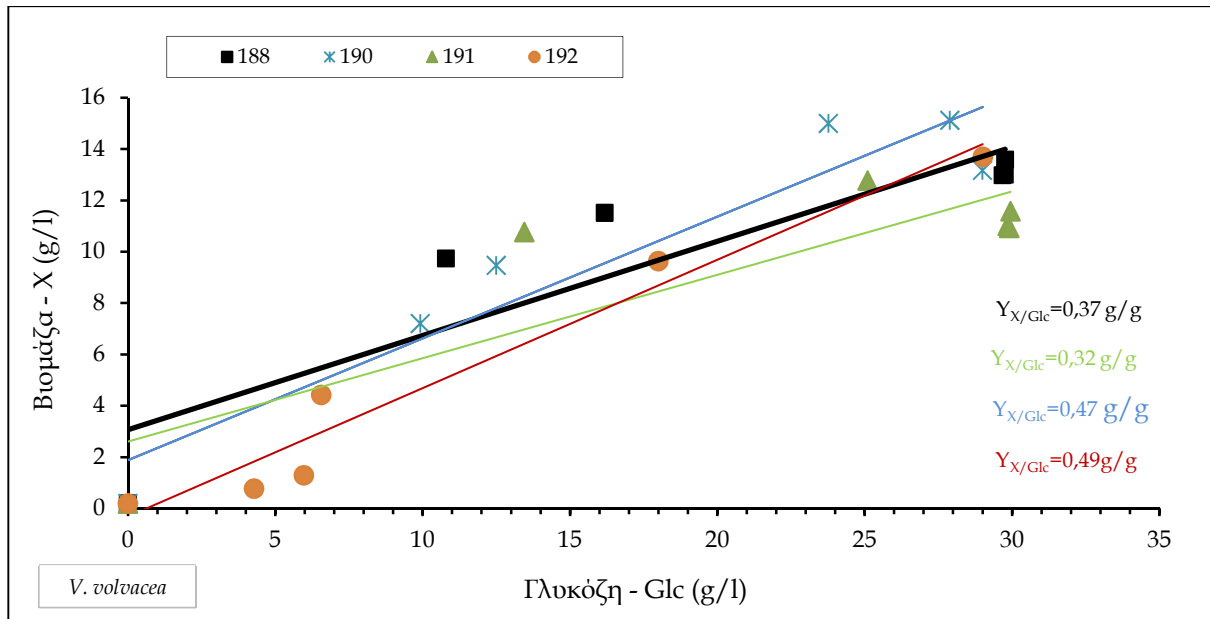
Στελέχη <i>V. voluacea</i>	Χρόνος (ημ)	X (g/l)	Glc _c (g/l)	L (g/l)	Y _{L/X} (%, κ.β.)	r _{Glc} (g/l/ημ)	
AMRL 188	α	20 ^η	13,0	29,7	0,78	6,1	1,88
	β	16 ^η	13,6	29,8	0,79	5,8	
AMRL 190	α	8 ^η	7,2	9,9	0,57	7,9	1,49
	β	16 ^η	15,0	23,8	0,51	3,4	
AMRL 191	α	16 ^η	11,1	29,8	0,70	6,3	1,55
	β	12 ^η	12,8	25,1	0,50	3,9	
AMRL 192	α	8 ^η	0,8	4,3	0,09	11,9	1,21
	β	24 ^η	13,7	29,0	0,42	3,1	

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/l), L: το παραγόμενο λίπος (g/l), Glc_c: η καταναλωθείσα συγκέντρωση της γλυκόζης (g/l), Y_{L/X}: το ποσοστό συνολικού λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.), r_{Glc}: η ταχύτητα κατανάλωσης της γλυκόζης (σε g/l/ημ), η οποία προσδιορίστηκε από τον τύπο $r_{Glc} = -\frac{\Delta \cdot Glc}{\Delta t}$ κατά την

«παραγωγική» φάση της ζύμωσης.

α: μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.)

β: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)



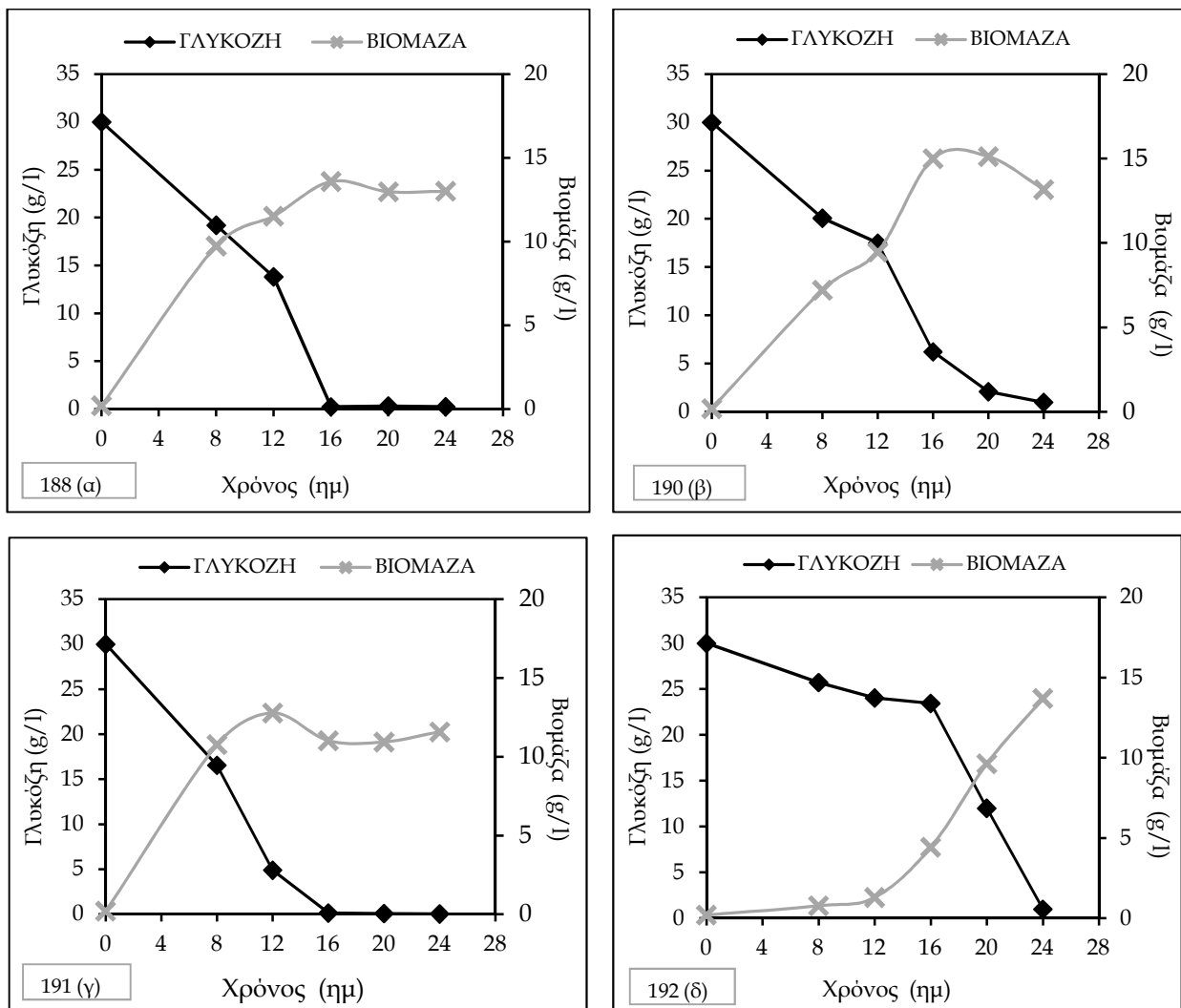
Γράφημα III.15 Παραγόμενη μυκηλιακή βιομάζα ($X - g/l$) ως συνάρτηση της αναλωθείσας γλυκόζης ($Glc_c - g/l$) κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* (στελέχη AMRL 188, AMRL 190, AMRL 191 και AMRL 192) στο θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_o=30 g/l$), σε θερμοκρασία $32\pm 2^\circ C$ υπό μη αναδεδυόμενες συνθήκες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

V. voluacea AMRL 188, ακολούθησαν τα στελέχη 190 και 191 και τέλος το 192. Σε αρμονία και με τα δεδομένα του Πίνακα III.13, ο μακρομύκητας ο οποίος παρουσίασε τη βραδύτερη κατανάλωση του υποστρώματος ήταν το στέλεχος AMRL 192, ενώ οι τελικές μέγιστες τιμές βιομάζας (X_{max}) ήταν της τάξης των 12,8 με 15,0 g/l. Ακόμα, οι αντίστοιχες τελικές τιμές του συντελεστή απόδοσης βιομάζας ως προς την καταναλισκόμενη γλυκόζη ($Y_{X/Glc}$) κυμαίνονταν εντός των ορίων 0,32-0,49 g/g, όπως φαίνεται και από το παραπάνω Γράφημα III.15. Ειδικότερα, η μικρότερη τιμή του $Y_{X/Glc}$ (0,32 g/g) υπολογίστηκε για τον *V. voluacea* AMRL 191, ο οποίος παρήγαγε και τη μικρότερη ποσότητα βιομάζας (12,8 g/l), ενώ ο μεγαλύτερος για τα στελέχη 192 και 190 (0,49 και 0,47 g/g αντίστοιχα) στα οποία παράχθηκε και η περισσότερη βιομάζα (Πίνακας III.14).

Σε κάποιες από τις πραγματοποιηθείσες καλλιέργειες (π.χ. στελέχη AMRL 188, 191 και κυρίως 190) παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της βιομάζας στις τελευταίες φάσεις της αύξησης, πιθανώς λόγω αυτόλυσης των μυκηλιακών δομών των μικροοργανισμών. Η αυτόλυση των μυκηλίων πιθανώς να οφείλεται σε μείωση της διαθέσιμης γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης κατά το στάδιο εκείνο του αυξητικού κύκλου. Στο παρακάτω Γράφημα III.16 δίνονται οι κινητικές της παραγωγής βιομάζας και της αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης των στελεχών του *V. voluacea* AMRL 188 (α), AMRL

190 (β), AMRL 191 (γ) και AMRL 192 (δ), όπου φαίνεται πως η 12^η (για τον 191) και η 16^η ημέρα (για τους 188 και 190) υπήρξε το οριακό χρονικό σημείο της ζύμωσης πέρα από το οποίο η παραγωγή της βιομάζας παρουσίασε ‘πλατώ’ και σταθεροποιήθηκε ή στην περίπτωση του *V. voluacea* 190 άρχισε να μειώνεται. Διαφορετική κινητική παρουσίασε το στέλεχος 192 στο οποίο υπήρξε συνεχής παραγωγή βιομάζας μέχρι το τέλος της καλλιέργειας (24 ημέρες).

Περαιτέρω, η μελέτη της κινητικής των ολικών ενδοκυτταρικών λιπιδίων (g/l και %, κ.β., επί ξηράς ουσίας) των τεσσάρων στελεχών (Πίνακας III.15) έδειξε αντιστοίχα

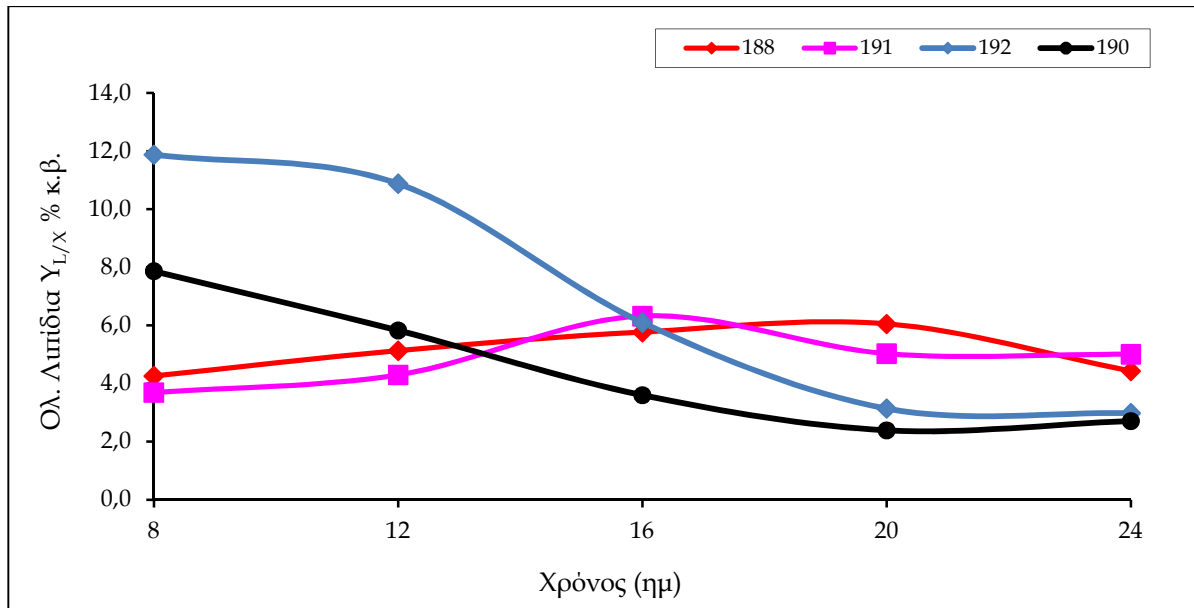


Γράφημα III.16α,β,γ,δ Κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* (στελέχη AMRL 188, 189, 190), στο θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30 g/l), στους 32±2 °C, σε μη αναδεδωμένες συνθήκες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

αποτελέσματα, όπως και στους περισσότερους από τους προηγούμενους μελετώμενους μύκητες (βλ. κεφάλαιο III.3). Έτσι, παρά το γεγονός ότι και σε αυτές τις καλλιέργειες δεν παράχθηκαν υψηλές ποσότητες λιπιδίων (ποσότητα λιγότερη από 1 g/l), η ποσότητα των λιπιδίων ανά μονάδα βιομάζας ($Y_{L/X}$, % κ.β.) που συντέθηκε ήταν σε ορισμένα στελέχη αξιόλογη, όπως στην περίπτωση του 190 (6-8%, κ.β.) και κυρίως του 192 (11-12%, κ.β.). Καθώς ο μακρομύκητας *V. voluacea* δεν είναι ελαιογόνος, ενώ και οι συνθήκες καλλιέργειας δεν ευνοούσαν τη συσσώρευση υψηλών ποσοτήτων μικροβιακών λιπιδίων, η τάση η οποία

Πίνακας III.15 Κινητική εξέλιξης του ολικού παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους (g/l και % κ.β. επί ξηρού) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* (στελέχη AMRL 188, 190, 191 και 192) σε θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_0=30$ g/l), υπό στατικές συνθήκες στους $32 (\pm 2) ^\circ C$

Στελέχη <i>V. voluacea</i>	Χρόνος (ημέρες)	Ολικά λιπίδια	
		(g/l)	($Y_{L/X}$, % κ.β)
AMRL 188	8 ^η	0,42	4,26
	12 ^η	0,60	5,13
	16 ^η	0,79	5,77
	20 ^η	0,77	6,05
	24 ^η	0,60	4,43
AMRL 190	8 ^η	0,39	7,87
	12 ^η	0,45	5,83
	16 ^η	0,57	3,60
	20 ^η	0,53	2,39
	24 ^η	0,34	2,71
AMRL 191	8 ^η	0,39	3,69
	12 ^η	0,50	3,87
	16 ^η	0,68	6,32
	20 ^η	0,74	5,03
	24 ^η	0,70	5,01
AMRL 192	8 ^η	0,11	11,88
	12 ^η	0,14	10,88
	16 ^η	0,27	6,10
	20 ^η	0,29	3,14
	24 ^η	0,42	2,98



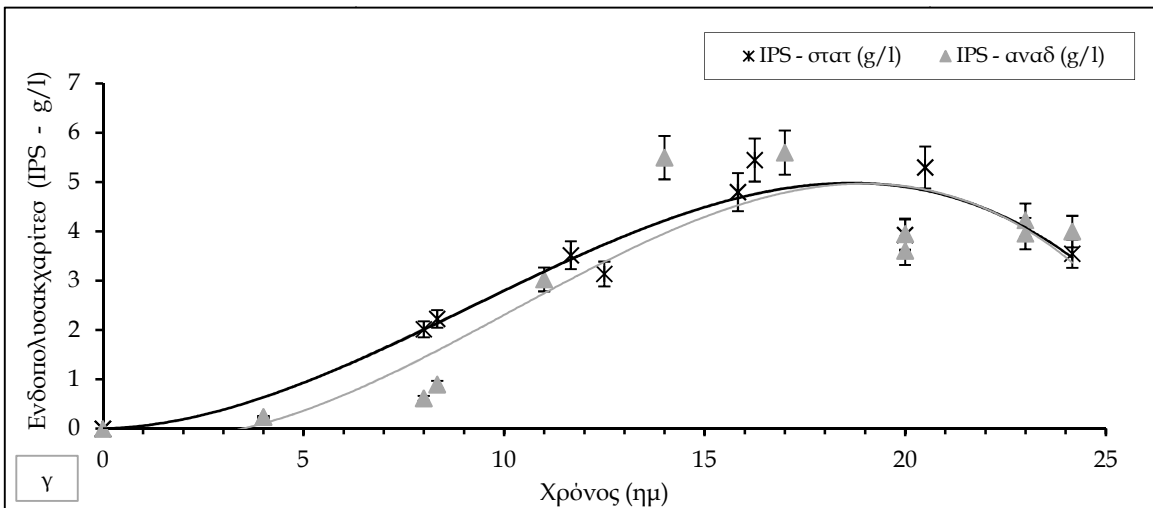
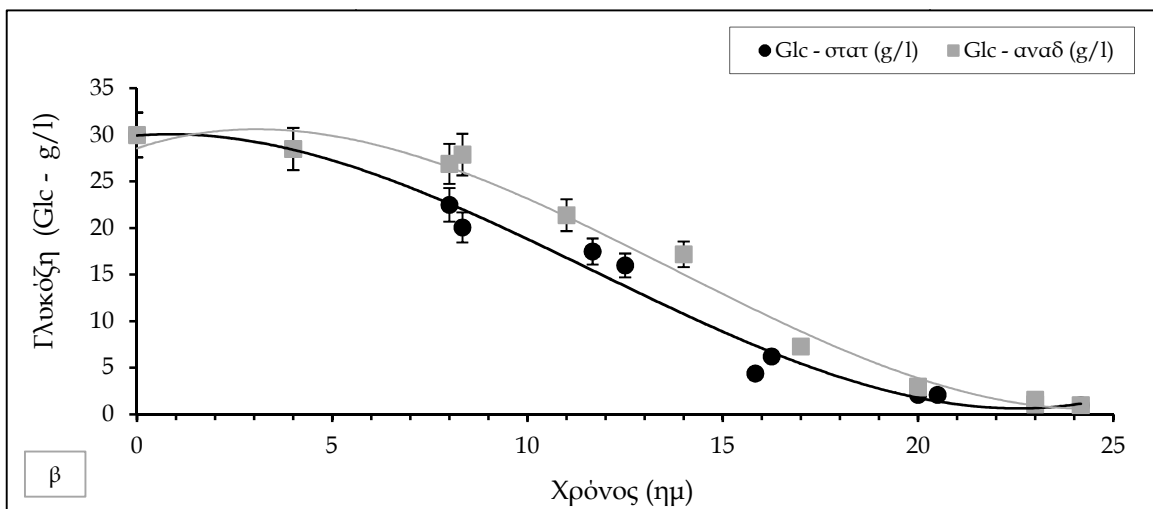
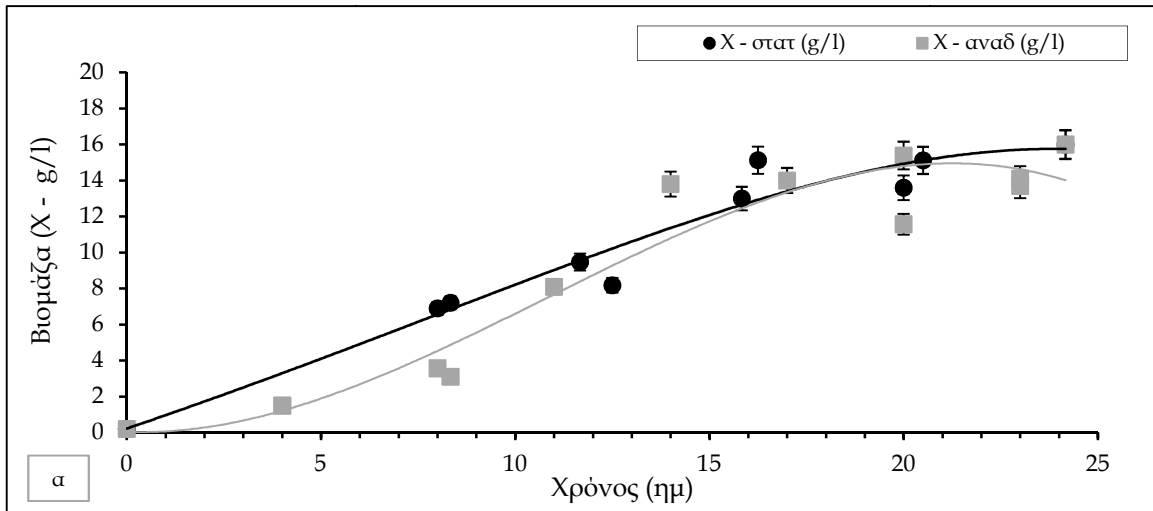
Γράφημα III.17 Κινητική εξέλιξης των κυτταρικών λιπιδίων προς την ξηρά μυκηλιακή μάζα ($Y_{L/X}$ - %, κ.β.) κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* (στελέχη AMRL 188, 190, 191 και 192) στο θρεπτικό μέσο GPYS ($Glc_0=30$ g/l), στους 32 ± 2 °C, σε μη αναδεδυόμενες συνθήκες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

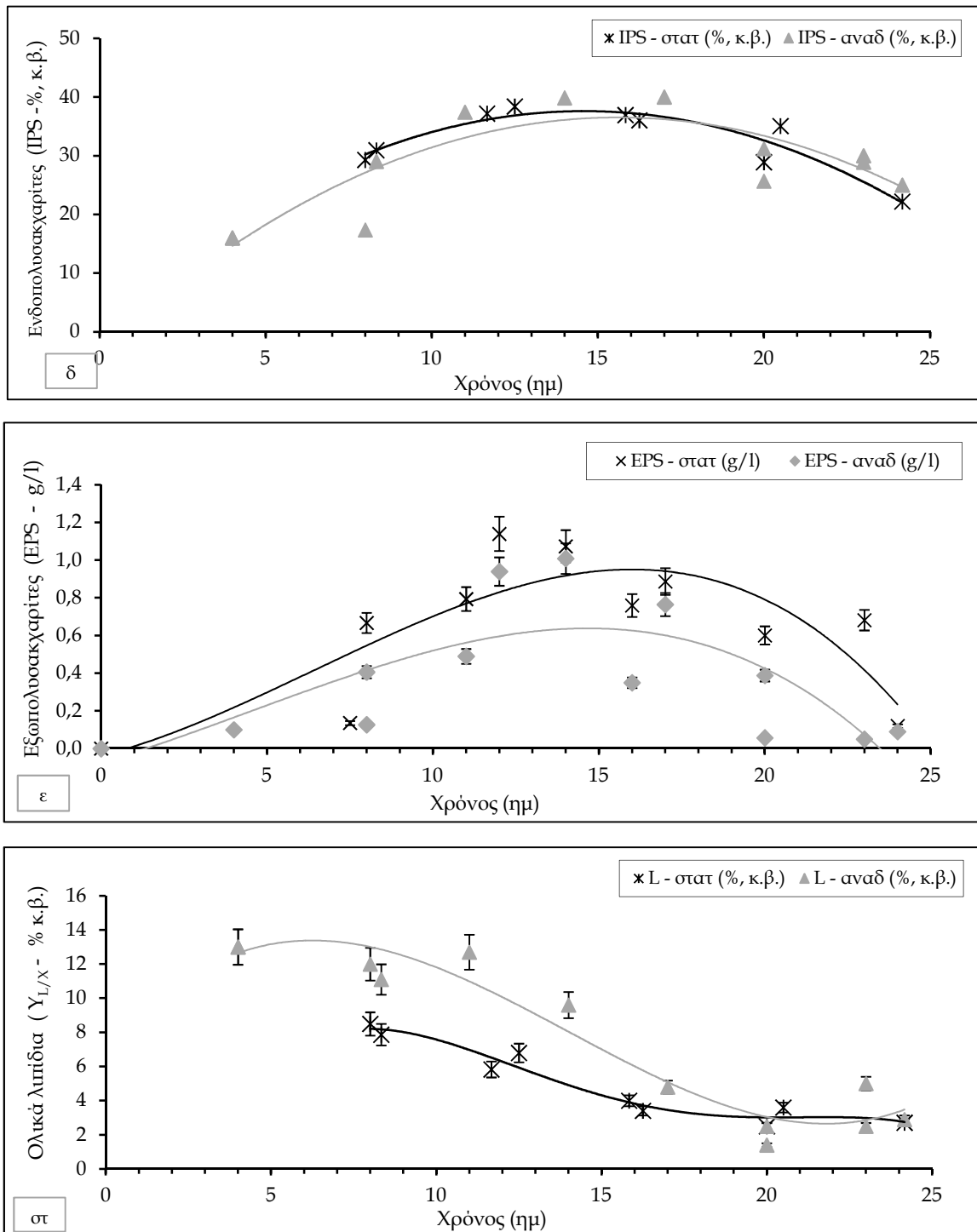
διαμορφώθηκε ήταν ότι το ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας ($Y_{L/X}$, % κ.β.) μειωνόταν όσο προχωρούσε η ζύμωση, η δε μείωση αυτή για τα στελέχη 192 και 190 δε σχετίστηκε με μείωση της συγκέντρωσης γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης. Μάλιστα, σύμφωνα με το Γράφημα III.17 διακρίνονται δύο προφίλ κινητικών σύνθεσης λιπιδίων των στελεχών *V. volvacea*. Στο πρώτο, όπου γίνεται ανακατανάλωση των αρχικά παραγόμενων λιπιδίων και σταθεροποίησή τους την 20^η ημέρα συγκαταλέγονται τα στελέχη 190 και 192, ενώ στο δεύτερο, όπου η μέγιστη ποσότητα λιπιδίων εμφανίζεται προς τη μέση της καλλιέργειας (16^η-20^η ημέρα) και μετά ακολουθεί μείωση/σταθεροποίησή τους ανήκουν τα 188 και 191.

Δεδομένου του γεγονότος ότι το στέλεχος AMRL 190 παρουσίασε μεγαλύτερη ταχύτητα γραμμικής αύξησης και υψηλότερη παραγωγή ξηράς μυκηλιακής μάζας (τόσο σε απόλυτες - g/l όσο και σε σχετικές τιμές - g ανά g αναλωθείσας γλυκόζης), το στέλεχος αυτό μελετήθηκε περισσότερο. Έτσι, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στην επίδραση της ανάδευσης στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας και κυτταρικών λιπιδίων από το στέλεχος αυτό σε περισσότερα σημεία της κινητικής αύξησής του, ενώ επίσης μελετήθηκε και η παραγωγή IPS και EPS κατά τις καλλιέργειες αυτές. Τα αποτελέσματα των κινητικών που αφορούν την παραγωγή βιομάζας, τόσο για τις αναδεδυόμενες όσο και για τις στατικές καλλιέργειες φαίνονται στα πιο κάτω γραφήματα (Γράφημα III.18 α-στ).

Με βάση τα κινητικά αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στα επόμενα γραφήματα τεκμαίρεται (γενικώς) ότι στις περισσότερες από τις παραμέτρους οι οποίες εξετάστηκαν, η ανάδευση είχε μικρή επίδραση σε σχέση με την καλλιέργεια υπό στατικές συνθήκες. Έτσι, η κινητική σύνθεση της παραγόμενης ξηρής μυκηλιακής μάζας (Γράφημα III.18α) έδειξε περίπου σιγμοειδή καμπύλη εξέλιξης ανεξάρτητα από τον τρόπο αύξησης του μικροοργανισμού (σε σφαιρίδια - pellets που δημιουργήθηκαν στις αναδευόμενες σημειώθηκαν καλλιέργειες ή μυκηλιακές υφές - mycelial clumps που αναπτύχθηκε στις στατικές ζυμώσεις). Σε ό,τι αφορά τις μέγιστες τελικές συγκεντρώσεις βιομάζας, σε αμφότερους τους τύπους της καλλιέργειας συγκεντρώσεις (X_{max}) της τάξης των 16, g/l, ενώ και η αφομοίωση της γλυκόζης (Γράφημα III.18β) παρουσίασε αντίστοιχο κινητικό προφίλ σε αμφότερους τους τύπους της καλλιέργειας με το σάκχαρο να έχει σχεδόν πλήρως εξαφανιστεί από το περιβάλλον αύξησης (Glc_c~27-29 g/l) ήδη από την 20^η ημέρα της καλλιέργειας. Ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς την αναλωθείσα γλυκόζη ($Y_{X/Glc}$), τόσο για την αναδευόμενη όσο και για τη στατική καλλιέργεια ήταν της τάξης των 0,55-0,60 g/g, ενώ επίσης και η βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την ανάδευση που εφαρμόστηκε. Έτσι, παράχθηκαν ενδοπολυσακχαρίτες (IPS) σε συγκεντρώσεις της τάξης των 5,4-5,6 g/l (σε 12-16 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό) (Γράφημα III.18γ), οι οποίες αντιστοιχούσαν σε μέγιστα ποσά επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας της τάξης του 40%, κ.β. (Γράφημα III.18δ), ενώ ένα ενδιαφέρον εύρημα που παρουσιάστηκε ήταν ότι οι IPS υπέστησαν αποικοδόμηση και μείωση της συγκέντρωσής τους μετά από τη 17^η-18^η ημέρα καλλιέργειας, προφανώς λόγω μείωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης.

Αναφορικά με τους εξωπολυσακχαρίτες (EPS) και σε αυτή την περίπτωση η εφαρμογή ανάδευσης δεν είχε ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στη βιοσύνθεσή τους, καθώς και στους δυο τύπους των καλλιέργειών που έλαβαν χώρα αναφέρθηκαν συγκεντρώσεις EPS_{max} της τάξης του 1 g/l (~1,2 g/l για τις στατικές καλλιέργειες και ~1,0 g/l για τις αναδευόμενες καλλιέργειες), με τις μέγιστες τιμές EPS να λαμβάνονται στα σχετικά αρχικά στάδια της ζύμωσης και τους EPS να υφίστανται αποικοδόμηση όσο η ζύμωση προχωρούσε, χωρίς ωστόσο η αποικοδόμηση αυτή να συνάδει με έλλειψη γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης (βλ. Γράφημα III.18β και ε). Τέλος, η βιοσύνθεση συνολικών ενδοκυτταρικών λιπιδίων φαίνεται ότι ήταν μια από τις βιολογικές διεργασίες του μακρομύκητα *V. voluacea* που εμφανώς επηρεάστηκε από την εφαρμογή ανάδευσης (Γράφημα III.19στ). Ειδικότερα, στις αναδευόμενες καλλιέργειες κατά την αύξηση του *V. voluacea* συντέθηκαν κυτταρικά λιπίδια το μέγιστο ποσοστό των οποίων επί ξηράς μυκηλιακής μάζας ήταν ~14%, κ.β., ενώ οι





Γράφημα III.18 Κινητική εξέλιξης της ξηράς μυκηλιακής μάζας (X - g/l) (α), της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/l) (β), της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/l) (γ), των συντιθεμένων ενδοπολυσακχαριτών προς την ξηρά μυκηλιακή μάζα (% κ.β.) (δ), της βιοσύνθεσης εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l) (ε) και των κυτταρικών λιπιδίων προς την ξηρά μυκηλιακή μάζα ($Y_{L/X}$, κ.β.) (στ) κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* στέλεχος 190 σε θρεπτικό μέσο GPYS (Glc₀=30 g/l), στους 32±2 °C, υπό αναδεδυόμενες (120±5 rpm) και στατικές συνθήκες. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτητών πειραμάτων

αντίστοιχες ποσότητες στις στατικές καλλιέργειες ήταν μόνο 8%, κ.β.. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι και στην περίπτωση του *V. voluacea* επιβεβαιώθηκε το εύρημα το οποίο διαπιστώθηκε και για τους άλλους μακρομύκητες, δηλαδή ότι το ποσοστό λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/X}$) μειωνόταν όσο η ζύμωση προχωρούσε, χωρίς αυτή η βιοαποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων να σχετίζεται με έλλειψη γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης (βλ. Γράφημα III.18β και στ), δεδομένου ότι η μείωση του συντελεστή $Y_{L/X}$ ελάμβανε χώρα από τα πολύ πρώιμα στάδια της διεργασίας.

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε μελέτη της σύστασης των ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων του μακρομύκητα *V. voluacea*, όπου δείχτηκε ότι τα διάφορα μελετώμενα στελέχη του μακρομύκητα εμφάνισαν σύσταση σε ΛΟ αρκετά όμοια μεταξύ τους και όχι πολύ διαφορετική σε σχέση με το χρόνο ζύμωσης (Πίνακας III.16). Όπως και στην περίπτωση των λοιπών μακρομυκήτων (*A. aegerita*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *M. esculenta*, *P. pulmonarius*) στους οποίους μελετήθηκε η σύσταση σε ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων στις διάφορες φάσεις του αυξητικού κύκλου (Πίνακας III.7α,β), το κύριο ΛΟ το οποίο ανιχνεύτηκε στα τέσσερα στελέχη *V. voluacea* ήταν το λινελαϊκό ($\Delta^9,12\text{C}18:2$), του οποίου η συγκέντρωση ωστόσο ήταν σε πολλές περιπτώσεις χαμηλότερη σε σχέση με τους προηγούμενως παρουσιασθέντες μύκητες, με δεύτερο το παλμιτικό (C16:0). Επίσης, σε αντιδιαστολή με πλείστες από τις προηγούμενες περιπτώσεις, η ανάδευση δεν ευνόησε την ακορεστότητα των παραγόμενων κυτταρικών ΛΟ, καθώς η συγκέντρωση του ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ ήταν πολύ μεγαλύτερη στη στατική σε σχέση με την αναδευόμενη καλλιέργεια (στέλεχος AMRL 190, βλ, Πίνακα III.16). Συγκεκριμένα, το ποσοστό των κορεσμένων ΛΟ των τεσσάρων στελεχών *V. voluacea* στις στατικές καλλιέργειες κυμαίνονταν από ~33-37%, κ.β. και των ακόρεστων από ~63-65%, κ.β., ενώ στην αναδευόμενη καλλιέργεια το ποσοστό των κορεσμένων ΛΟ αυξήθηκε στο 55%, κ.β. και των ακόρεστων μειώθηκε στο 45%, κ.β.. Επίσης, αναφορικά με τη σύσταση των κυτταρικών λιπιδίων του μύκητα *V. voluacea*, επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα των κεφαλαίων III.2 και III.3 όπου φάνηκε μια σχετική διαφοροποίηση σε σχέση με τη σύσταση σε ΛΟ των τυπικών ανώτερων μυκήτων, καθώς ανιχνεύτηκαν σε σημαντικά ποσοστά κορεσμένα ΛΟ μικρής, μεσαίας και μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας, το ποσοστό των οποίων έφτασε το 27,4%, κ.β. στις αναδευόμενες φιάλες (8^η ημέρα). Ως αποτέλεσμα, το σύνολο των παραγόμενων ΛΟ C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 και C20:0 στην καλλιέργεια αυτή αποτέλεσε το 52,5%, κ.β., των συνολικών λιπιδίων. Αντίστοιχα και ο δείκτης ακορεστότητας (U.I.) αν και δεν εμφάνισε διαφοροποιήσεις με τον χρόνο ζύμωσης, παρουσιάστηκε μεγαλύτερος στις στατικές καλλιέργειες σε σχέση με τις αναδευόμενες (Πίνακας III.16).

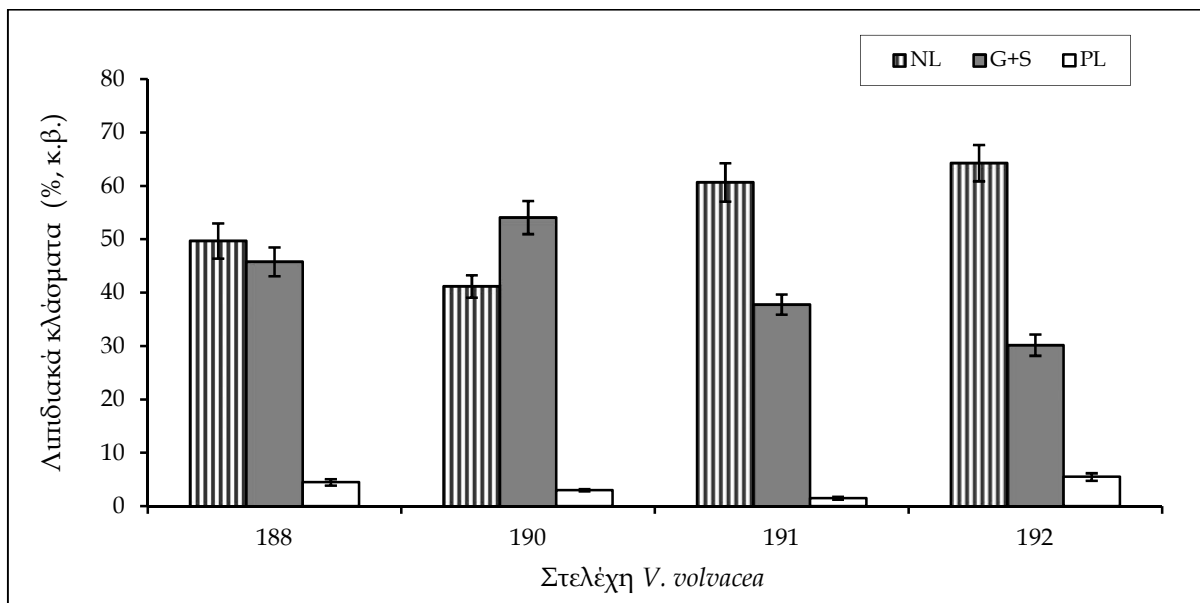
Πίνακας III.16 Κινητική εξέλιξης της σύνθεσης σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων και εκτίμηση του δείκτη ακορεσότητας (U.I.) στελεχών μακρομυκήτων του είδους *Volvariella voluacea* σε υγρή καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη σε συγκέντρωση 30 g/l. Αύξηση σε στατικές (για τα στελέχη AMLR 188, 190, 191 και 192) και αναδεδόμενες (για το στέλεχος 190) καλλιέργειες

Στέλεχος <i>V. voluacea</i>	Χρόνος (ημ)	Λιπαρά οξέα (% , κ.β.)					U.I.
		C16:0	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	Λοιπά*	
188	8 ^η	10,6	5,4	2,0	63,2	14,2	1,28
	12 ^η	17,1	8,8	7,1	50,2	14,1	1,08
	16 ^η	8,7	2,3	4,6	62,8	17,4	1,30
	20 ^η	10,0	2,4	5,6	63,7	14,6	1,33
	24 ^η	10,4	6,8	3,9	56,2	22,7	1,16
191	8 ^η	12,3	8,5	1,0	62,2	16,0	1,25
	12 ^η	15,2	7,3	4,6	59,0	13,9	1,23
	16 ^η	12,3	5,5	5,2	58,5	18,5	1,22
	20 ^η	9,0	5,3	6,2	60,3	19,2	1,27
	24 ^η	11,8	3,3	1,0	65,4	18,5	1,32
192	8 ^η	10,3	3,0	2,2	65,2	19,3	1,33
	12 ^η	15,8	2,0	1,0	59,2	22,0	1,19
	16 ^η	14,3	5,2	1,0	60,5	19,0	1,22
	20 ^η	15,7	4,5	2,1	58,6	19,1	1,19
	24 ^η	12,6	3,2	1,2	65,7	17,3	1,33
190 (στατική)	8 ^η	15,3	4,0	2,0	59,0	19,7	1,20
	12 ^η	16,5	2,5	1,0	63,4	16,6	1,28
	16 ^η	14,8	5,0	3,3	54,6	22,3	1,13
	20 ^η	15,4	5,8	7,0	56,7	15,1	1,20
	24 ^η	10,7	3,0	4,8	62,0	19,5	1,29
190 (αναδεδόμενη)	8 ^η	16,0	8,0	1,5	47,1	27,4	0,96
	12 ^η	23,2	4,7	3,0	46,1	23,0	0,95
	16 ^η	23,0	6,1	1,5	46,3	23,1	0,94
	20 ^η	28,7	6,1	4,5	39,8	20,9	0,84
	24 ^η	24,6	4,4	5,2	42,3	23,5	0,90

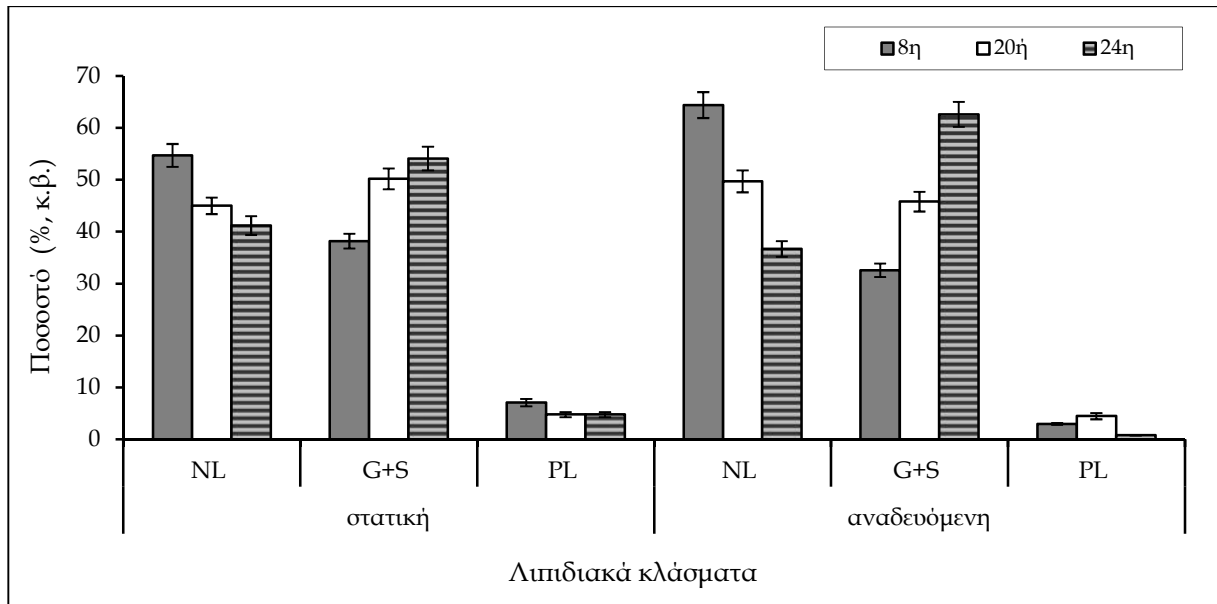
*: Λοιπά ΛΟ κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 και C20:0

Επιπλέον, προκειμένου να αποκτηθεί μια πιο σφαιρική γνώση για τη μελέτη των λιπιδίων του μακρομυκήτα *V. voluacea*, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των λιπιδίων και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους κλασμάτων (NL, G+S και PL) για την 24^η ημέρα των μη-αναδεδόμενων καλλιεργειών για τα τέσσερα στελέχη (Γράφημα III.19). Σε κάθε περίπτωση και παρά το γεγονός ότι στην 24^η ημέρα της καλλιέργειας το ποσοστό λίπους επί

ξηράς μυκηλιακής μάζας ήταν πολύ χαμηλό (2,7-5,0%, κ.β.), το κλάσμα του ουδέτερων λιπών (NL) ήταν σημαντικά μεγαλύτερο, ιδιαίτερα στα στελέχη 191 και 192, ενώ έπονταν αυτό των γλυκολιπιδίων και σφιγκολιπιδίων (G+S) και κυρίως των φωσφολιπιδίων (PL). Σε όλα τα στελέχη, το ποσοστό των NL που καταγράφηκε κυμάνθηκε από 41 έως 64%, κ.β., των G+S από 30 έως 54%, κ.β. και των PL μόνο από 3 έως 5,5%, κ.β.. Περαιτέρω, λαμβάνοντας υπόψη την εξέλιξη της συγκέντρωσης των ολικών λιπιδίων ($Y_{L/X}$ %, κ.β.) του στελέχους AMRL 190 με το χρόνο ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των κυτταρικών λιπιδίων του την 8^η, 20^η και 24^η ημέρα (μετά από τον εμβολιασμό) ώστε να μελετηθούν πιο λεπτομερώς οι αλλαγές των κλασμάτων του στελέχους αυτού με το χρόνο καλλιέργειας. Σύμφωνα με το Γράφημα III.20, αμφότερες στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν (στατική και αναδευόμενη) το κλάσμα των NL κυριαρχούσε σαφώς (54-64%, κ.β.), η συγκέντρωσή του όμως μειωνόταν με την εξέλιξη της ζύμωσης (37-42%, κ.β.), σε αντιδιαστολή με αυτή των G+S των οποίων η συγκέντρωση αυξανόταν (από 33-38% σε 54-62%, κ.β.). Ακόμα, η ανάδευση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του κλάσματος των PL στο τέλος της ζύμωσης (μόλις 0,8%, κ.β. στις αναδευόμενες καλλιέργειες).



Γράφημα III.19 Κλάσματα των κυτταρικών λιπιδίων (% κ.β. των ολικών λιπιδίων) του μακρομύκητα *Volvariella volucae* (στελέχη AMRL 188, 190, 191, 192) κατά την αύξηση του σε θρεπτικό μέσο GPYS με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l, σε στατικές καλλιέργειες στους 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 24^η ημέρα. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων μετρήσεων. Σύμβολα: NL - ουδέτερα λιπίδια, G+S - γλυκολιπίδια και σφιγκολιπίδια, PL - φωσφολιπίδια



Γράφημα III.20 Κλάσματα των κυτταρικών λιπιδίων (% κ.β. των ολικών λιπιδίων) του στελεχούς *Volvariella volvacea* AMRL 190 κατά την αύξηση του σε θρεπτικό μέσο GPYS με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l, σε στατικές ή αναδεδυόμενες καλλιέργειες, στους 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 8^η, 20^η και 24^η ημέρα. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων μετρήσεων. Σύμβολα: NL - ουδέτερα λιπίδια, G+S - γλυκολιπίδια και σφινγκολιπίδια, PL - φωσφολιπίδια

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της σύστασης σε ΛΟ των διαφόρων κλασμάτων των κυτταρικών λιπιδίων των στελεχών του μακρομύκητα *V. volvacea* (Πίνακας III.17), όπου δείχτηκε ότι ανεξαρτήτως των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν η σύσταση σε ΛΟ ήταν αρκετά όμοια μεταξύ των διαφόρων κλασμάτων. Διαφοροποιήσεις σε σχέση με τη σύσταση σε ΛΟ των ολικών λιπιδίων (TL) παρατηρήθηκαν τόσο στα NL όσο και στα G+S, τα οποία ήταν πλουσιότερα σε ακόρεστα ΛΟ (κυρίως σε $\Delta^9,12\text{C}18:2$), ενώ το κλάσμα των PL ήταν σαφώς περισσότερο κορεσμένο από ό,τι τα TL, καθώς και τα κλάσματα των NL και G+S. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το κλάσμα των φωσφολιπιδίων σε όλα τα στελέχη παρουσιάστηκε πιο εμπλουτισμένο σε κορεσμένα ΛΟ μικρής ή μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (C8:0, C10:0, C12:0, C20:0), σε σχέση με τα λοιπά κλάσματα.

Πίνακας III.17 Ανάλυση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων των ολικών κυτταρικών λιπιδίων (TL), των ουδέτερων λιπιδίων (NL), των γλυκολιπιδίων και σφιγκολιπιδίων (G+S) και των φωσφολιπιδίων (PL) κατά την καλλιέργεια υπό στατικές συνθήκες στους 32 ± 2 °C στελεχών μακρομυκήτων του είδους *Volvariella voluacea* (AMRL 188, 190, 191 και 192) σε υγρή καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη (Glc₀=30 g). Χρόνος ζύμωσης: 24^η ημέρα

Στελέχη/ Λιπαρά οξέα (%, κ.β.)	AMRL 188				AMRL 190				AMRL 191				AMRL 192			
	TL	NL	G+S	PL	TL	NL	G+S	PL	TL	NL	G+S	PL	TL	NL	G+S	PL
C16:0	10,4	7,5	9,8	14,6	10,7	9,4	9,6	12,2	11,8	11,3	9,4	18,0	12,6	12,4	11,3	15,7
C18:0	6,8	5,0	6,7	8,7	3,0	2,0	1,8	9,5	3,3	2,0	2,2	4,2	3,2	2,0	2,0	4,8
^{Δ9} C18:1	3,9	8,7	5,8	1,0	4,8	5,7	6,8	2,0	1,0	2,4	3,2	ίχνη*	1,2	2,2	2,2	ίχνη
^{Δ9,12} C18:2	56,2	64,3	63,4	44,8	62,0	65,5	68,3	42,0	65,4	68,0	71,6	46,0	65,7	70,3	71,2	48,0
Λοιπά**	22,7	14,5	14,3	30,9	19,5	17,4	13,5	34,3	18,5	16,3	13,6	31,8	17,3	13,1	13,3	31,5

Το κάθε σημείο της ζύμωσης που παρουσιάζεται είναι ο μέσος όρος δυο ανεξαρτήτων μετρήσεων

Σύμβολα: TL - ολικά λιπίδια, NL - ουδέτερα λιπίδια, G+S - γλυκολιπίδια και σφιγκολιπίδια, PL - φωσφολιπίδια

*Ιχνη: <0,4%, **: Τα λοιπά ΛΟ κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 και C20:0

III.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΗΓΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ *VOLVARIELLA VOLVACEA* AMRL 190

Στο προηγούμενο εδάφιο δείχθηκε η δυναμική στελεχών του μακρομύκητα *V. volvacea* να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη παραγωγή μυκηλιακής μάζας κατά την καλλιέργειά τους σε υγρού τύπου ζυμώσεις. Επίσης, αναλύθηκαν εκτενώς τα ενδοκυτταρικά παραγόμενα λιπίδια των στελεχών δείχνοντας μια σχετική διαφοροποίηση στη σύστασή τους σε σχέση με τους τυπικούς εδώδιμους μύκητες (π.χ. μη-αμελητέα παρουσία κορεσμένων μικρής ή μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας ΛΟ π.χ. C8:0, C10:0 και C20:0 στα λιπίδια τους). Περαιτέρω, το στέλεχος *V. volvacea* AMRL 190, το οποίο παρουσίασε μεγαλύτερες αποδόσεις βιομάζας σε σχέση με τα λοιπά στελέχη του ίδιου είδους, μελετήθηκε πιο επισταμένως ως προς τη δυνατότητά του να παράγει λιπίδια και πολυσακχαρίτες, τόσο σε αναδεδυόμενες όσο και σε στατικές καλλιέργειες και ενώ η παραγωγή των λοιπών μεταβολικών προϊόντων και της βιομάζας ήταν σχεδόν ανεξάρτητη της εφαρμοζόμενης ή μη ανάδευσης, το μέγιστο παραγόμενο λίπος επί ξηράς ουσίας ($Y_{L/Xmax}$, % κ.β.), ήταν σχεδόν διπλάσιο στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες.

Σε συνέχεια των προηγούμενων ευρημάτων, στο παρόν εδάφιο μελετήθηκε εκτενώς η επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου στη κινητική και φυσιολογική συμπεριφορά του στελέχους *V. volvacea* AMRL 190. Για το λόγο αυτό, αρχικά δοκιμάστηκε η αύξησή του *V. volvacea* σε δέκα στερεά θρεπτικά υποστρώματα με άγαρ, με κύριες πηγές άνθρακα τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, τους δισακχαρίτες μαλτόζη, σακχαρόζη και λακτόζη, τη σάκχαρο-αλκοόλη σορβιτόλη και τον πολυσακχαρίτη άμυλο και πηγή αζώτου την πειπτόνη (3,5 g/l) και το εκχύλισμα ζύμης (2,5 g/l), έτσι ώστε ο λόγος C/N σε όλα τα υποστρώματα να είναι περίπου 20. Ακόμα, ο *V. volvacea* AMRL 190 καλλιεργήθηκε και σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα με δέκα διαφορετικές πηγές αζώτου, με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (30 g/l) και σε συγκεντρώσεις τέτοιες ώστε τα υποστρώματα να έχουν όλα λόγο C/N περίπου 20. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν οι εξής: πειπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, ουρία, $(NH_4)_2SO_4$, γλυκίνη, NH_4NO_3 , NH_4HCO_3 , $NaNO_3$, τρυπτοφάνη και L-γλουταμινικό οξύ.

Στην πρώτη φάση των πειραμάτων, εξετάστηκε η αύξηση του μακρομύκητα *V. volvacea* σε στερεά θρεπτικά υλικά που περιείχαν τις προαναφερθείσες πηγές άνθρακα και αζώτου, ώστε στη συνέχεια οι επιλεγμένες πηγές να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα καλλιέργειας του μακρομύκητα σε υγρές ζυμώσεις. Η επιλογή των καλύτερων πηγών άνθρακα και αζώτου έγινε κυρίως ποσοτικά με μέτρηση της ταχύτητας γραμμικής αύξησης του μυκηλίου *Kr*, αλλά και ποιοτικά με εκτίμηση της μυκηλιακής πυκνότητας της αποικίας.

Στη συνέχεια λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν κινητικές του *V. voluacea* σε καλλιέργειες επιλεγμένων πηγών σακχάρων και αζώτου (με αρχικό λόγο C/N=20) υπό στατικές και αναδεδυόμενες συνθήκες, όπου και διερευνήθηκε η επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην κατανάλωση των σακχάρων του θρεπτικού μέσου, στην παραγωγή της μυκηλιακής βιομάζας, των εξω- και ένδο- πολυσακχαριτών και στη βιοσύνθεση των λιπιδίων.

Στον παρακάτω Πίνακα III.18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γραμμικής αύξησης του μακρομύκητα *V. voluacea* σε τρυβλία με διάφορες πηγές άνθρακα, σύμφωνα με τα οποία παρατηρείται ότι ο μύκητας εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης (10,47 mm/ημέρα) στην μαλτόζη. Καλά χρησιμοποιούμενα για την αύξηση του μύκητα *V. voluacea* αποδείχθηκαν και τα σάκχαρα σακχαρόζη, σορβιτόλη, φρουκτόζη, άμυλο και γλυκόζη στα οποία καταγράφηκαν τιμές $7 < Kr < 8$. Ακολούθησαν οι πηγές άνθρακα λακτόζη, ξυλόζη και μαννόζη με $6 < Kr < 7$, ενώ η πιο αργή αύξηση καταγράφηκε στη γαλακτόζη (4,93 mm/ημέρα) που έδειξε και μικρή πυκνότητα μυκηλίου. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι τα τρυβλία με το άμυλο, τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη, αν και εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές ταχύτητας από ό,τι με τη μαλτόζη, είχαν μεγαλύτερη πυκνότητα μυκηλίου από αυτήν. Στα

Πίνακας III.18 Αποτελέσματα της γραμμικής αύξησης Kr (mm/ημέρα) και του pH των υποστρωμάτων (μετά την αποστείρωση) κατά την αύξηση του μύκητα *Volvariella voluacea* (στέλεχος AMRL 190) σε στερεό θρεπτικό μέσο (στερεοποίηση με άγαρ 10 g/l) με πηγή αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης και δέκα διαφορετικές πηγές άνθρακα (C/N=20) στους $32 (\pm 2) ^\circ C$

Πηγές άνθρακα	Kr (mm/ημέρα)		Πυκνότητα μυκηλίου*	pH
D(+)-γλυκόζη	$7,43 \pm 0,82$	β, γ^{**}	+++	6,21
Φρουκτόζη	$7,91 \pm 0,07$	γ	+++	6,01
Άμυλο	$7,79 \pm 0,44$	γ	+++	6,25
Ξυλόζη	$6,43 \pm 0,29$	β	+++	6,21
Μαλτόζη	$10,47 \pm 0,93$	δ	++	6,29
Σακχαρόζη	$7,97 \pm 0,18$	γ	++	6,24
Σορβιτόλη	$7,94 \pm 0,36$	γ	+	6,23
D(-)-μαννόζη	$6,38 \pm 0,54$	β	+	6,23
D(+)-γαλακτόζη	$4,93 \pm 1,00$	α	+	6,03
Λακτόζη	$6,94 \pm 0,47$	β, γ	+	6,01

* Πυκνότητα μυκηλίου: μεγάλη (+++), μέτρια (++) , μικρή (+)

**Οι τιμές της στήλης που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$

τρυβλία με σακχαρόζη και σορβιτόλη, στα οποία το μυκήλιο είχε παρόμοιες ταχύτητες με αυτά του αμύλου, της φρουκτόζης και της γλυκόζης οι υφές ήταν αραιότερες, γεγονός που υποδηλώνει μικρότερη παραγωγή βιομάζας. Ακόμη, η ξυλόζη που εμφάνισε σχετικά χαμηλότερη ταχύτητα (6,43 mm/ημέρα) είχε πυκνότητα μυκηλίου παρόμοια με αυτή της γλυκόζης.

Τα αποτελέσματα της αύξησης του *V. voluacea* σε διάφορες πηγές αζώτου που παρουσιάζονται στον Πίνακα III.19, δείχνουν ότι την μέγιστη *Kr* εμφάνισε ο μύκητας στα τρυβλία που περιείχαν ουρία (10,68 mm/ημέρα). Καλά χρησιμοποιούμενες για την αύξηση του μύκητα *V. voluacea* αποδείχθηκαν και οι πηγές αζώτου NH_4HCO_3 , πεπτόνη και γλυκίνη στις οποίες καταγράφηκαν τιμές $8 < Kr < 10$. Ακολούθησαν οι $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και NH_4NO_3 με $7 < Kr < 8$, το εκχύλισμα ζύμης και η τέλος η L-τρουπιτοφάνη (3,65 mm/ημέρα), ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στα τρυβλία που περιείχαν NaNO_3 και γλουταμινικό οξύ. Σημειώνεται ότι τα τρυβλία με την ουρία και τη γλυκίνη, αν και εμφάνισαν την υψηλότερη τιμή ταχύτητας είχαν μικρή πυκνότητα μυκηλίου, ενώ αυτά με την πεπτόνη και το εκχύλισμα

Πίνακας III.19 Αποτελέσματα της ταχύτητας γραμμικής αύξησης *Kr* (mm/ημέρα), της πυκνότητας της αποικίας και του pH των υποστρωμάτων (μετά την αποστείρωση) κατά την αύξηση του μύκητα *Volvariella voluacea* σε στερεό θρεπτικό μέσο (στερεοποίηση με άγαρ 10 g/l) με γλυκόζη (30 g/l) ως πηγή άνθρακα και δέκα διαφορετικές πηγές αζώτου (C/N=20) στους 32 (± 2) °C

Πηγές αζώτου	<i>Kr</i> (mm/ημέρα)	Πυκνότητα μυκηλίου*	pH
Πεπτόνη	8,87 ± 0,53	ζ,η** +++	6,38
Εκχύλισμα ζύμης	5,67 ± 0,22	γ +++	6,38
Ουρία	10,68 ± 0,14	θ ++	6,86
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,25 ± 0,67	δ,ε ++	6,40
Γλυκίνη	8,31 ± 0,57	ζ +	5,88
NH_4NO_3	7,32 ± 0,36	ε +++	6,49
NH_4HCO_3	9,29 ± 0,21	η ++	5,95
NaNO_3	όχι ανάπτυξη	α -	7,00
L-τρουπιτοφάνη	3,65 ± 0,49	β +	6,06
L-γλουταμινικό οξύ	όχι ανάπτυξη	α -	5,94
GS (χωρίς πηγή N)	6,51 ± 0,9	δ +	6,20

* Πυκνότητα μυκηλίου: μεγάλη (+++), μέτρια (++), μικρή (+), δεν αναπτύχθηκε (-)

**Οι τιμές της στήλης που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$

ζύμης εμφάνισαν μεγαλύτερη πυκνότητα μυκηλίου. Στις υπόλοιπες πηγές, η πυκνότητα σύνηδε με την ταχύτητα, εκτός από το θεραπευτικό μέσο χωρίς πηγή αζώτου (GS) που επίσης είχε πολύ λεπτό στρώμα μυκηλίου.

Το pH των θεραπευτικών μέσων μετρήθηκε αμέσως μετά την αποστείρωση και πριν τον εμβολιασμό με τον μύκητα και βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 6,0-6,5 σε όλες τις πηγές άνθρακα (Πίνακας III.18) και στις περισσότερες του αζώτου (Πίνακας III.19). Μικρή απόκλιση είχε το θεραπευτικό μέσο με NaNO_3 , όπου το pH ήταν κάπως ψηλότερο (7,0).

Σε συνέχεια των πειραμάτων που αφορούσαν την αύξηση του *V. voluacea* στα τρυβλία, επιλέχθηκαν έξι σάκχαρα (μονοσακχαρίτες: γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη, δισακχαρίτες: μαλτόζη, σακχαρόζη και πολυσακχαρίτης: άμυλο) και πέντε πηγές αζώτου (πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, ουρία, NH_4NO_3 και L-τρουπτοφάνη) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην παραγωγή βιομάζας, στη σύνθεση λιπιδίων και πολυσακχαριτών, καθώς και στη ποσότητα των κλασμάτων των λιπιδίων, στη σύνθεση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα και των φωσφολιπιδίων στις κλάσεις τους σε κωνικές φιάλες υπό αναδευόμενες και στατικές συνθήκες.

Σε ό,τι αφορά τις τιμές του pH των υγρών θεραπευτικών μέσων με τα διάφορα σάκχαρα, αυτές αμέσως μετά την αποστείρωση και πριν τον εμβολιασμό τους με τον *V. voluacea* κυμάνθηκαν από 6,0 (φρουκτόζη) έως 6,75 (σακχαρόζη). Στην πορεία της καλλιέργειας παρατηρήθηκε γενικά διατήρηση του pH των θεραπευτικών μέσων στα αρχικά επίπεδα. Μικρή αύξηση καταγράφηκε στις καλλιέργειες του αμύλου, της σακχαρόζης και της μαλτόζης, ίσως λόγω απαμίνωσης της πεπτόνης του θεραπευτικού μέσου (Fakas κ.α., 2008), οπότε και γινόταν διόρθωση του pH υπό ασηπιτικές συνθήκες με διάλυμα HCl 5M. Επίσης, για κάποιες από τις πηγές αζώτου οι τιμές του pH των υποστρωμάτων ήταν λίγο χαμηλότερες του 6, παρά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στα υποστρώματα αυτά, όπως και στα υπόλοιπα, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση της τιμής του pH σε τιμές μεταξύ 6,0-6,6.

Στους Πίνακες III.20α και β παρατίθενται τα συνοπτικά δεδομένα της καλλιέργειας του μακρομύκητα *V. voluacea* AMRL 190 στα σημεία της κινητικής όπου ο μικροοργανισμός σημείωσε (α) τη μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.), (β) τη μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l) και (γ) τη μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{\max} (g/l) κατά την αύξησή του σε στατικές και σε αναδευόμενες καλλιέργειες με διάφορες πηγές άνθρακα. Σύμφωνα με τα δεδομένα, φαίνεται πως τόσο το είδος της πηγής

Πίνακας III.20α Κινητική του μακρομόκητα *Volvariella volvacea* AMRL κατά την καλλιέργειά του υπό στατικές συνθήκες στους 32±2 °C σε θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Είδος σακχάρου		Χρόνος (ημ)	X (g/l)	S _c (g/l)	L (g/l)	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Y _{L/x} (% κ.β.)	Y _{IPS/x} (% κ.β.)
γλυκόζη	α	8	4,58	6,84	0,45	0,667	1,07	9,83	23,34
	β	17	9,88	21,00	0,49	0,887	4,23	5,00	37,80
	γ	23	15,23	27,55	0,39	0,630	3,59	2,56	25,20
φρουκτόζη	α	11	7,80	14,99	0,48	0,628	1,99	6,15	25,46
	β,γ	17	12,89	19,21	0,31	0,895	3,30	2,40	25,63
άμυλο	α	8	3,66	13,00	0,12	0,650	1,05	3,28	28,64
	β	17	5,19	14,39	0,10	0,630	1,77	1,73	34,85
	γ	23	6,25	15,88	0,07	0,830	1,40	1,12	22,40
ξυλόζη	α	11	3,19	9,23	0,59	0,556	0,49	18,50	15,33
	β,γ	23	11,30	25,20	0,21	0,540	2,49	1,86	22,00
μαλτόζη	α	11	1,85	5,87	0,31	0,727	0,36	16,62	19,20
	β	17	2,19	4,94	0,26	0,690	0,71	11,87	32,56
	γ	23	3,06	6,91	0,28	0,723	0,61	9,15	20,00
σακχαρόζη	α,β,γ	11	2,36	3,37	0,40	0,834	1,00	16,95	42,23

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/l), L: το παραγόμενο λίπος (g/l), S_c: η καταναλωθείσα συγκέντρωση του υποστρώματος (g/l), EPS: οι παραγόμενοι εξωπολυσακχαρίτες (g/l), IPS: οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/l), Y_{L/x}: το ποσοστό συνολικού λίπους επί ξηράς βιομάζας (% κ.β.), Y_{IPS/x}: το ποσοστό συνολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς βιομάζας (% κ.β.)

α: μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.)

β: μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l)

γ: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)

άνθρακα, όσο και η εφαρμογή ή όχι ανάδευσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των υποστρωμάτων είχαν σημαντική επίδραση στις παραπάνω παραμέτρους.

Γενικά, στις ανακινούμενες καλλιέργειες καταγράφηκαν μεγαλύτερες τιμές βιομάζας (ιδιαίτερα στα σάκχαρα άμυλο, φρουκτόζη και γλυκόζη) συγκριτικά με τις στατικές, όπου ευνοήθηκε ιδιαίτερα η ξυλόζη (Πίνακας 20α,β και Γράφημα III.21). Στα σάκχαρα αυτά η ποσότητα της παραχθείσας βιομάζας ήταν σημαντική φτάνοντας τα ~15 g/l, όμως η σειρά εμφάνισης των μέγιστων τιμών της στα υποστρώματα αυτά διαφοροποιείτο μεταξύ στατικών και αναδευόμενων καλλιεργειών. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των δεδομένων, υπό στατικές συνθήκες η φρουκτόζη και η γλυκόζη αναδείχθηκαν οι καλύτερες πηγές άνθρακα, ενώ ακολουθούν με την παρακάτω φθίνουσα σειρά ξυλόζη> άμυλο> μαλτόζη = σακχαρόζη. Υπό αναδευόμενες συνθήκες ωστόσο το άμυλο αναδείχθηκε η καλύτερη πηγή άνθρακα ενώ ακολουθούν οι φρουκτόζη = γλυκόζη> ξυλόζη> μαλτόζη = σακχαρόζη.

Πίνακας III.20β Κινητική του μακρομόκητα *Volvariella volvacea* AMRL 190 κατά την καλλιέργειά του υπό αναδεδυόμενες συνθήκες (120±5 g/m) στους 32±2 °C σε θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτητών πειραμάτων

Είδος σακχάρου		Χρόνος (ημ)	X (g/l)	S _c (g/l)	L (g/l)	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Y _{L/X} (% κ.β.)	Y _{IPS/X} (% κ.β.)
γλυκόζη	α	8	2,84	2,60	0,40	0,406	0,48	14,08	16,87
	β	17	12,24	14,21	0,90	0,765	4,85	7,35	39,60
	γ	23	14,50	29,00	0,42	0,401	2,07	3,45	14,30
φρουκτόζη	α	8	3,65	11,89	0,59	0,711	0,29	16,16	7,91
	β	23	14,48	29,20	1,25	0,373	3,63	8,63	25,04
	γ	20	14,63	28,67	1,01	0,535	2,90	6,90	19,85
άμυλο	α	8	9,28	15,94	1,22	0,490	2,75	13,17	29,66
	β,γ	14	15,52	23,73	1,79	0,654	5,20	11,53	33,50
ξυλόζη	α	8	1,58	4,88	0,27	0,635	0,35	17,09	26,40
	β,γ	23	7,85	12,92	0,49	0,676	1,96	6,24	21,45
μαλτόζη	α	23	2,04	0,58	0,27	0,852	0,37	13,24	18,20
	β,γ	14	2,69	1,62	0,15	0,663	0,59	5,58	22,00
σακχαρόζη	α	8	1,79	3,34	0,24	0,563	0,27	13,41	15,25
	β	14	1,53	1,82	0,07	0,647	0,46	4,58	30,00
	γ	11	1,65	2,05	0,19	0,587	0,38	11,52	23,03

X: Η παραγόμενη βιομάζα (g/l), L: το παραγόμενο λίπος (g/l), S_c: η καταναλωθείσα συγκέντρωση του υποστρώματος (g/l), EPS: οι παραγόμενοι εξωπολυσακχαρίτες (g/l), IPS: οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/l), Y_{L/X}: το ποσοστό συνολικού λίπους επί ξηράς βιομάζας (% κ.β.), Y_{IPS/X}: το ποσοστό συνολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς βιομάζας (% κ.β.)

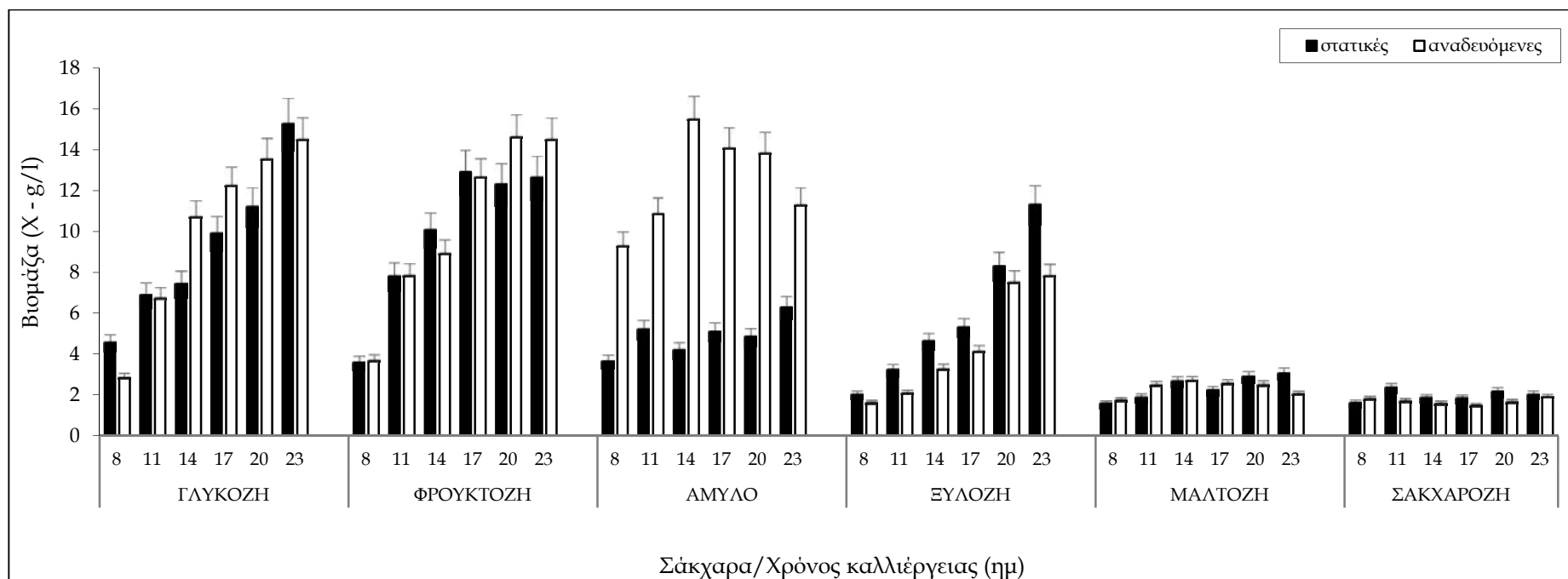
α: μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.)

β: μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l)

γ: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)

Σημειώνεται ότι η βιομάζα που παράχθηκε στις πηγές άνθρακα μαλτόζη και σακχαρόζη ήταν πολύ μικρή (2-3 g/l). Επίσης και ο χρόνος παραγωγής της X_{max} (Πίνακες III.20α,β και Γράφημα II.21) διέφερε στις διάφορες πηγές σακχάρων, καθώς η μέγιστη τιμή βιομάζας για τη γλυκόζη και τη ξυλόζη παράχθηκε στο τέλος της ζύμωσης (23^η ημέρα), ενώ για τη φρουκτόζη και το άμυλο αυτό συνέβη αρκετά νωρίτερα (14^η-17^η ημέρα) υποδηλώνοντας πιθανή αυτόλυση κυττάρων με την πρόοδο της καλλιέργειας στα σάκχαρα αυτά.

Αντίστοιχα με την βιομάζα είναι και τα αποτελέσματα της κατανάλωσης των σακχάρων (Γράφημα III.22α,β) καθώς προκύπτει ότι η μεγαλύτερη κατανάλωση υποστρώματος υπήρξε στις κωνικές φιάλες με τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη, άμυλο και ξυλόζη και με τη μέγιστη τιμή κατανάλωσης να καταγράφεται στο τέλος της καλλιέργειας

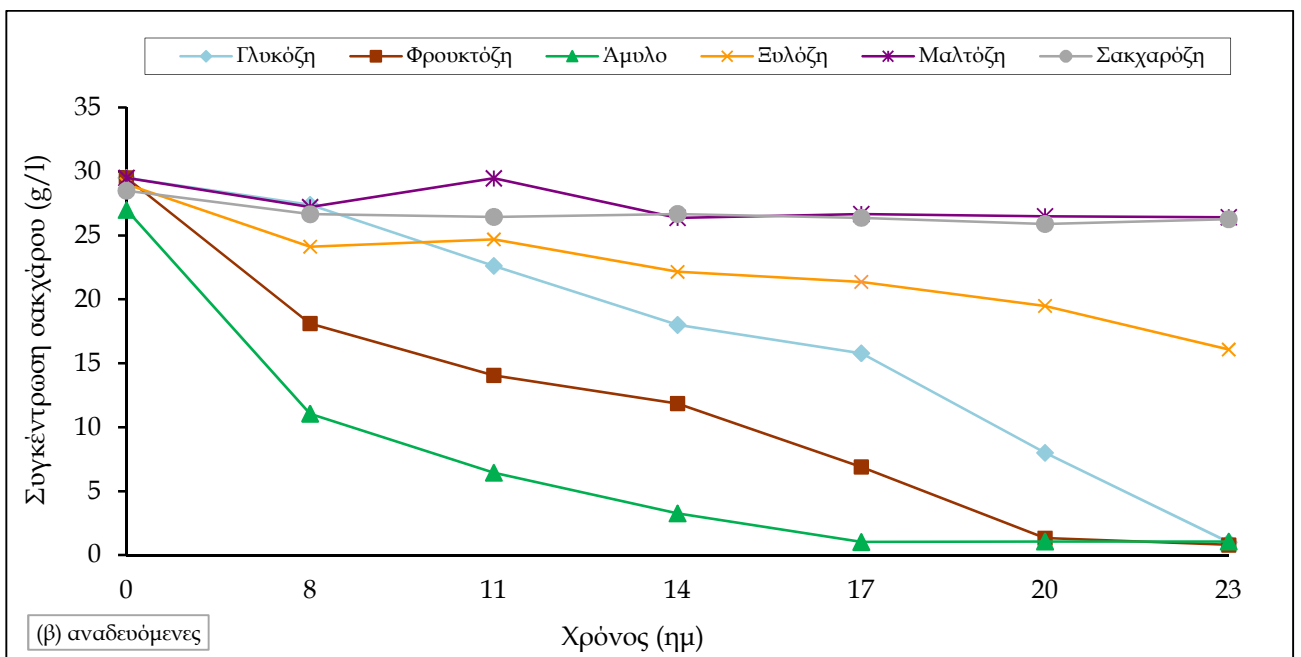
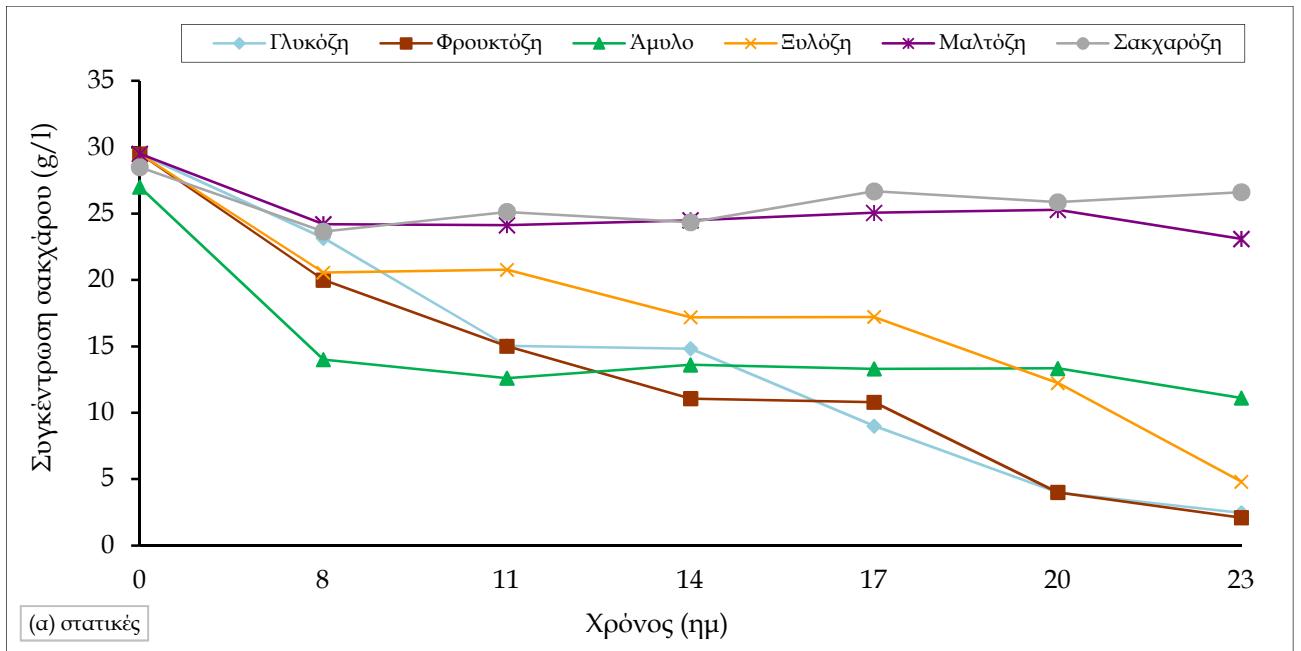


Γράφημα III.21 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής βιομάζας ($X - g/l$) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες ($120 \pm 5 \text{ rpm}$) στους $32 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ σε καλλιέργειες γλυκόζης, φρουκτόζης, αμύλου, ξυλόζης, μαλτόζης και σακχαρόζης, με αρχικό $C/N=20$. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

κατά την 23^η ημέρα, τόσο στις στατικές όσο και στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Σε στατική κατάσταση, ο μύκητας κατανάλωσε σε μεγαλύτερη ποσότητα τη φρουκτόζη (93%), τη γλυκόζη (91,84%), τη ξυλόζη (84%) και τέλος το άμυλο (53%). Αντίθετα, σημαντική επίδραση είχε η ανάδευση στον μεταβολισμό του μύκητα καθώς παρατηρήθηκε (στις αναδεδυόμενες φιάλες) κατανάλωση πρώτα της γλυκόζης (99,7%) και με μικρές διαφορές της φρουκτόζης (97,34) και του αμύλου (94,23%) και τέλος με μεγάλη διαφορά της ξυλόζης (44,55%). Σημειώνεται δε ότι η υψηλή συγκέντρωση αμύλου που καταναλώθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *V. voluacea* υπό ανάδευση βρίσκεται σε αντιστοιχία με την υψηλή παραγωγή βιομάζας, ενώ στις στατικές καλλιέργειες όπου η βιομάζα ήταν χαμηλή, σημαντικό ποσοστό της αρχικής ποσότητας αμύλου έμεινε ανεκμετάλλευτο. Το αντίθετο παρατηρήθηκε για το υποστρώμα της ξυλόζης, καθώς αρκετά υψηλή συγκέντρωση ξυλόζης καταναλώθηκε κατά τη στατική καλλιέργεια, ενώ αντίθετα κατά την αναδεδυόμενη ένα σημαντικό ποσοστό της αρχικής ποσότητας ξυλόζης δεν καταναλώθηκε από τον μύκητα. Σε ό,τι αφορά τη μαλτόζη και τη σακχαρόζη, στα σάκχαρα αυτά καταγράφηκε η μικρότερη κατανάλωση υποστρώματος τόσο σε στατικές όσο και σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες, η οποία παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη στη διάρκεια της ζύμωσης.

Παίρνοντας υπόψη μας και τις τιμές του Πίνακα 21 που αναφέρονται στη ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος ($r_{s''}$) για το χρονικό διάστημα της καλλιέργειας όπου υπήρχε κατανάλωση, φαίνεται ότι υπερτερεί το άμυλο στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες (1,69 g/l/d) με δεύτερη τη φρουκτόζη (1,43 και 1,30 g/l/d σε στατικές και αναδεδυόμενες). Αρκετά γρήγορα καταναλώθηκε και η γλυκόζη (~1,20 g/l/d), καθώς και η ξυλόζη στις στατικές καλλιέργειες (1,10 g/l/d). Κατ' αντιδιαστολή, πολύ χαμηλή ήταν η ταχύτητα κατανάλωσης της μαλτόζης και της σακχαρόζης. Οι τιμές του $r_{s''}$ επιβεβαιώνουν τις κινητικές των σακχάρων που δόθηκαν στο παραπάνω γράφημα και εξηγούν τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας σε στατικές και αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Ενισχύουν δηλαδή το συμπέρασμα ότι η φρουκτόζη και το άμυλο αποτέλεσαν τα πιο ευνοϊκά υποστρώματα για την παραγωγή βιομάζας υπό συνθήκες ανάδευσης, η ξυλόζη έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στις στατικές καλλιέργειες και η γλυκόζη αποτέλεσε πολύ ικανοποιητικό υποστρώμα τόσο σε συνθήκες ανάδευσης, όσο και στις στατικές για τις καλλιέργειες του *V. voluacea* καλλιέργειες. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι βρέθηκε υψηλή συσχέτιση της κατανάλωσης των σακχάρων με την παραγόμενη βιομάζα.

Επίσης, στον Πίνακα III.21 δίνονται οι τιμές του συντελεστή $Y_{x/s}$ με τα τέσσερα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, άμυλο, ξυλόζη) που έδωσαν τις μεγαλύτερες τιμές βιομάζας, όπως και οι τιμές του συντελεστή απόδοσης στο σημείο της κινητικής με τη μέγιστη



Γράφημα III.22α,β Κινητική κατανάλωσης των σακχάρων κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* υπό (α) στατικές και (β) αναδευόμενες συνθήκες (120 ± 5 rpm) στους 32 ± 2 °C σε καλλιέργειες γλυκόζης, φρουκτόζης, αμύλου, ξυλόζης, μαλτόζης και σακχαρόζης, με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Πίνακας III.21 Υπολογισμός της ταχύτητας κατανάλωσης υποστρώματος (r_s''') και του συντελεστή απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθέν σάκχαρο (στο σημείο της μέγιστης παραγωγής βιομάζας, $Y_{X/S_{max}}$ και συνολικός, $Y_{X/S}$) για τις στατικές και αναδεδόμενες (120 ± 5 rpm) καλλιέργειες σακχάρων του *Volvariella volvacea* που αναπτύχθηκαν στους 32 ± 2 °C

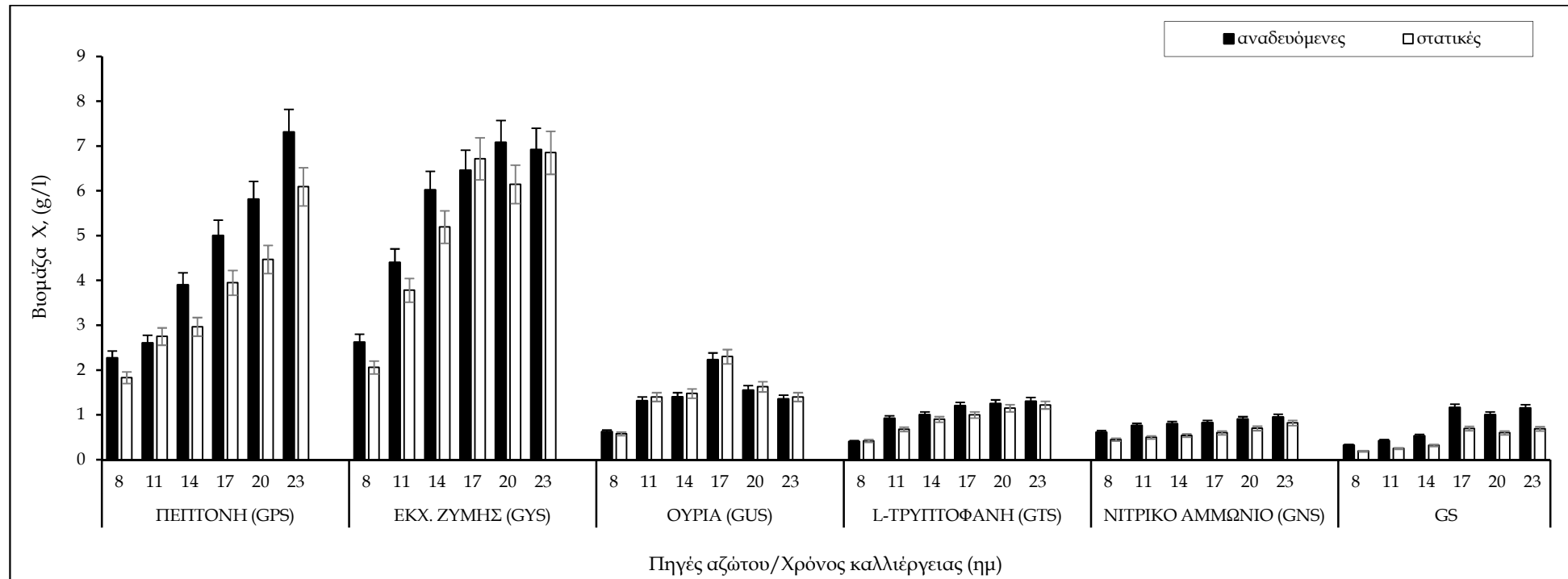
Είδος σακχάρου	Καλλιέργεια	r_s''' ($g_{\text{σακχ}}/l/d$)	$Y_{X/S_{max}}$	$Y_{X/S}$
Γλυκόζη	Σ	1,20	0,55	0,47
	Α	1,26	0,50	0,50
Φρουκτόζη	Σ	1,30	0,67	0,50
	Α	1,43	0,51	0,54
Άμυλο	Σ	0,69	0,39	0,36
	Α	1,69	0,65	0,61
Ξυλόζη	Σ	1,10	0,45	0,48
	Α	0,56	0,61	0,67
Μαλτόζη	Σ	<0,3	ΔY^*	ΔY
	Α	<0,3	ΔY	ΔY
Σακχαρόζη	Σ	<0,3	ΔY	ΔY
	Α	<0,3	ΔY	ΔY

$r_s''' = - \Delta S / \Delta t$, * ΔY : δεν υπολογίστηκε λόγω χαμηλής τιμής r_s'''

παραγωγή βιομάζας ($Y_{X/S_{max}}$). Παρατηρείται λοιπόν ότι η μέγιστη τιμή που εμφάνισε ο $Y_{X/S}$ ήταν 0,61-0,67 στις αναδεδόμενες καλλιέργειες του αμύλου και της ξυλόζης, στις καλλιέργειες των γλυκόζης, φρουκτόζης και στις στατικές της ξυλόζης ο $Y_{X/S}$ ήταν $\sim 0,5$, ενώ η χαμηλότερη τιμή υπολογίστηκε για τις στατικές καλλιέργειες του αμύλου (0,36). Επίσης, στο θρεπτικό μέσο της φρουκτόζης η τιμή του $Y_{X/S_{max}}$ στις στατικές καλλιέργειες ήταν πολύ ικανοποιητική (0,67), υψηλότερη από τον συνολικό συντελεστή απόδοσης και συνάδει με το υψηλό r_s''' ($1,3 g_{\text{σακχ}}/l/d$). Ωστόσο, σημειώνεται ότι η υψηλή ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος που υπολογίστηκε συνολικά για τις στατικές ($1,30 g_{\text{σακχ}}/l/d$) και αντίστοιχα για τις αναδεδόμενες καλλιέργειες ($1,43 g_{\text{σακχ}}/l/d$) δεν συνοδεύτηκε με ανάλογη μετατροπή της φρουκτόζης σε βιομάζα. Τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν ότι το άμυλο και η ξυλόζη είναι δύο θρεπτικά μέσα όπου ο συντελεστής $Y_{X/S}$ εμφάνισε μεγάλες διαφορές μεταξύ στατικής και αναδεδόμενης καλλιέργειας, αλλά είχε αντίστοιχες τιμές κατά τη βιομετατρεψιμότητα του υποστρώματος σε παραγωγή μέγιστης βιομάζας και βιομάζας συνολικά στη διάρκεια της ζύμωσης. Φαίνεται λοιπόν ότι το άμυλο στις αναδεδόμενες καλλιέργειες είχε διπλάσιο $Y_{X/S}$ από ό,τι στις στατικές και σε συνδυασμό με την υψηλή τιμή του r_s''' που έχει ήδη υπολογιστεί, συμπεραίνουμε ότι το υπόστρωμα στις καλλιέργειες αυτές όχι μόνο καταναλώθηκε με πολύ γρήγορο ρυθμό από τον μακρομύκητα, αλλά και ότι μετατράπηκε σε μεγάλη ποσότητα βιομάζας. Αντίστοιχα είναι και τα δεδομένα του θρεπτικού μέσου της ξυλόζης στις αναδεδόμενες καλλιέργειες, όπου πάλι οι $Y_{X/S}$, $Y_{X/S_{max}}$ σημείωσαν υψηλές τιμές.

Αξιοσημείωτο είναι όμως το γεγονός ότι η μεγάλη αυτή μετατροπή της ξυλόζης σε βιομάζα προήλθε από μικρή ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος ($r_{s''}=0,56$), ενώ το ακριβώς αντίθετο συνέβη στις στατικές καλλιέργειες ξυλόζης. Θα πρέπει να σημειωθεί, τέλος, ότι η σύγκριση των ποσοτικών παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης μεταξύ των καλλιεργειών που πραγματοποιήθηκαν στη γλυκόζη και την ξυλόζη έδειξε ότι, ενώ συνολικώς υψηλότερη παραγωγή βιομάζας (σε g/l) πραγματοποιήθηκε κατά την αύξηση του μακρομύκητα στη γλυκόζη (βλ. Πίνακας III.20α,β), ο $Y_{x/s}$ είναι μεγαλύτερος στην αναδεδυόμενη καλλιέργεια της ξυλόζης σε σχέση με την αντίστοιχη της γλυκόζης και παρόμοιος με αυτή υπό στατικές συνθήκες (Πίνακας III.21).

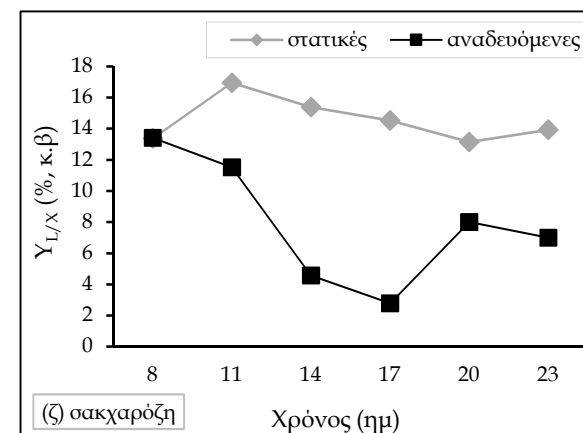
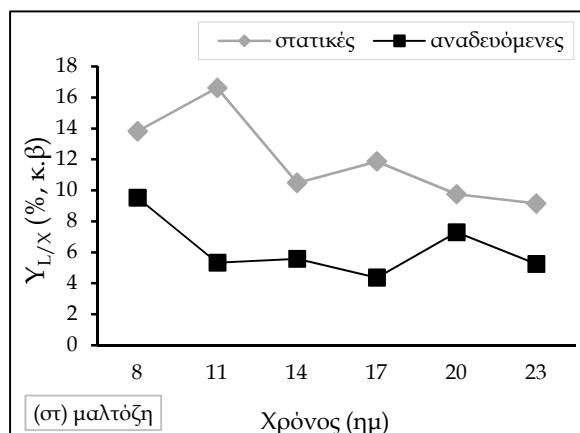
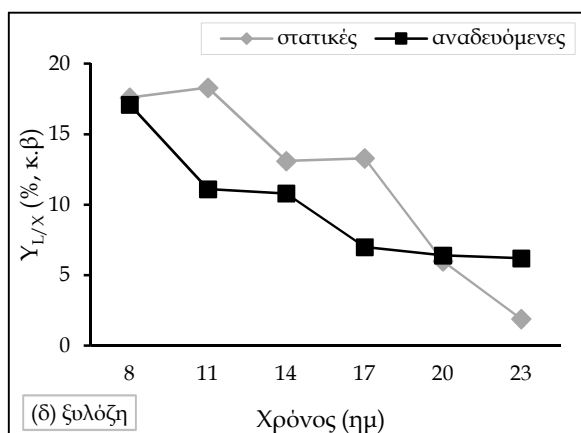
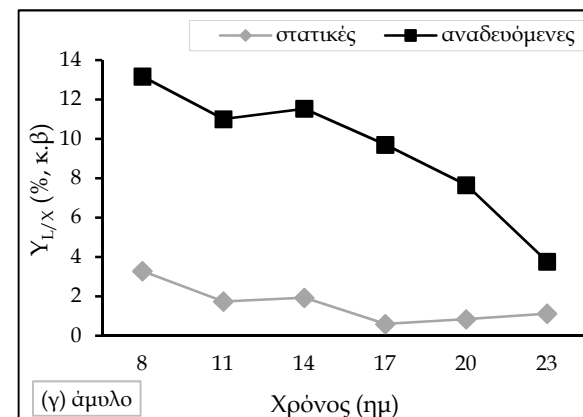
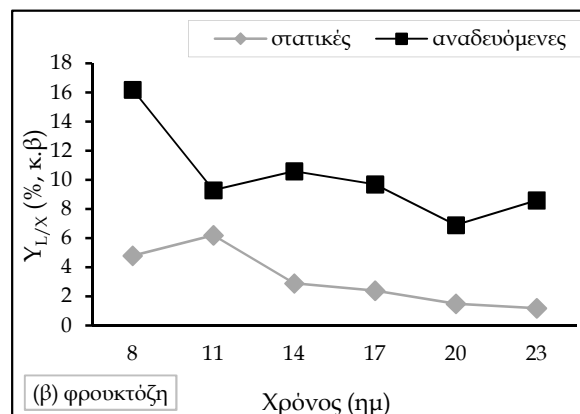
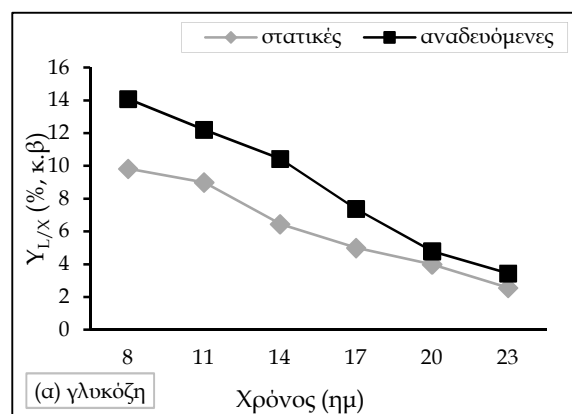
Αναφορικά με την επίδραση των διαφόρων πηγών αζώτου (τα θρεπτικά μέσα περιείχαν γλυκόζη ως κύρια πηγή άνθρακα), από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες καταγράφηκαν μεγαλύτερες τιμές βιομάζας συγκριτικά με τις στατικές, με την πεπτόνη (GPS) και το εκχύλισμα ζύμης (GYS) να είναι οι καλύτερα χρησιμοποιούμενες πηγές αζώτου από τον *V. voluacea* (Γράφημα III.23). Ωστόσο, αν και δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών πηγών αζώτου, υπό στατικές συνθήκες την μεγαλύτερη ανάλωση παρουσίασε το υπόστρωμα πεπτόνης, ενώ στις αναδεδυόμενες φιάλες το υπόστρωμα με εκχύλισμα ζύμης έδειξε να καταναλώνεται περισσότερο από τον μύκητα. Ακόμα, στο υπόστρωμα GYS υπήρξε στασιμότητα στη μυκηλιακή παραγωγή (πλατώ) από την 20^η ημέρα, ενώ στο GPS μέχρι το τελευταίο σημείο της κινητικής καταγραφόταν συνεχής αύξηση της τιμής της βιομάζας. Ωστόσο, οι τιμές της παραγόμενης βιομάζας στα GYS και GPS ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του υποστρώματος GPYS, το οποίο περιείχε εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη (Γράφημα III.23). Πολύ χαμηλή (έως 2 g/l) ήταν η παραγωγή της βιομάζας στα θρεπτικά μέσα με ουρία (GUS), L-τροπτοφάνη (GTS) και NH_4NO_3 (GNS). Τέλος, για το υπόστρωμα που περιείχε μόνο γλυκόζη και καμία πηγή αζώτου (μάρτυρας GS) καταγράφηκαν, ως αναμενόμενα, οι μικρότερες τιμές βιομάζας του πειράματος.



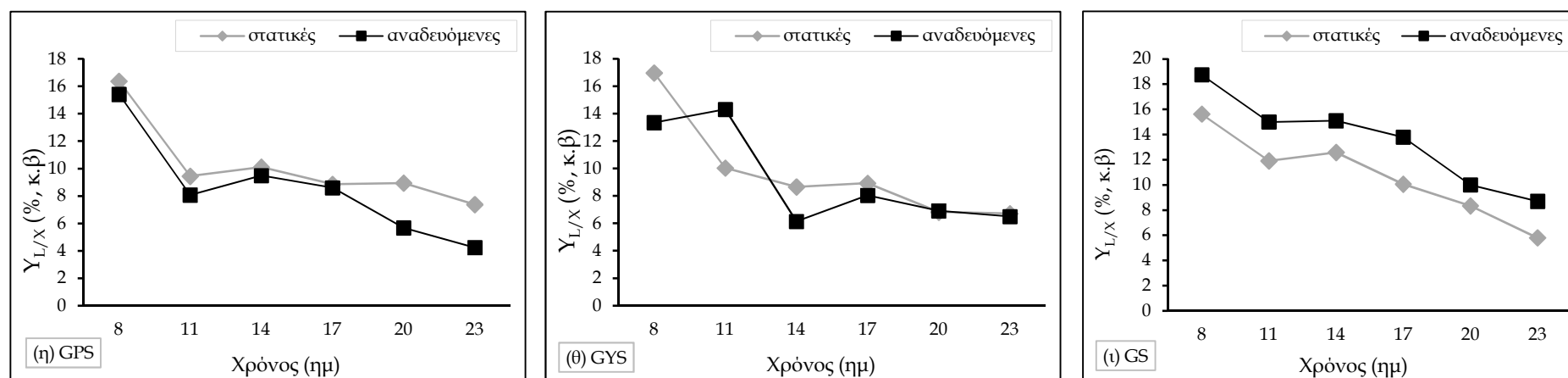
Γράφημα III.23 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής βιομάζας ($X - g/l$) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες (120 ± 5 rpm) στους 32 ± 2 °C σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη ($30 g/l$) και πηγή αζώτου πειπτόνη (GPS), εκχύλισμα ζύμης (GYS), ουρία (GUS), L-τρύπτοφάνη (GTS), NH_4NO_3 (GNS) και χωρίς πηγή αζώτου (GS), με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Τα αποτελέσματα που αφορούν τις συγκεντρώσεις των ολικών λιπιδίων (g/l και %, κ.β.) που παράχθηκαν κατά την διάρκεια της καλλιέργειας του *V. voluacea* σε υπόστρωμα με διάφορες πηγές άνθρακα υπό την επίδραση της ανάδευσης που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα III.20α,β δείχνουν πως η ποσότητα (g/l) των παραγόμενων λιπιδίων ήταν χαμηλή, γεγονός που συνάδει με τη μη ελαιογόνο φύση του μικροοργανισμού, όμως φαίνεται πως το είδος του σακχάρου και η εφαρμογή της ανάδευσης είχαν σημαντική επίδραση στη ποσότητα των λιπιδίων, τόσο σε απόλυτες τιμές (g/l), αλλά κυρίως στο ποσοστό της ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/X}$, %, κ.β.). Η ανάδευση επέδρασε θετικά με υπερδιπλασιασμό της συγκέντρωσης των λιπιδίων (g/l) συγκριτικά με τις στατικές καλλιέργειες στα σάκχαρα άμυλο, γλυκόζη και φρουκτόζη (L_{max} την 14^η ημέρα, 1,79 g/l, 1,12 g/l και 0,95 g/l, αντίστοιχα), ενώ οι στατικές συνθήκες έδειξαν να ευνοούν τα σάκχαρα ξυλόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη (L_{max} την 11^η ημέρα, 0,59 g/l, 0,40 g/l, 0,31 g/l, αντίστοιχα). Χαρακτηριστική είναι η θετική επίδραση της ανάδευσης στη σύνθεση λιπιδίων στο υπόστρωμα του αμύλου (1,22 έναντι 0,12 g/l) και αντίστοιχα η αρνητική στης ξυλόζης (0,27 έναντι 0,59 g/l), γεγονός που συνδέεται με την παραγωγή βιομάζας στα υποστρώματα αυτά. Στα υποστρώματα με τις διάφορες πηγές αζώτου, ωστόσο δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στη ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων υπό αναδευόμενες ή όχι συνθήκες.

Σε ό,τι αφορά τον $Y_{L/X}$, % κ.β. (Γράφημα III.24), οι μέγιστες τιμές εντοπίστηκαν στις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας και στη συνέχεια μειώθηκαν, όπως φαίνεται και από τις κινητικές των ολικών λιπιδίων που συντέθηκαν από τον *V. voluacea* κατά την καλλιέργειά του στις διάφορες πηγές σακχάρων, αλλά και σε γλυκόζη με εκχύλισμα ζύμης ή πειπόνη, χωρίς ωστόσο αυτή η μείωση να συνάδει και με μείωση του διαθέσιμου σακχάρου στο θρεπτικό μέσο. Εξαιρέση αποτελούν οι κινητικές των λιπιδίων που συντέθηκαν στη μαλτόζη (υπό ανάδευση) και στο άμυλο και σακχαρόζη (υπό στατικές συνθήκες) όπου η ποσότητά τους παρέμεινε σχεδόν σταθερή σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η ανάδευση ευνόησε τη σύνθεση των ολικών λιπιδίων (% κ.β.) στα υποστρώματα με φρουκτόζη, γλυκόζη και άμυλο ($Y_{L/X_{max}}$ την 8^η ημέρα, 16,16%, 14,08% και 13,17%, αντίστοιχα), καθώς παρατηρήθηκε αύξησή τους 2-5 φορές σε σχέση με την ποσότητά τους τις στατικές καλλιέργειες. Υπό στατικές συνθήκες, οι μέγιστες τιμές $Y_{L/X}$, %, κ.β που καταγράφηκαν στα υποστρώματα ξυλόζης, σακχαρόζης και μαλτόζης ήταν την 11^η ημέρα, 18,50%, 16,95% και 16,62%, κ.β. αντίστοιχα, ενώ η χαμηλότερη ποσότητα λιπιδίων συντέθηκε στο άμυλο (3,3%, κ.β.) και τη φρουκτόζη (4,75%, κ.β.). Τελικά, στο τέλος της ζύμωσης οι τιμές του $Y_{L/X}$ (% κ.β.) κυμάνθηκαν στις στατικές καλλιέργειες από 1,19% (άμυλο) μέχρι 13,93%, κ.β. (σακχαρόζη) και στις αναδευόμενες από 3,45% (γλυκόζη) μέχρι 8,6%, κ.β. (φρουκτόζη).



Γράφημα III.24α,β,γ,δ,στ,ζ Κινητική σύνθεσης ολικών λιπιδίων (% κ.β.) του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* 190 κατά την καλλιέργειά του υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες (120±5 rpm) στους 32±2 °C σε υποστρώματα (α) γλυκόζης (GPYS), (β) φρουκτόζης, (γ) άμυλου, (δ) ξυλόζης, (στ) μαλτόζης και (ζ) σακχαρόζης με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων



Γράφημα III.24η,θ,ι Κινητική σύνθεση ολικών λιπιδίων (% κ.β.) του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* 190 κατά την καλλιέργειά του υπό στατικές και αναδεδυόμενες συνθήκες (120 ± 5 rpm) στους 32 ± 2 °C σε υποστρώματα (η) γλυκόζης, πεπτόνης (GPS), (θ) γλυκόζης, εκχυλισματος ζύμης (GYS) και (ι) γλυκόζης, χωρίς πηγή αζώτου (GS), με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Μετά το υπολογισμό του ολικού παραχθέντος ενδοκυτταρικού λίπους από τον μακρομύκητα *V. voluacea* ακολούθησε η μελέτη της σύστασής του σε λιπαρά οξέα με δείγματα που ελήφθησαν για τα σημεία της καλλιέργειας την 8^η και 20^η ημέρα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στον Πίνακα 22α,β, όπου δεικνύεται ότι τα ακόρεστα ΛΟ αποτέλεσαν το 54-58% και τα κορεσμένα το 42-46% κ.β. των ολικών λιπαρών οξέων σε στατικές και αναδεδυόμενες καλλιέργειες και ότι η ακορεστικότητα των ΛΟ διατηρήθηκε στην αρχή (8^η) και το τέλος της ζύμωσης (20^η ημέρα) σε όλες τις πηγές άνθρακα, με εξαίρεση τα σάκχαρα φρουκτόζη και σακχαρόζη, όπου παρατηρήθηκε αύξησή της τόσο σε στατικές όσο σε αναδεδυόμενες φιάλες. Τα σάκχαρα που ευνόησαν την παραγωγή περισσότερων ακόρεστων ΛΟ ήταν στις στατικές καλλιέργειες η ξυλόζη και οι φρουκτόζη και σακχαρόζη

Πίνακας III.22α Σύσταση λιπιδίων (λιπαρά οξέα %, κ.β.) και δείκτης ακορεστικότητας (U.I.) την 8^η και 20^η ημέρα της καλλιέργειας του μακρομύκητα *V. voluacea* σε υγρά θρεπτικά μέσα διαφόρων πηγών άνθρακα (αρχικός λόγος C/N=20), υπό στατικές συνθήκες στους 32±2 °C

Είδος σακχάρου	Χρόνος (ημέρες)	Λιπαρά οξέα (% κ.β.)					U.I.
		C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	Λοιπά*	
Γλυκόζη (GPYS)	8 ^η	16,0	5,0	1,0	56,5	21,5	1,14
	20 ^η	16,2	6,1	4,5	57,5	15,7	1,20
Φρουκτόζη	8 ^η	21,4	3,0	2,0	63,6	10,0	1,29
	20 ^η	17,0	1,0	ίχνη**	74,0	8,0	1,48
Άμυλο	8 ^η	23,8	4,1	ίχνη	40,2	31,9	0,80
	20 ^η	20,2	2,0	2,0	38,7	37,1	0,79
Ξυλόζη	8 ^η	19,0	1,0	4,5	65,0	10,5	1,35
	20 ^η	21,5	ίχνη	6,7	64,5	7,3	1,36
Μαλτόζη	8 ^η	22,3	ίχνη	4,8	38,4	34,5	0,82
	20 ^η	14,9	ίχνη	4,0	41,3	39,8	0,87
Σακχαρόζη	8 ^η	16,0	5,1	ίχνη	67,8	11,1	1,36
	20 ^η	13,7	2,5	ίχνη	72,0	11,8	1,44
Γλυκόζη/Πεπτόνη (GPS)	8 ^η	14,1	1,0	3,5	54,2	27,2	1,12
	20 ^η	14,3	3,7	3,5	56,0	22,5	1,16
Γλυκόζη/Εκχ. ζύμης (GYS)	8 ^η	15,0	3,4	2,4	45,7	26,2	0,94
	20 ^η	14,0	3,5	5,4	50,0	27,1	1,05

*: Τα λοιπά ΛΟ κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 και C20:0, ** Ιχνη: <0,4%

Η σύσταση των λιπιδίων στο υπόστρωμα GS δεν υπολογίστηκε λόγω μικρής ποσότητας ολικών λιπιδίων (g/l)

Πίνακας III.22β Σύσταση λιπιδίων (λιπαρά οξέα %, κ.β.) και δείκτης ακορεστότητας (U.I.) την 8^η και 20^η ημέρα της καλλιέργειας του μακρομύκητα *V. voluacea* σε υγρά θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων (αρχικός λόγος C/N=20), υπό αναδεδόμενες (120±5 rpm) συνθήκες στους 32±2 °C

Είδος σακχάρου	Χρόνος (ημέρες)	Λιπαρά οξέα (% κ.β.)					U.I.
		C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	Λοιπά*	
Γλυκόζη (GPYS)	8 ^η	18,0	7,2	1,8	45,9	27,1	0,94
	20 ^η	25,7	4,0	3,5	40,3	26,5	0,84
Φρουκτόζη	8 ^η	25,4	5,0	1,0	61,4	7,2	1,24
	20 ^η	17,5	3,1	ίχνη**	70,5	8,9	1,41
Άμυλο	8 ^η	12,5	2,5	1,0	50,0	34,0	1,01
	20 ^η	22,0	2,0	ίχνη	52,0	24,0	1,04
Ξυλόζη	8 ^η	11,3	6,0	-	53,7	29,0	1,07
	20 ^η	18,0	7,2	-	40,0	34,8	0,80
Μαλτόζη	8 ^η	27,6	7,0	-	43,4	22,0	0,87
	20 ^η	24,0	5,5	-	49,7	20,8	0,99
Σακχαρόζη	8 ^η	19,5	8,0	ίχνη	64,5	8,0	1,29
	20 ^η	16,0	4,8	ίχνη	70,2	9,0	1,40
Γλυκόζη/Πεπτόνη (GPS)	8 ^η	17,0	5,5	4,0	55,0	18,5	1,14
	20 ^η	13,7	2,7	ίχνη	55,0	28,6	1,10
Γλυκόζη/Εκχ. ζύμης (GYS)	8 ^η	22,4	3,0	ίχνη	58,5	16,1	1,17
	20 ^η	14,9	3,2	ίχνη	59,0	22,9	1,18

*: Τα λοιπά ΛΟ κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 και C20:0, ** Ίχνη: <0,4%

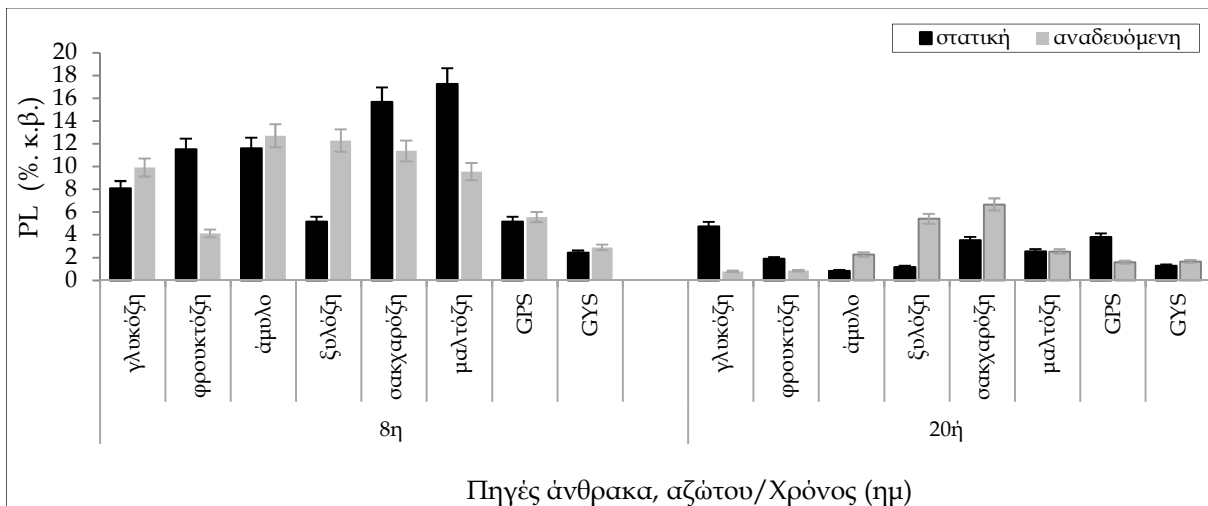
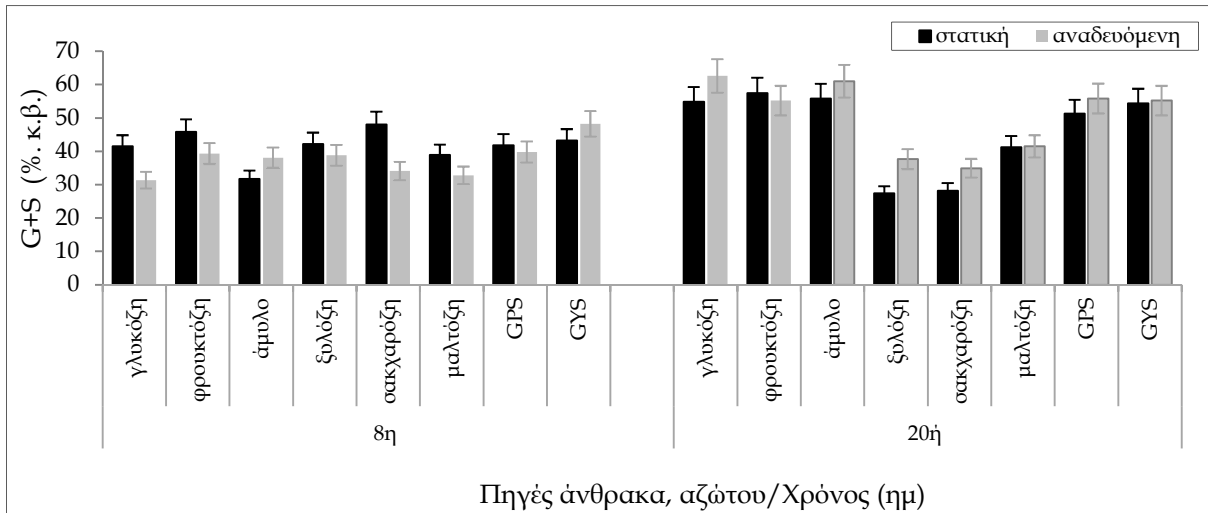
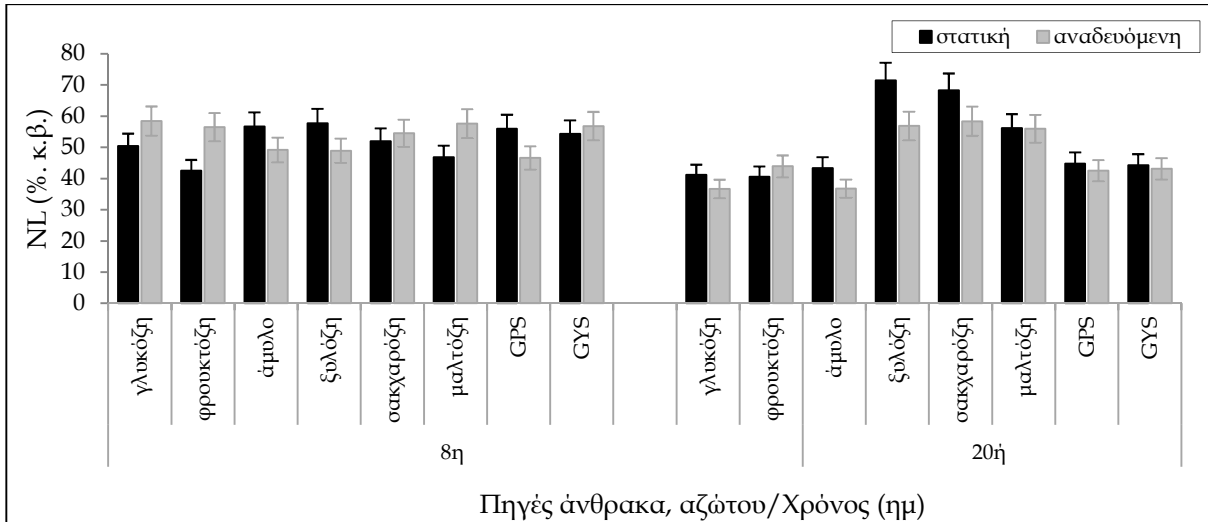
Η σύσταση των λιπιδίων στο υπόστρωμα GS δεν υπολογίστηκε λόγω μικρής ποσότητας ολικών λιπιδίων (g/l)

σε στατικές και αναδεδόμενες καλλιέργειες σε ποσοστό ~70% κ.β., όπως φαίνεται και από τις υψηλές τιμές του δείκτη ακορεστότητας (U.I.) για τα υποστρώματα αυτά (1,35-1,40). Η ανάδευση ωστόσο φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση στη σύσταση των ΛΟ μόνο του αμύλου (U.I.=1,04 έναντι 0,80 στατικών) και λιγότερο σε αυτή της μαλτόζης, ενώ αντίθετα είχε αρνητική επίδραση στην ακορεστότητα των ΛΟ των λιπιδίων των υποστρωμάτων πρώτα της ξυλόζης και μετά της γλυκόζης. Περαιτέρω, είναι εμφανές (και σε επιβεβαίωση προηγούμενων αποτελεσμάτων) ότι το κύριο ΛΟ που ανιχνεύτηκε στα λιπίδια του *V. voluacea* ήταν στις καλλιέργειες των περισσότερων σακχάρων το λινελαϊκό ($\Delta^9,12$ C18:2), με τα ποσοστά του να διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφόρων σακχάρων αλλά και μεταξύ στατικής και αναδεδόμενης καλλιέργειας. Παρατηρείται λοιπόν ότι στις στατικές καλλιέργειες καταγράφηκαν τα υψηλότερα ποσοστά $\Delta^9,12$ C18:2 (~61-72% κ.β.) στα σάκχαρα φρουκτόζη, σακχαρόζη και ξυλόζη, ακολούθησε η γλυκόζη (~57% κ.β.) και τέλος το άμυλο και η μαλτόζη (~40% κ.β.). Στις αναδεδόμενες καλλιέργειες ωστόσο, αν και στις καλλιέργειες

της φρουκτόζης και της σακχαρόζης παράχθηκε πάλι η μεγαλύτερη ποσότητα $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ (~61-70% κ.β.) σε όλα τα υπόλοιπα σάκχαρα η συγκέντρωσή του ήταν λιγότερο από 50% κ.β.. Σε αρκετά μικρότερα ποσοστά (11,3-27,6% κ.β.) ανιχνεύτηκε το κορεσμένο ΛΟ παλμιτικό (C16:0), αύξηση της συγκέντρωσης του οποίου συνοδεύονταν και με ανάλογη μείωση του ποσοστού του $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$. Τέλος, μικρές ήταν οι ποσότητες του στεατικού (C18:0) και του ελαϊκού οξέος $\Delta^9\text{C18:1}$, ιδίως στις αναδεδόμενες καλλιέργειες. Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία, των μικρομοριακών κορεσμένων λιπαρών οξέων καπρυλικό (C8:0) και καπρικό (C10:0), όπως και των ΛΟ λαυρικό (C12:0), μυριστικό (C14:0) και αραχιδικό (C20:0) το ποσοστό των οποίων έφτασε στις στατικές καλλιέργειες το 40% κ.β. των ολικών λιπαρών οξέων.

Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *V. voluacea* σε υγρά θρεπτικά μέσα με διάφορα σάκχαρα ως κύριες πηγές άνθρακα, μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών λιπιδίων γινόταν κλασμάτωσή του σε δείγματα από την 8^η και 20^η ημέρα της καλλιέργειας (αρχή και τέλος καλλιέργειας). Στο Διάγραμμα III.25 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της κλασμάτωσης των ολικών λιπιδίων των καλλιεργειών αυτών όπου φαίνεται καθαρά η επίδραση της στατικής και της αναδεδόμενης καλλιέργειας στη ποσότητα των ουδετέρων λιπιδίων (NL%, κ.β.) των σφιγκολιπιδίων-γλυκολιπιδίων (G+S%, κ.β.) και των φωσφολιπιδίων (PL%, κ.β.).

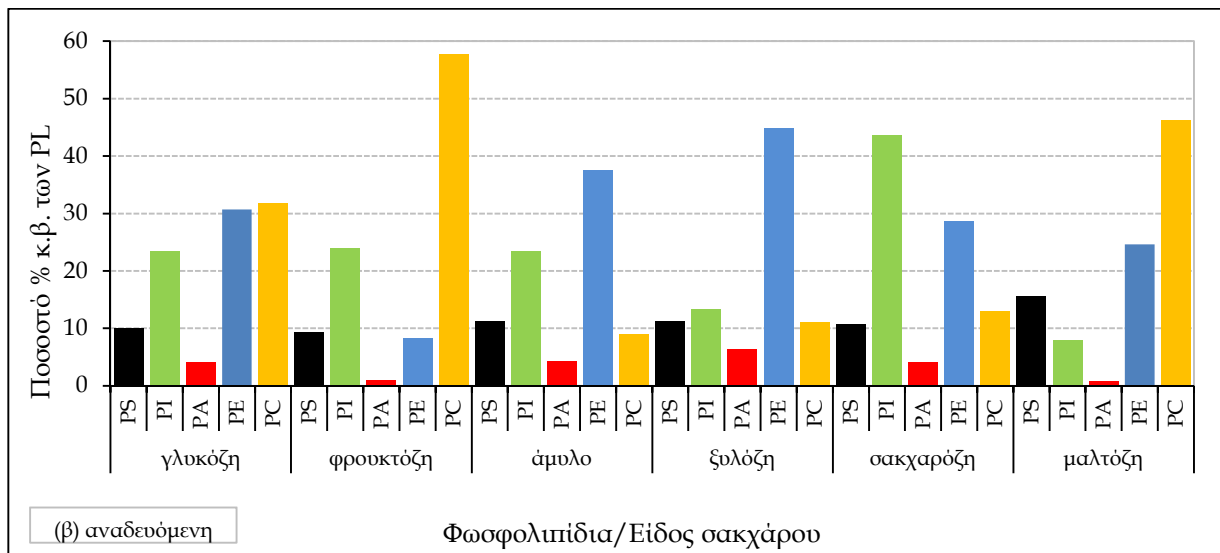
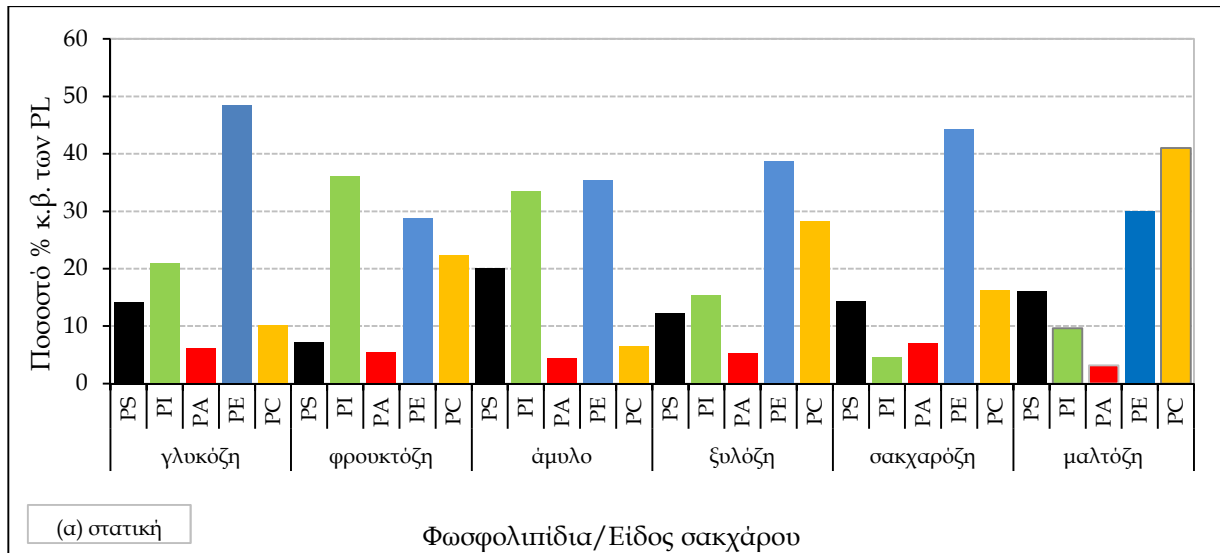
Παρατηρείται λοιπόν πως στο πρώτο σημείο της κινητικής (8^η ημέρα), στο σύνολο των λιπιδίων των αναδεδόμενων καλλιεργειών των σακχάρων που δοκιμάστηκαν, το μεγαλύτερο μέρος το κατείχαν τα NL σε ποσοστό από 48,9 (ξυλόζη) έως 58,5%, κ.β. (γλυκόζη). Στις στατικές καλλιέργειες, επίσης υπερέτρησαν τα NL έναντι των υπολοίπων κλασμάτων σε ποσοστά 46,9% (μαλτόζη) έως 57,8% κ.β. (ξυλόζη), με εξαίρεση το θρεπτικό μέσο της φρουκτόζης όπου υπερίσχυσαν με μικρή διαφορά τα G+S (45,9% έναντι 42,6% των NL). Τα PL ήταν το κλάσμα με τη μικρότερη συγκέντρωση (<10%, κ.β.), η οποία μεταβάλλονταν ανάλογα με το είδος του σακχάρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα υψηλά ποσοστά των PL των αναδεδόμενων καλλιεργειών στα σάκχαρα άμυλο και ξυλόζη (12,5%) και των στατικών σε μαλτόζη (17,3%) και σακχαρόζη (15,7). Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν προς το τέλος της ζύμωσης (20^η ημέρα) όπου σε στατικές και αναδεδόμενες φιάλες στα λιπίδια των υποστρωμάτων των σακχάρων γλυκόζη, φρουκτόζη και άμυλο υπολογίστηκε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό G+S από ό,τι NL, της τάξης του 10-25% ανάλογα το σάκχαρο. Για τα σάκχαρα ξυλόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη τα ολικά λιπίδια περιείχαν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα NL από ό,τι G+S (διπλάσια ή τριπλάσια) σε στατικές και αναδεδόμενες καλλιέργειες, φτάνοντας τις πολύ υψηλές τιμές 71,5% (ξυλόζη)



Γράφημα III.25 Επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα (γλυκόζη - GPYS, φρουκτόζη, άμυλο, ξυλόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη) και αζώτου (πεπτόνη - GPS, εκχυλίσμα ζύμης - GYS) του θρεπτικού μέσου (αρχικός λόγος C/N=20) στη ποσότητα (% κ.β.) των ουδετέρων λιπιδίων (NL), των σφιγκολιπιδίων-γλυκολιπιδίων (G+S) και των φωφολιπιδίων (PL) των λιπιδίων του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* σε στατική και αναδεδόμενη καλλιέργεια (120±5 grm) στους 32±2 °C, Σύμβολα: GPS - υπόστρωμα γλυκόζης, πεπτόνης, προσθετικών, GYS - υπόστρωμα γλυκόζης, εκχυλίσματος ζύμης, προσθετικών

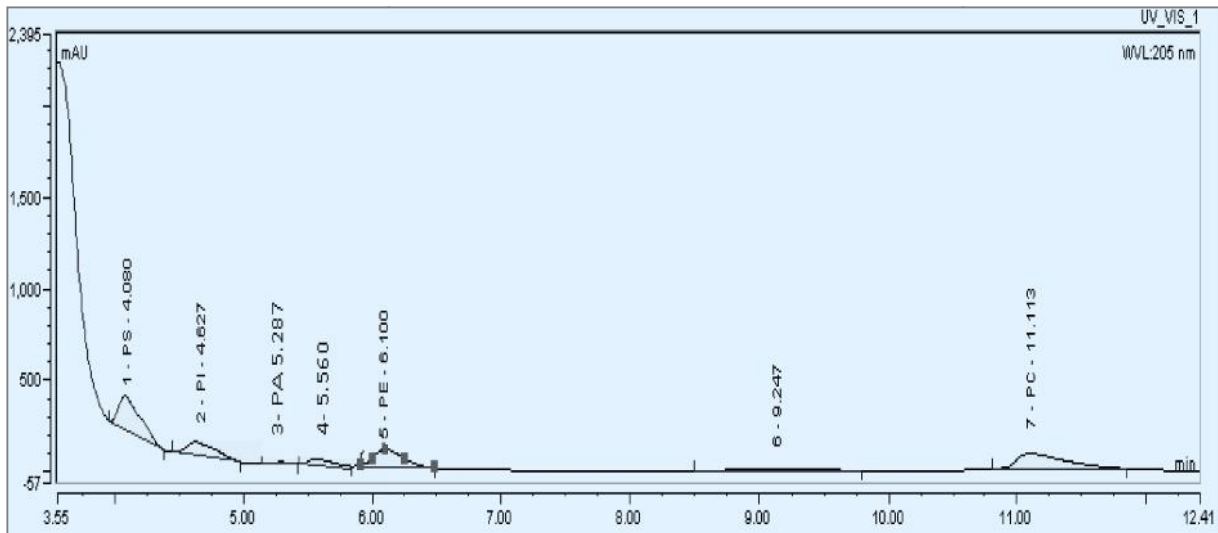
και 68,3% μαλτόζη. Το κλάσμα των PL τέλος εμφάνισε σημαντική μείωση στα ποσοστά του από την 8^η στην 20^η ημέρα της ζύμωσης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα λιπιδίων των καλλιιεργειών όπου τα PL είχαν πολύ χαμηλή τιμή όπως οι κινούμενες της γλυκόζης (0,8%) και φρουκτόζης (0,9%) και οι στατικές του άμυλου (0,8%). Ωστόσο, σε ξυλόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη ανιχνεύτηκαν ποσοστά PL της τάξης 2,5-6,7% κ.β.

Περαιτέρω, το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (PL) αναλύθηκε σε κλάσεις με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των πηγών άνθρακα στο προφίλ των PL του μακρομύκητα *V. voluacea* AMRL 190 υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες (Γράφημα III.26α,β). Οι κλάσεις που ανιχνεύτηκαν ήταν οι εξής: φωσφατιδυλσερίνη (PS), φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), φωσφατιδικό οξύ (PA), φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) και φωσφατιδυλοχολίνη (PC), τα ποσοστά των οποίων διέφεραν ανάλογα με το σάκχαρο και την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης. Σύμφωνα με τις μέσες τιμές, σε όλες τις καλλιέργειες το μεγαλύτερο ποσοστό κατείχε η PE, ακολουθούθησαν οι PC και PI με ποσοστά που δε διέφεραν σημαντικά, η PS σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό και τέλος η PA. Αναλυτικότερα, στις στατικές καλλιέργειες τα ποσοστά της PE κυμάνθηκαν από 28,9% (φρουκτόζη) έως 48,5% κ.β. (γλυκόζη), της PC από 6,6% (άμυλο) έως 41% κ.β. (μαλτόζη) και της PI από 4,6% (σακχαρόζη) έως 36% κ.β. (φρουκτόζη). Αντίστοιχα, στις αναδεδόμενες καλλιέργειες τα ποσοστά της PE κυμάνθηκαν από 8,2% (φρουκτόζη) έως 44,8% κ.β. (ξυλόζη), της PC από 8,9% (άμυλο) έως 57,7% κ.β. (φρουκτόζη) και της PI από 8% (μαλτόζη) έως 43,5% κ.β. (σακχαρόζη). Η ανάδευση προκάλεσε αύξηση των ποσοστών της κλάσης PC στα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη, της PE στη ξυλόζη και στην PI στη σακχαρόζη. Αντίθετα, σημαντικά μεγαλύτερα ήταν τα ποσοστά της PC στις μη αναδεδόμενες καλλιέργειες της ξυλόζης και σακχαρόζης, της PE στις γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη και της PI σε φρουκτόζη και άμυλο. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από την ανάλυση των φωσφολιπιδίων του μακρομύκητα *V. voluacea* 190 (αύξηση σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη μαλτόζη) δίνεται στην Εικόνα III.5.



Γράφημα III.26α,β Κλάσεις φωσφολιπιδίων (% κ.β. των ολικών φωσφολιπιδίων) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων (αρχικός C/N=20) υπό (α) στατικές και (β) αναερόβιες (120±5 rpm) συνθήκες, σε θερμοκρασία 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 20^η ημέρα

Σύμβολα: PC - φωσφατιδυλοχολίνη, PE - φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, PA - φωσφατιδικό οξύ, PI - φωσφατιδυλινωσιτόλη, PS - φωσφατιδυλσερίνη

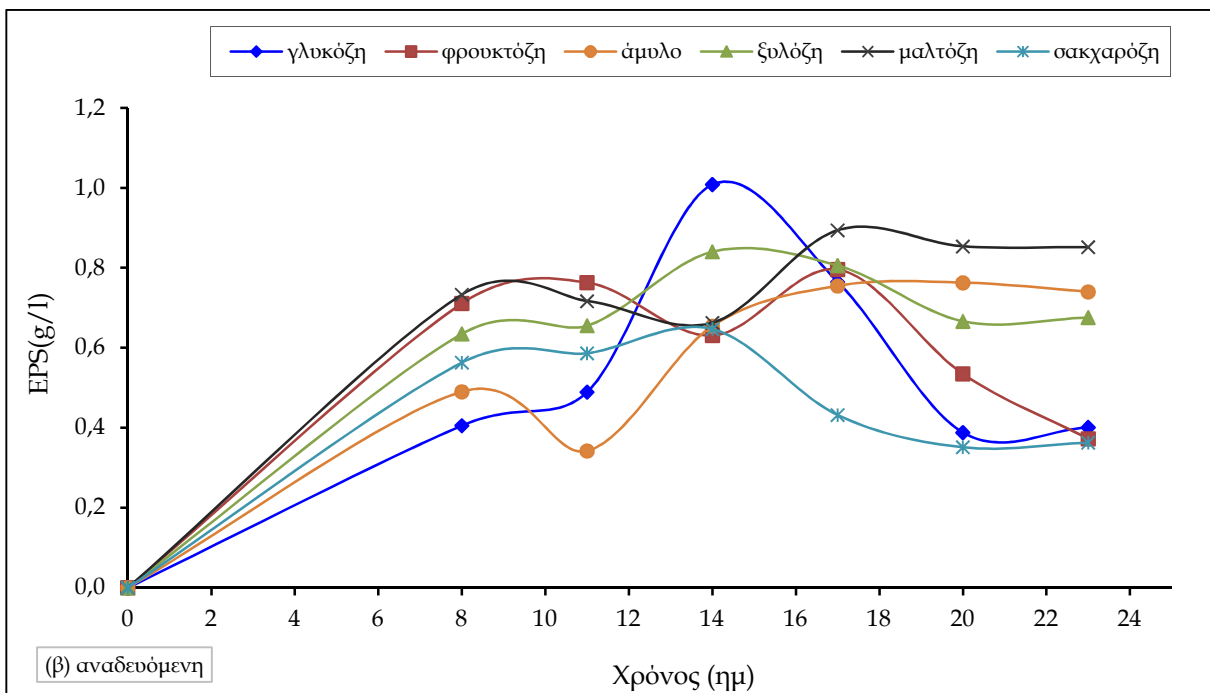
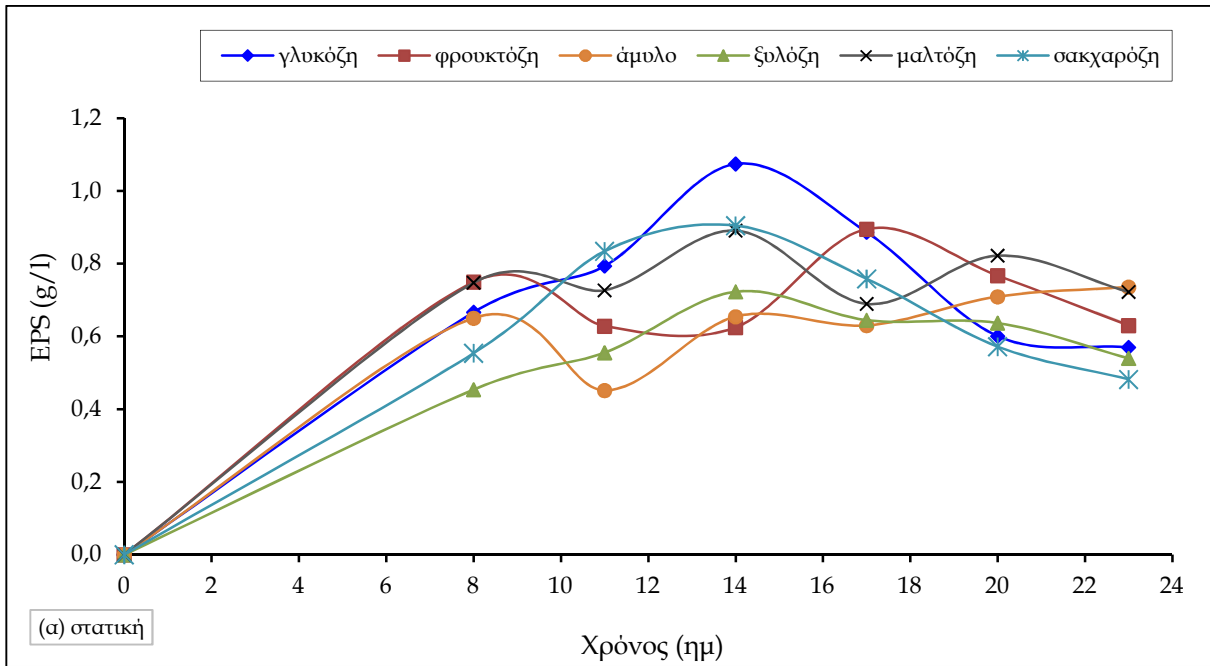


Εικόνα III.5 Χρωματογράφημα των φωσφολιπιδίων του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* κατά την καλλιέργειά του σε υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα τη μαλτόζη στους 32 ± 2 °C υπό αναδεδυόμενες συνθήκες (120 ± 5 rpm)

Σύμβολα: 1-PS: φωσφατιδυλερίνη, 2-PI: φωσφατιδυλινοσιτόλη, 3-PA: φωσφατιδικό οξύ, 5-PE φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, 7-PC: φωσφατιδυλοχολίνη, 4,6: άλλα μη ταυτοποιημένα φωσφολιπίδια

Επιπλέον, μελετήθηκε η κινητική βιοσύνθεσης των εξωπολυσακχαριτών (EPS) στα θρεπτικά μέσα των διάφορων σακχάρων υπό στατικές και αναδεδυόμενες συνθήκες (Γράφημα III.27), όπου φάνηκε ότι η παραγωγή τους επηρεάστηκε κυρίως από την πηγή άνθρακα και σε μικρότερο βαθμό από την εφαρμογή της ανάδευσης. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, υπό στατικές συνθήκες, αναδειχθηκαν καλύτερες πηγές άνθρακα για παραγωγή EPS η γλυκόζη, η μαλτόζη και η φρουκτόζη (EPS_{max} 1,074 g/l -14^η ημέρα; 0,891 g/l -14^η ημέρα και 0,895 g/l -17^η ημέρα αντίστοιχα) (βλ. Πίνακα III.23), όπως παρουσιάζονται και στην παρακάτω φθίνουσα σειρά γλυκόζη = μαλτόζη > φρουκτόζη > σακχαρόζη > άμυλο = ξυλόζη. Υπό αναδεδυόμενες συνθήκες ωστόσο, οι γλυκόζη, μαλτόζη και ξυλόζη έδειξαν να ευνοούν περισσότερο την παραγωγή EPS (EPS_{max} 1,009 g/l -14^η ημέρα, 0,894 g/l -17^η ημέρα, 0,840 g/l g/l -14^η ημέρα αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν οι άμυλο = φρουκτόζη > σακχαρόζη. Η μέγιστη παραγωγή EPS καταγράφηκε τη 14^η ημέρα της ζύμωσης στα περισσότερα σάκχαρα, με εξαίρεση τη φρουκτόζη (17^η) και το άμυλο (23^η) στις στατικές και αναδεδυόμενες καλλιέργειες και τη μαλτόζη (17^η στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες), όταν η ποσότητα των σακχάρων στα θρεπτικά μέσα ήταν ακόμα υψηλή, δεικνύοντας πιθανή αποικοδόμησή τους στη συνέχεια, καθώς στην εξέλιξη της καλλιέργειας με τον χρόνο η παραγωγή της βιομάζας αυξάνονταν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μείωσης των παραγόμενων EPS αποτελούν οι καλλιέργειες των σακχάρων γλυκόζη, σακχαρόζη και ξυλόζη. Όσον αφορά στο υπόστρωμα

της γλυκόζης που είχε μελετηθεί και σε προηγούμενα πειράματα (βλ. κεφάλαιο III.3), τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την μεγιστοποίηση της τιμής των EPS σε πρώιμο στάδιο της καλλιέργειας (12^η-14^η ημέρα) γεγονός που αποδίδει γενικά και το πρότυπο της πορείας των περισσότερων πηγών άνθρακα στις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Αντίθετα, το



Γράφημα III.27 Επίδραση των σακχάρων γλυκόζη, φρουκτόζη, άμυλο, ξυλόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS, g/l) του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* σε (α) στατική και (β) αναδεδόμενη καλλιέργεια (120±5 rpm) στους 32±2 °C

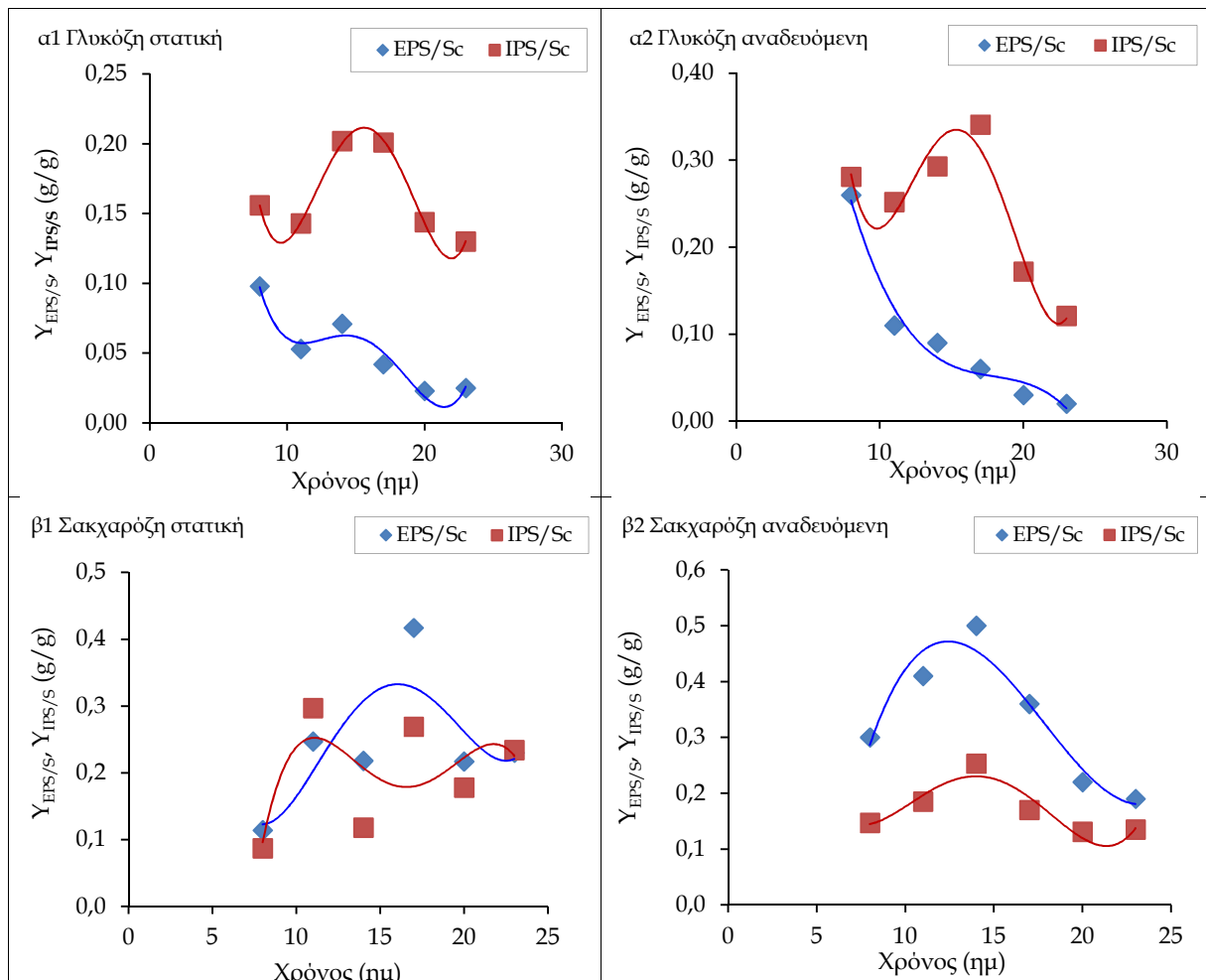
Πίνακας III.23 Καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 υπό στατικές και αναδεδυόμενες συνθήκες (120±5 g/m) στους 32±2 °C σε θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Είδος σακχάρου	Στατικές καλλιέργειες							Αναδεδυόμενες καλλιέργειες						
	Ημέρα	X (g/l)	EPS (g/l)	Y _{EPS/S} (g/g)	IPS (g/l)	Y _{IPS/S} (g/g)	Ημέρα	X (g/l)	EPS (g/l)	Y _{EPS/S} (g/g)	IPS (g/l)	Y _{IPS/S} (g/g)		
γλυκόζη	α	14 ^η	7,42	1,074	0,071	3,07	0,202	α	14 ^η	10,70	1,009	0,09	3,51	0,293
	β	17 ^η	9,88	0,887	0,042	4,23	0,201	β	17 ^η	12,24	0,765	0,06	4,85	0,341
	γ	23 ^η	15,23	0,630	0,025	3,59	0,130	γ	23 ^η	14,50	0,401	0,02	3,52	0,121
φρουκτόζη	α,β,γ	17 ^η	12,89	0,895	0,047	3,30	0,172	α	17 ^η	12,65	0,796	0,04	2,96	0,128
								β	23 ^η	14,48	0,373	0,02	3,63	0,124
								γ	20 ^η	14,63	0,535	0,03	2,90	0,101
άμυλο	α,γ	23 ^η	6,25	0,830	0,052	1,40	0,088	α	23 ^η	11,28	0,736	0,03	2,85	0,110
	β	17 ^η	5,09	0,755	0,055	1,77	0,129	β,γ	14 ^η	15,52	0,654	0,03	5,20	0,219
ξυλόζη	α	14 ^η	4,65	0,723	0,056	0,91	0,071	α	14 ^η	3,23	0,840	0,11	0,55	0,080
	β,γ	23 ^η	11,30	0,540	0,014	2,49	0,099	β,γ	23 ^η	7,85	0,676	0,03	1,96	0,152
μαλτόζη	α	14 ^η	2,67	0,891	0,162	0,56	0,102	α	17 ^η	2,52	0,894	2,16	0,38	1,188
	β	17 ^η	2,19	0,690	0,140	0,71	0,144	β,γ	14 ^η	2,69	0,663	1,25	0,59	0,364
	γ	23 ^η	3,06	0,723	0,105	0,61	0,088							
σακχαρόζη	α	14 ^η	1,82	0,905	0,218	0,49	0,118	α,β	14 ^η	1,53	0,647	0,50	0,46	0,253
	β,γ	11 ^η	2,36	0,834	0,247	1,00	0,297	γ	11 ^η	1,65	0,587	0,41	0,38	0,185

X: Η παραγόμενη βιομάζα (g/l), EPS: εξωπολυσακχαρίτες (g/l), IPS: ενδοπολυσακχαρίτες (g/l),
 Y_{EPS/S}: το ποσοστό των συνολικών εξωπολυσακχαριτών προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (σε g/g)
 Y_{IPS/S}: το ποσοστό των συνολικών ενδοπολυσακχαριτών προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (σε g/g)
 α: μέγιστη τιμή παραγόμενων εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών - EPS (σε g/l)
 β: μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l)
 γ: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)

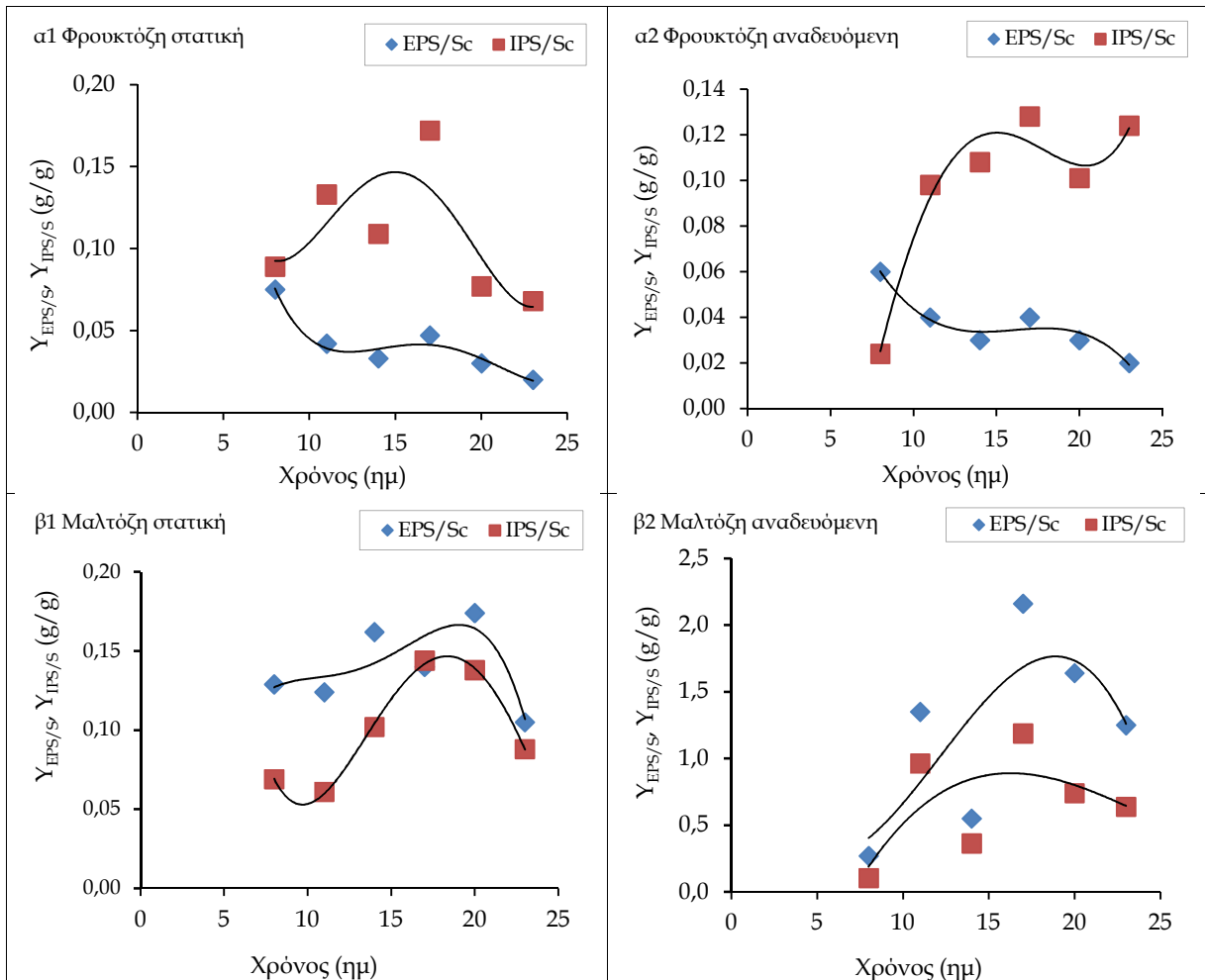
άμυλο και η μαλτόζη ακολούθησαν σταθερή ή και αυξανόμενη πορεία στην παραγωγή των EPS, τόσο υπό στατικές όσο και υπό αναδεδυόμενες συνθήκες.

Επιπλέον, υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης εξωπολυσακχαριτών ως προς το καταναλωθέν σάκχαρο (Y_{EPS/S}, g/g) (Πίνακας III.23). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο *V. voluacea* αξιοποίησε καλύτερα τους δισακχαρίτες σακχαρόζη και τη μαλτόζη, τόσο σε στατικές όσο και σε αναδεδυόμενες συνθήκες. Ακόμη από τα Γραφήματα III.28α και 29β, όπου καταγράφεται η πορεία του Y_{EPS/S} στη διάρκεια της καλλιέργειας ενδεικτικά στον μονοσακχαρίτη γλυκόζη και στον δισακχαρίτη μαλτόζη, διαπιστώνεται ότι ο συντελεστής Y_{EPS/S} ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο στους μονοσακχαρίτες από ό,τι στους δισακχαρίτες. Συγκεκριμένα, στη γλυκόζη λαμβάνει τη μέγιστη τιμή στο αρχικό στάδιο της καλλιέργειας (8^η ημέρα) και βαίνει μειούμενος μέχρι την ολοκλήρωσή της, τόσο σε στατικές όσο και σε αναδεδυόμενες συνθήκες (Γράφημα III.28 α1,2). Παρόμοια πτωτική πορεία ακολουθεί ο Y_{EPS/S}



Γράφημα III.28α,β Μεταβολή του συντελεστή απόδοσης εξωπολυσακχαριτών ($Y_{EPS/Sr}$, g/g) και ενδοπολυσακχαριτών ($Y_{IPS/Sr}$, g/g) ως προς το καταναλωθέν σάκχαρο κατά την διάρκεια της καλλιέργειας του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* 190 υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες (120 ± 5 rpm) στους 32 ± 2 °C σε καλλιέργειες (α) γλυκόζης (GPYS) και (β) σακχαρόζης με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

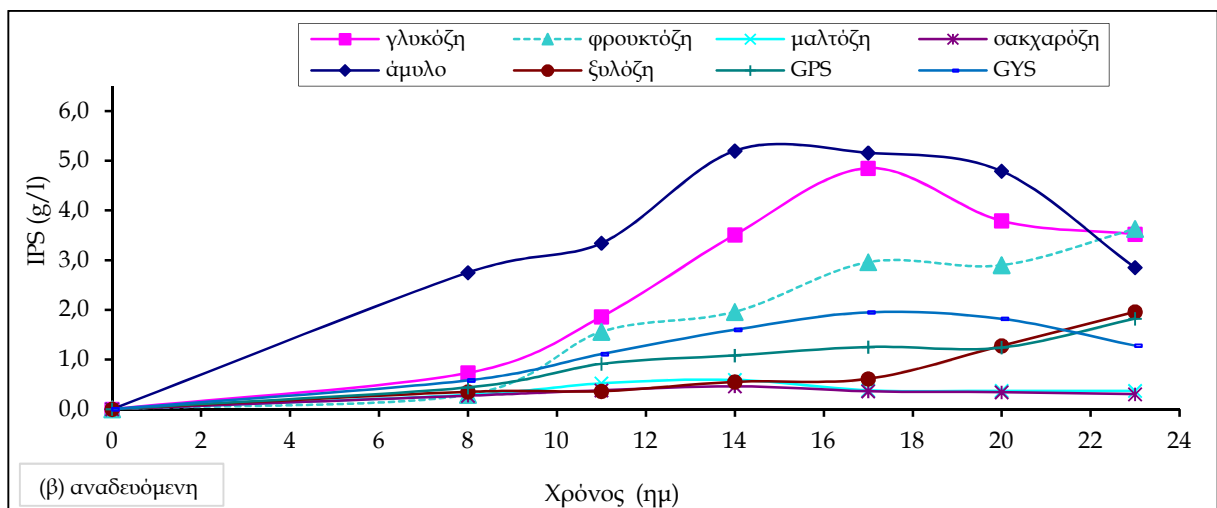
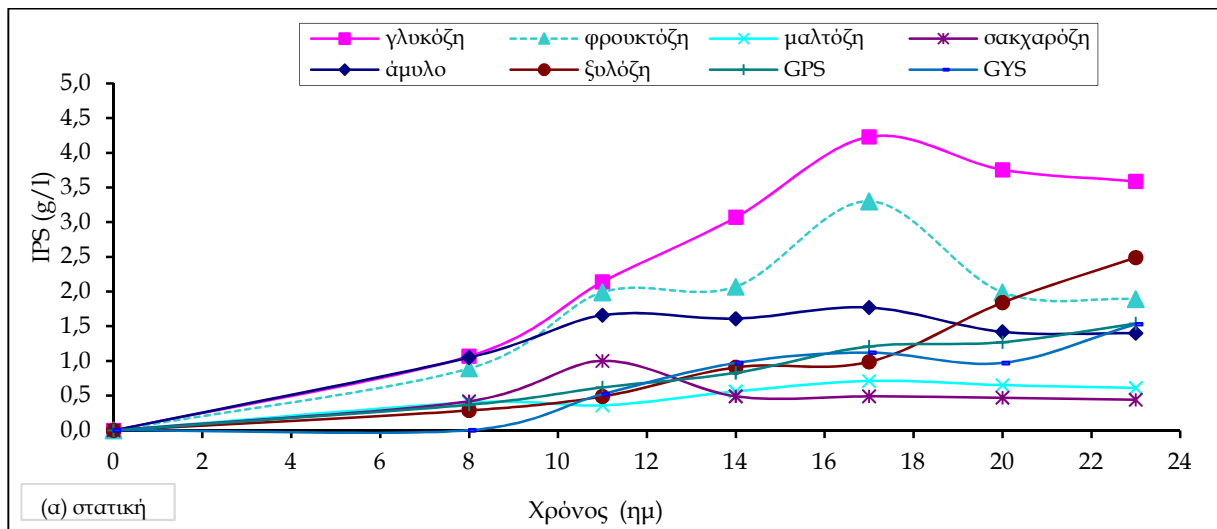
και στους μονοσακχαρίτες φρουκτόζη και ξυλόζη. Ωστόσο στη σακχαρόζη (Γράφημα III.28 β1,2) ο συντελεστής $Y_{EPS/Sr}$ παρουσιάζει αυξητική πορεία στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, κορύφωση την 17^η ημέρα και πτωτικές τιμές προς το τέλος της. Αντίστοιχο πρότυπο μεταβολών του αναδεικνύει και η μαλτόζη (Γράφημα III.29 β1,2) με μεγιστοποίηση του $Y_{EPS/Sr}$ την 20^η ημέρα σε στατικές συνθήκες και τη 17^η ημέρα στις αναδεδόμενες. Αντίθετα, στο άμυλο, ο συντελεστής $Y_{EPS/Sr}$ παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές στο αρχικό στάδιο, αυξητική πορεία μεταξύ 11^{ης} και 20^{ης} ημέρας (περισσότερο εμφανές στις στατικές συνθήκες) και παραμένει σε υψηλό επίπεδο μέχρι το τέλος της καλλιέργειας.



Γράφημα III.29α,β Μεταβολή του συντελεστή απόδοσης εξωπολυσακχαριτών ($Y_{EPS/sr}$, g/g) και ενδοπολυσακχαριτών ($Y_{IPS/s}$, g/g) ως προς το καταναλωθέν σάκχαρο κατά την διάρκεια της καλλιέργειας του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* 190 υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες (120±5 rpm) στους 32±2 °C σε καλλιέργειες (α) φρουκτόζης και (β) μαλτόζης με αρχικό C/N=20. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/l και %, κ.β.) που παράχθηκαν με τη χρήση των διαφόρων πηγών άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας σε όλα τα σημεία της κινητικής των 23 ημερών (Γραφήματα III.30α,β και III.31), η οποία ήταν αξιοσημείωτη για τα υποστρώματα γλυκόζη, φρουκτόζη και άμυλο (ήτοι στις πηγές άνθρακα που έδωσαν μεγάλη παραγωγή μυκηλιακής μάζας), όπως φαίνεται και από τις μέγιστες τιμές των IPS που δίνονται και στον παραπάνω Πίνακα III.20α,β. Βλέπουμε λοιπόν, ότι η σύνθεση των IPS επηρεάστηκε κυρίως από την πηγή άνθρακα και σε μικρότερο βαθμό από την εφαρμογή της ανάδευσης (επέδρασε θετικά στη καλλιέργεια του αμύλου) και ευνοήθηκε στις στατικές καλλιέργειες από τα σάκχαρα (κατά φθίνουσα σειρά) γλυκόζη (4,23 g/l)>

φρουκτόζη (3,30 g/l) > άμυλο = ξυλόζη > σακχαρόζη = μαλτόζη. Υπό αναδεδυόμενες συνθήκες ωστόσο το άμυλο, η γλυκόζη και η φρουκτόζη έδειξαν να ευνοούν περισσότερο την παραγωγή IPS (IPS_{max} 5,20 g/l - 14^η ημέρα, 4,85 g/l - 17^η ημέρα, 3,63 g/l - 23^η ημέρα, αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν τα σάκχαρα ξυλόζη > μαλτόζη = σακχαρόζη. Μικρή επίδραση είχε ωστόσο η πηγή αζώτου στη παραγωγή των IPS υπό στατικές συνθήκες (Γράφημα III.30α), ενώ υπό αναδεδυόμενες (Γράφημα III.30β) η σύνθεση IPS έδειξε να ευνοείται περισσότερο με τη χρήση του εκχυλίσματος ζύμης (υπόστρωμα GYS) από ό,τι της πειπτόνης (υπόστρωμα GPS). Ωστόσο, με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη φάνηκε καθαρά ότι η

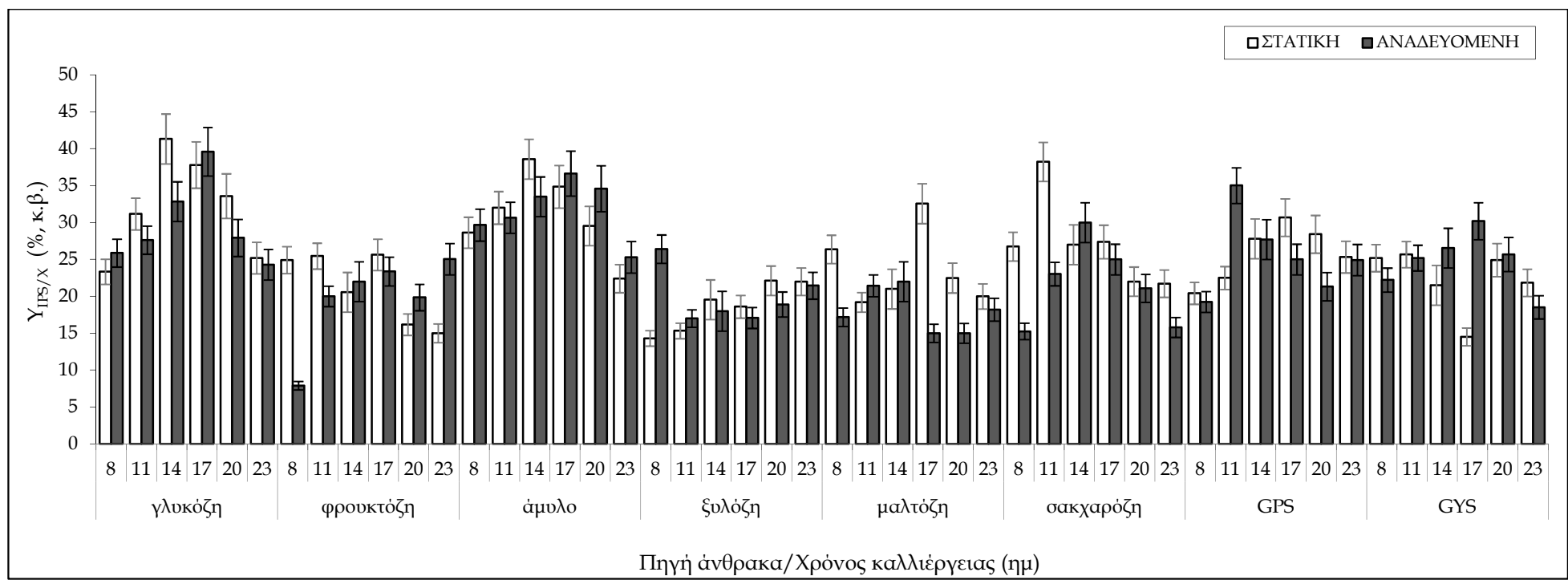


Γράφημα III.30 Επίδραση των σακχάρων γλυκόζη (υποστρώματα GPYS, GYS, GPS), φρουκτόζη, άμυλο, ξυλόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη στην παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/l) του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* σε (α) στατική και (β) αναδεδυόμενη καλλιέργεια (120±5 rpm) στους 32±2 °C

μέγιστη παραγωγή IPS επιτυγχάνεται με τον συνδυασμό εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης (υπόστρωμα GPYS). Ακόμα, η παραγωγή των μέγιστων τιμών των IPS (Πίνακας III.20α,β) καταγράφηκε στις στατικές συνθήκες την 17^η ημέρα της καλλιέργειας (με εξαίρεση τη σακχαρόζη - 11^η ημέρα), ήτοι αργότερα από αυτή των EPS. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στις αναδεδόμενες καλλιέργειες, αλλά μόνο οι μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη και ξυλόζη) έδειξαν να μεγιστοποιούν τη σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών μετά την ανάσχεση της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών. Αντίθετα, στα σάκχαρα μαλτόζη και το άμυλο η σύνθεση IPS και EPS ακολουθούν αντίθετες πορείες καθώς το μέγιστο των IPS συμπίπτει με το ελάχιστο των EPS (17^η ημέρα στη μαλτόζη) και αντίστροφα (μέγιστο EPS και ελάχιστο IPS την 23^η ημέρα στο άμυλο).

Αναφορικά με το συντελεστή απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών προς το καταναλωθέν σάκχαρο ($Y_{IPS/S}$), σύμφωνα με τα δεδομένα του παραπάνω Πίνακα III.23, είναι εμφανές ότι οι τιμές του $Y_{IPS/S}$ ήταν χαμηλές και διέφεραν λίγο ανάμεσα στα διάφορα υποστρώματα σακχάρων, τόσο στις στατικές όσο και στις αναδεδόμενες καλλιέργειες, με εξαίρεση τη μαλτόζη όπου υπήρξε σημαντικά καλύτερη εκμετάλλευση του υποστρώματος προς σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (1,19 g/g). Ωστόσο, διαπιστώνεται ότι ο συντελεστής $Y_{IPS/S}$ ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο στους μονοσακχαρίτες από ό,τι στους δισακχαρίτες. Συγκεκριμένα, ο $Y_{IPS/S}$ στις καλλιέργειες της γλυκόζης (Γράφημα III.29 α1,2), φρουκτόζης (Γράφημα III.30 α1,2) και ξυλόζης παρουσιάζει αρνητική σχέση με τον $Y_{EPS/S}$, καθώς σημειώνει σημαντική αύξηση όταν ο $Y_{EPS/S}$ μειώνεται στην πορεία της καλλιέργειας, ενώ στις αναδεδόμενες καλλιέργειες της σακχαρόζης (Γράφημα III.29 β1,2) και της μαλτόζης (Γράφημα III.30 β1,2) οι συντελεστές $Y_{IPS/S}$ και $Y_{EPS/S}$ ακολουθούν παράλληλες πορείες με τις μέγιστες τιμές τους να συμπίπτουν χρονικά κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

Σε ό,τι αφορά τη κινητική εξέλιξης των ολικών παραγόμενων IPS του μακρομύκητα *V. voluacea* ανά μονάδα βιομάζας ($Y_{IPS/X}$ %, κ.β.) υπό την επίδραση των διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου που παρουσιάζεται στο παρακάτω Γράφημα III.31, αυτή επηρεάστηκε τόσο από το είδος του σακχάρου όσο και από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης, αλλά διαφορετικά από ό,τι κατά την παραγωγή IPS σε απόλυτες τιμές (g/l). Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη τις μέγιστες τιμές αλλά και τις μέσες τιμές σε όλα τα σημεία της κινητικής, τα σάκχαρα που ευνόησαν τη συσσώρευση IPS (% κ.β.) ήταν υπό στατικές συνθήκες (κατά αύξουσα σειρά) τα εξής: γλυκόζη = άμυλο = σακχαρόζη > μαλτόζη > φρουκτόζη > ξυλόζη, ενώ υπό αναδεδόμενες γλυκόζη = άμυλο > σακχαρόζη > φρουκτόζη = ξυλόζη > μαλτόζη. Ανεξάρτητα πάντως από τη σειρά που κατέχουν τα παραπάνω σάκχαρα στη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών, η συγκέντρωση των IPS είναι πολύ υψηλή, από τις



Γράφημα III.31 Επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα (γλυκόζη, φρουκτόζη, άμυλο, ξυλόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη) στην παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS %, κ.β.) του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* σε στατική και αναδευόμενη καλλιέργεια (120±5 grm) στους 32±2 °C

υψηλότερες της βιβλιογραφίας, καθώς κυμαίνονταν στις στατικές καλλιέργειες από 25,63% (φρουκτόζη) έως 41,33% (γλυκόζη) και στις αναδεδυόμενες από 22,0% (μαλτόζη) έως 39,6% κ.β. (γλυκόζη). Ακόμα, στο υπόστρωμα GPS παράχθηκε υψηλότερο ποσοστό IPS (% κ.β.) από ό,τι στο GYS, κατ' αντιδιαστολή με την παραγωγή IPS σε απόλυτες τιμές. Επίσης, η ανάδευση ενώ γενικά δεν είχε επίδραση στην παραγωγή των IPS (% κ.β.), ευνόησε τη συσσώρευσή τους σε κάποια σημεία της αύξησης των μακρομυκήτων (π.χ. στις καλλιέργειες της γλυκόζης με πεπτόνη (GPS) ή με εκχύλισμα ζύμης (GYS), της ξυλόζης και του αμύλου.

Σε επόμενο στάδιο, έγινε ανάλυση των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών σε διάφορα σημεία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του μακρομύκητα *V. voluacea* στα υποστρώματα των σακχάρων και μετά από υδρόλυσή τους και ανίχνευση των δομικών τους μονάδων, τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα III.24α,β. Είναι εμφανές ότι τα IPS αποτελούνταν κυρίως από γλυκόζη ανεξάρτητα της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ή της εφαρμογής ανάδευσης, καθώς ανιχνεύτηκε σε ποσοστό περισσότερο από 80% κ.β. σε στατικές και αναδεδυόμενες φιάλες, με εξαίρεση τη στατική καλλιέργεια της μαλτόζης (66,7%, κ.β.) και την αναδεδυόμενη της ξυλόζης (60,4%, κ.β.), ενώ σε πολλές περιπτώσεις αποτέλεσε το μοναδικό σάκχαρο (100% σε φρουκτόζη, ξυλόζη, σακχαρόζη υπό στατικές συνθήκες και μαλτόζη, σακχαρόζη υπό αναδεδυόμενες). Δεύτερη, αλλά με σημαντικά μικρότερο ποσοστό από τη γλυκόζη ανιχνεύτηκε η φρουκτόζη στις καλλιέργειες της γλυκόζης και του αμύλου όπως και της μαλτόζης (στατική), φρουκτόζης και ξυλόζης (αναδεδυόμενη). Η συγκέντρωσή της ωστόσο διέφερε σημαντικά στα παραπάνω σάκχαρα, με τη μέγιστη συγκέντρωσή της να καταγράφεται στις στατικές καλλιέργειες στη μαλτόζη (39%), ενώ στις αναδεδυόμενες στη γλυκόζη (17%, κ.β.). Τέλος, στις καλλιέργειες της γλυκόζης και της ξυλόζης (υπό ανάδευση) ανιχνεύτηκε η σακχαρο-αλκοόλη μαννιτόλη, στη δε περίπτωση της ξυλόζης σε σημαντική ποσότητα (39%, κ.β.).

Επίσης, η ανάλυση σε σάκχαρα των παραγόμενων IPS παρουσίασε (ενίοτε αξιοσημείωτες) διαφοροποιήσεις όταν αυτός ο υδατάνθρακας χρησιμοποιήθηκε ως υλικό εκκίνησης της ζύμωσης και με μόνη διαφορά την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης (π.χ. βλ. περίπτωση της ξυλόζης και της μαλτόζης ή ακόμα και του αμύλου). Τέλος, σε συνάφεια με τα αποτελέσματα τα οποία αναφέρθηκαν στα προηγούμενα εδάφια, υπήρξε «κινητικότητα» των ενδοκυτταρικών μονοσακχαριτών ή σακχαρο-αλκοολών τα οποία συνιστούσαν τις δομές των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις η σύσταση σε συνολικά απλά σάκχαρα των πολυσακχαριτών μεταβαλλόταν σε συνάρτηση με το χρόνο (π.χ. βλ. περίπτωση των καλλιεργειών στο άμυλο, τη γλυκόζη και τη μαλτόζη κατά τις στατικές καλλιέργειες ή την αντίστοιχη στη γλυκόζη ή την ξυλόζη στις αναδεδυόμενες).

Πίνακας III.24α Σύσταση των ολικών ενδοσακχαριτών σε απλά σάκχαρα κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* AMRL 190 σε θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων (αρχικός C/N=20), υπό στατικές συνθήκες, σε θερμοκρασία 32±2 °C για 23 ημέρες. Το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων (-: δεν ανιχνεύθηκε)

Στατική/ Είδος σακχάρου	Χρόνος (ημ)	Σάκχαρα (% κ.β. των ολικών ενδοσακχαριτών)		
		Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαννιτόλη
γλυκόζη	8 ^η	95,0	-	5,0
	11 ^η	98,0	-	2,0
	14 ^η	80,6	19,4	-
	17 ^η	83,0	17,0	-
	20 ^ή	83,3	16,7	-
	23 ^η	85,0	15,0	-
φρουκτόζη	8 ^η	100,0	-	-
	11 ^η	100,0	-	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^ή	100,0	-	-
	23 ^η	100,0	-	-
άμυλο	8 ^η	85,5	14,5	-
	11 ^η	87,0	13,0	-
	14 ^η	83,4	16,6	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^ή	100,0	-	-
	23 ^η	100,0	-	-
ξυλόζη	8 ^η	100,0	-	-
	11 ^η	100,0	-	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^ή	100,0	-	-
	23 ^η	100,0	-	-
μαλτόζη	8 ^η	99,5	0,5	-
	11 ^η	100,0	-	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^ή	66,7	33,3	-
	23 ^η	75,0	25,0	-
σακχαρόζη	8 ^η	100,0	-	-
	11 ^η	100,0	-	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^ή	100,0	-	-
	23 ^η	100,0	-	-

Πίνακας III.24β Σύσταση των ολικών ενδοσακχαριτών σε απλά σάκχαρα κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* AMRL 190 σε θρεπτικά μέσα διαφόρων σακχάρων (αρχικός C/N=20), υπό αναδεδυόμενες (120±5 g/m) συνθήκες, σε θερμοκρασία 32±2 °C για 23 ημέρες. Το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος δύο ανεξαρτήτων πειραμάτων (-: δεν ανιχνεύθηκε)

Αναδεδυόμενη/ Είδος σακχάρου	Χρόνος (ημ)	Σάκχαρα (% κ.β. των ολικών ενδοσακχαριτών)		
		Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαννιτόλη
γλυκόζη	8 ^η	98,0	-	2,0
	11 ^η	95,4	-	4,6
	14 ^η	85,6	14,4	-
	17 ^η	84,3	15,7	-
	20 ^η	83,1	16,9	-
	23 ^η	85,0	15,0	-
φρουκτόζη	8 ^η	92,9	7,1	-
	11 ^η	99,7	0,3	-
	14 ^η	98,0	2,0	-
	17 ^η	96,5	3,5	-
	20 ^η	96,0	4,0	-
	23 ^η	95,5	4,5	-
άμυλο	8 ^η	98,6	1,4	-
	11 ^η	98,0	2,0	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^η	99,9	0,1	-
	23 ^η	100,0	-	-
ξυλόζη	8 ^η	60,4	0,7	38,9
	11 ^η	92,0	1,0	7,0
	14 ^η	98,1	1,9	-
	17 ^η	99,0	1,0	-
	20 ^η	99,2	0,8	-
	23 ^η	99,0	1,0	-
μαλτόζη	8 ^η	100,0	-	-
	11 ^η	100,0	-	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^η	100,0	-	-
	23 ^η	100,0	-	-
σακχαρόζη	8 ^η	100,0	-	-
	11 ^η	100,0	-	-
	14 ^η	100,0	-	-
	17 ^η	100,0	-	-
	20 ^η	100,0	-	-
	23 ^η	100,0	-	-

III.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ (ΜΕΤΑΒΑΛΟΜΕΝΟΣ ΛΟΓΟΣ C/N) ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ *V. VOLVACEA* AMRL 190 ΣΕ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΖΩΤΟΥ

Στα προηγούμενα εδάφια δειχθηκε η δυναμική στελεχών του μακρομύκητα *V. volvacea* να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη παραγωγή μυκηλιακής μάζας κατά την καλλιέργειά τους σε υγρού τύπου ζυμώσεις. Ειδικότερα, το στέλεχος AMRL 190 παρουσίασε αξιοσημείωτη μυκηλιακή αύξηση τόσο σε αναδευόμενες όσο και σε στατικές υγρές καλλιέργειες όπου ποικίλα σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, άμυλο, κ.λ.π.) χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά εκκίνησης των ζυμώσεων, ενώ μελετήθηκε και η παραγωγή ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών στις ανωτέρω καλλιέργειες. Επίσης, αναλύθηκαν εκτενώς τα ενδοκυτταρικά παραγόμενα λιπίδια του στελέχους AMRL 190 κατά τις διάφορες καλλιέργειές του στις διάφορες πηγές άνθρακα, δείχνοντας μια σχετική διαφοροποίηση στη σύσταση σε ΛΟ των παραγόμενων κυτταρικών λιπιδίων, παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων τα χρησιμοποιούμενα ως υποστρώματα σάκχαρα παρουσίαζαν πολύ μεγάλη βιοχημική ομοιότητα μεταξύ τους (π.χ. μεγάλη βιοχημική ομοιότητα στον κυτταρικό μεταβολισμό της γλυκόζης, της φρουκτόζης και του αμύλου). Σε σχέση με τους τυπικούς εδωδιμους μύκητες, πάντως, διαφοροποιήσεις στη σύσταση σε ΛΟ αναφέρθηκαν για τις περισσότερες από τις καλλιέργειες (π.χ. μη-αμελητέα παρουσία κορεσμένων μικρής ή μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας ΛΟ π.χ. C8:0, C10:0, C12:0 και C20:0 στα λιπίδια τους). Δεδομένου του γεγονότος ότι το στέλεχος *V. volvacea* AMRL 190 κατά την αύξησή του στη γλυκόζη παρουσίασε (στις περισσότερες περιπτώσεις) μεγαλύτερες αποδόσεις παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και πολυσακχαριτών σε σχέση με τα λοιπά σακχαρούχα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά εκκίνησης των ζυμώσεων, ενώ η εφαρμογή ανάδευσης είχε ως αποτέλεσμα το γεγονός ότι το μέγιστο παραγόμενο λίπος επί ξηράς ουσίας ($Y_{L/X_{max}}$, % κ.β.), ήταν σχεδόν διπλάσιο σε σχέση με τις μη-αναδευόμενες καλλιέργειες, στο παρόν εδάφιο μελετήθηκε εκτενώς η επίδραση της αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης κατά την αύξηση του στελέχους AMRL 190 σε αναδευόμενες καλλιέργειες με σταθερή αρχική συγκέντρωση αζώτου. Κατ' αυτό τον τρόπο, συνεπώς, μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού λόγου C/N (20, 30, 40, 60) στη βιο-κινητική και φυσιολογική συμπεριφορά του εν λόγω μικροοργανισμού. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε αναδευόμενες φιάλες χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο GPYS στο οποίο, ενώ όλα τα συστατικά του (και φυσικά το άζωτο) παρέμεναν σε σταθερές αρχικές συγκεντρώσεις, η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξανόταν (αρχικές τιμές

μεταξύ 30,0 και 95,0 g/l) και άρα οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αξιοσημείωτα περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Στον Πίνακα III.25 παρατίθενται τα συνοπτικά κινητικά δεδομένα της καλλιέργειας του μακρομύκητα *V. voluacea* AMRL 190 στα σημεία της κινητικής όπου (α) σημείωσε τη μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας ($Y_{L/X}$, % κ.β.), (β) την μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας ($Y_{IPS/X}$, % κ.β.) και (γ) τη μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l) κατά την αύξησή του σε αναδεδόμενες καλλιέργειες με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης.

Με βάση τα δεδομένα τα οποία ελήφθησαν από τις τέσσερις καλλιέργειες διαφορετικής αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, παρατηρείται ότι σε κάθε περίπτωση έλαβε

Πίνακας III.25 Κινητική του μικροοργανισμού *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε υγρή καλλιέργεια (θρεπτικό μέσο GPYS) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη σε ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις ($Glc_0=30,0-95,4$ g/l) υπό αναδεδόμενες συνθήκες (120 ± 5 rpm) και θερμοκρασία 32 ± 2 °C

Αρχικός λόγος C/N	Glc_0 (g/l)		Χρόνος (ημ)	X (g/l)	Glc_c (g/l)	L (g/l)	IPS (g/l)	$Y_{L/X}$ (% κ.β.)	$Y_{IPS/X}$ (% κ.β.)
20	30,0	α	11 ^η	8,1	8,6	1,03	3,02	12,7	37,2
		β,γ	17 ^η	14,0	22,7	0,67	5,60	4,8	40,0
30	45,8	α	8 ^η	3,6	13,0	0,65	1,14	18,0	31,7
		β,γ	17 ^η	16,6	33,9	0,70	6,89	4,2	41,5
40	62,4	α	8 ^η	2,1	17,8	0,62	0,96	29,3	45,8
		β,γ	23 ^η	16,7	52,3	0,53	8,32	3,2	50,12
60	95,4	α	8 ^η	1,8	9,7	0,52	0,83	30,7	46,2
		β,γ	23 ^η	21,4	75,0	0,34	12,23	1,6	56,6

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

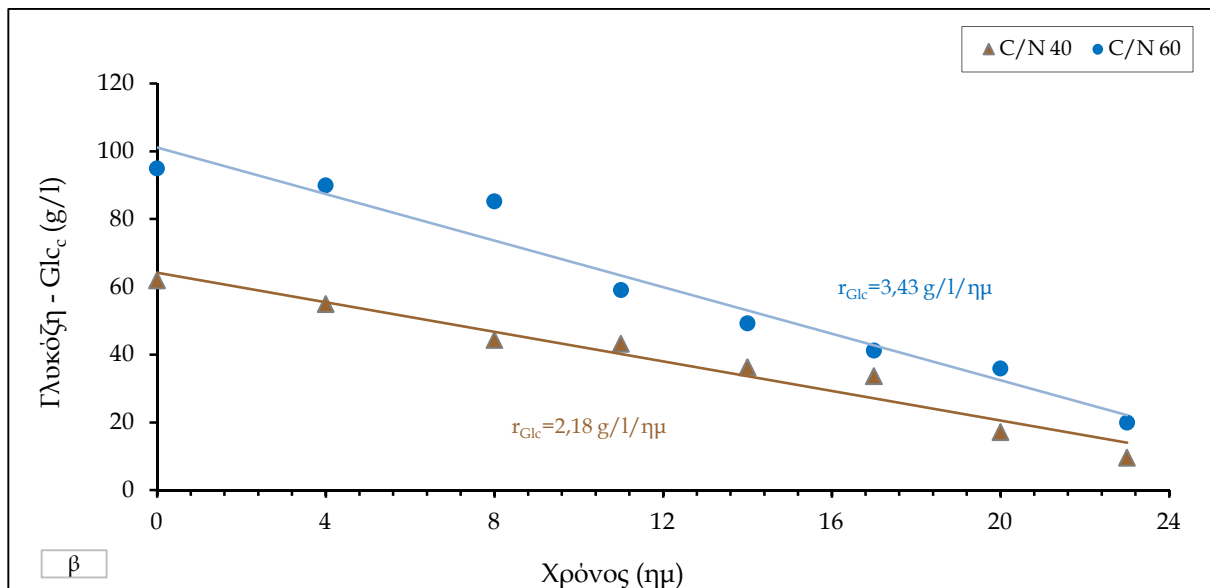
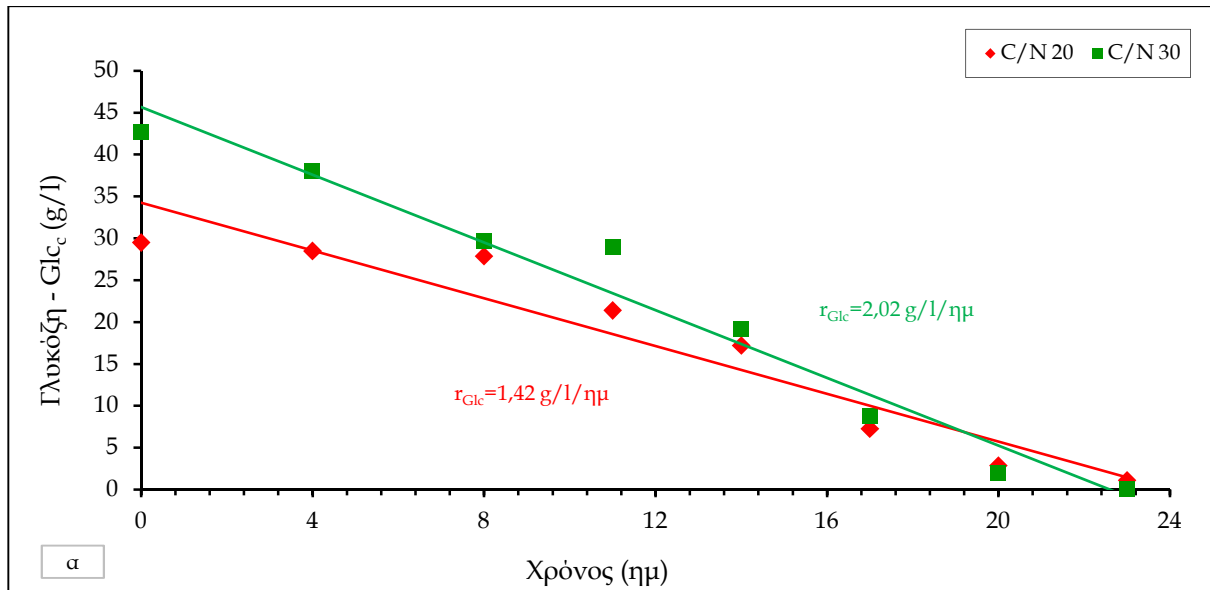
X: η παραγόμενη βιομάζα (g/l), L: το παραγόμενο λίπος (g/l), Glc_0 : η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης (g/l), Glc_c : η καταναλωθείσα συγκέντρωση της γλυκόζης (g/l), IPS: οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/l), $Y_{L/X}$: το ποσοστό συνολικού λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.), $Y_{IPS/X}$: το ποσοστό συνολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (% κ.β.)

α: μέγιστη παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας (σε % κ.β.)

β: μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών - IPS (σε g/l)

γ: μέγιστη τιμή βιομάζας - X_{max} (g/l)

χώρα αξιοσημείωτη κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή μυκηλιακής μάζας. Έτσι, ειδικά η συγκέντρωση βιομάζας (X , g/l) αυξανόταν με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, ξεκινώντας από 14 g/l σε $Glc_0=30$ g/l ($C/N=20$) και φτάνοντας μέγιστη τελική τιμή τα 21,4 g/l για $Glc_0=95,4$ g/l ($C/N=60$). Ωστόσο, ο χρόνος παραγωγής της X_{max} διέφερε στους διάφορους λόγους C/N , καθώς η μέγιστη τιμή βιομάζας (αν και μικρότερη) εμφανίστηκε αρκετά νωρίτερα (17^η ημέρα) στους χαμηλότερους λόγους 20 και 30 από ό,τι στους υψηλότερους 40 και 60. Επίσης, η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν πολύ υψηλή, ιδιαίτερα στις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης ($C/N=20$ και 30) όπου έφτασε στο τέλος της ζύμωσης το 100%, αλλά και σε $C/N=40$ και 60 η κατανάλωση ήταν ~80-85%. Ακόμα, ο υπολογισμός του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς την αναλωθείσα γλυκόζη ($Y_{X/Glc} = \frac{X - X_0}{Glc}$) για τα διάφορα σημεία των πραγματοποιηθεισών καλλιεργειών έδειξε ότι όσο αυξανόταν η Glc_0 τόσο μειωνόταν ο συντελεστής $Y_{X/Glc}$. Παράδειγμα, για την καλλιέργεια με $Glc_0=30$ g/l, η τιμή του συντελεστή απόδοσης ήταν ~0,55-0,60 g/g, ενώ για την καλλιέργεια με $Glc_0=45,8$ g/l, η αντίστοιχη τιμή του συντελεστή $Y_{X/Glc}$ ήταν ~0,45-0,49 g/g. Περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης (62,4 g/l) είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση του συντελεστή $Y_{X/Glc}$ στην τιμή ~0,30-0,33 g/g. Τέλος, αύξηση του μακρομόκητα σε αρχική τιμή γλυκόζης 95,4 g/l, είχε ως απόρροια περαιτέρω μείωση του $Y_{X/Glc}$ στην τιμή ~0,27-0,29 g/g. Από την άλλη πλευρά, η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν σχεδόν γραμμική (Γράφημα III.32α,β), με την ταχύτητα κατανάλωσης γλυκόζης r_{Glc} (σε g/l/ημ, η οποία προσδιορίστηκε με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην ευθεία από τον τύπο $r_{Glc} = -\frac{\Delta Glc}{\Delta t}$) να αυξάνει με την αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης από 1,42 g/l/ημ ($C/N=20$) σε 3,43 g/l/ημ ($C/N=60$).

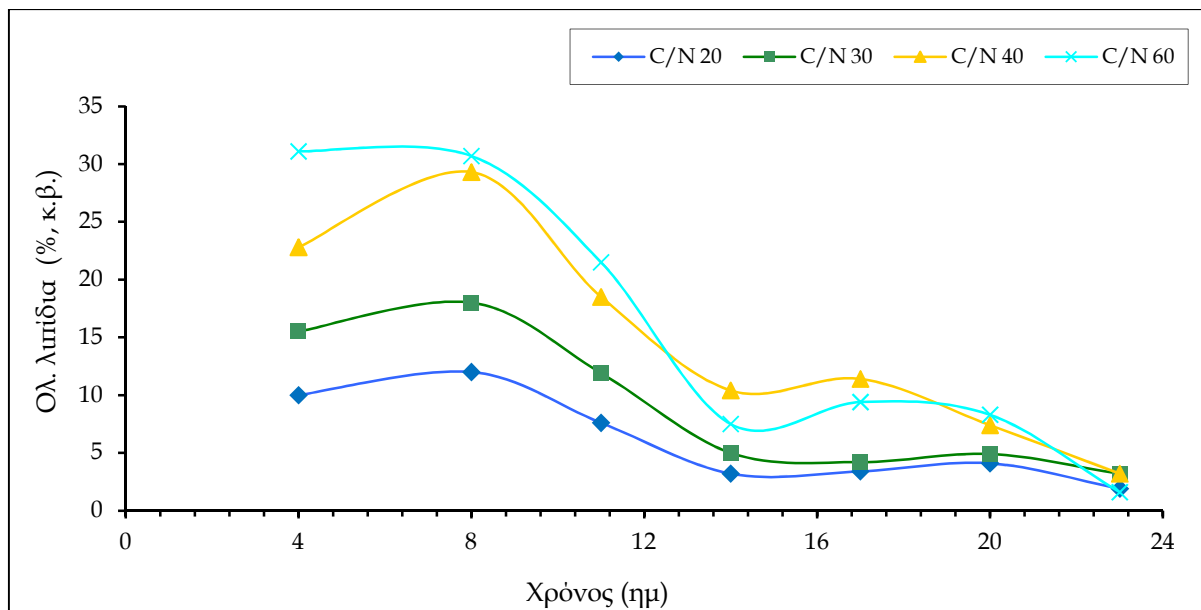


Γράφημα III.32α,β Κινητική εξέλιξης της γλυκόζης κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* AMRL 190 σε θρεπτικό μέσο GPYS με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης [(α) C/N=20, 30, (β) C/N=40, 60] υπό ανάδευση (120 ± 5 rpm), σε θερμοκρασία 32 ± 2 °C. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

Σε ό,τι αφορά τη βιοσύνθεση λιπιδίων από τον *V. volvacea* AMRL 190, όπως φαίνεται και από τα δεδομένα του παραπάνω Πίνακα III.25, η αύξηση του λόγου C/N συνοδεύτηκε με αύξηση στην παραγωγή λίπους επί ξηράς ουσίας ($Y_{L/X}$, % κ.β.). Μάλιστα, στους λόγους C/N=40 και 60 ανιχνεύτηκαν ποσότητες λιπιδίων επί ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/X}$) μέχρι και 30%, κ.β., τιμές οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν ιδιαίτερα υψηλές δεδομένου ότι ο *V. volvacea* είναι εδώδιμος μύκητας - μη ελαιογόνος μικροοργανισμός (ελαιογόνος

μικροοργανισμός θεωρείται όταν συσσωρεύει λιπίδια το κατώτατο όριο των οποίων είναι το 20% κ.β. - Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Η κινητική εξέλιξη των ολικών κυτταρικών λιπιδίων επί ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{L/x}$, %, κ.β.) κατά την αύξηση του μακρομύκητα *V. voluacea* σε υγρές καλλιέργειες με υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη που παρουσίαζαν αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N παρουσιάζεται στο Γράφημα III.33. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και το γεγονός ότι το ποσοστό λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας εμφανίστηκε ιδιαίτερα αυξημένο στα σχετικά πρώιμα στάδια της μικροβιακής αύξησης (4-10 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό) με σημαντική μείωση κατόπιν, χωρίς η μείωση αυτή να συνάδει με αντίστοιχη μείωση της γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης (αντίστοιχου τύπου αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για άλλους ανώτερους ασκομύκητες ή βασιδιομύκητες κατά την υγρή καλλιέργειά τους σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη - βλ. κεφάλαιο III.3).

Περαιτέρω, έπειτα από τον υπολογισμό του ολικού παραχθέντος ενδοκυτταρικού λίπους στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, ακολούθησε η μελέτη της σύστασης αυτού σε ΛΟ για τις διάφορες φάσεις του αυξητικού κύκλου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στον Πίνακα III.26. Η ανάλυση σε ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων του



Γράφημα III.33 Κινητική εξέλιξη των ολικών λιπιδίων επί ξηράς μάζας κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε θρεπτικό μέσο GPYS με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20, 30, 40, 60) υπό ανάδευση (120 ± 5 rpm), σε θερμοκρασία 32 ± 1 °C. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

μακρομόκητα *V. vulnacea* AMRL 190 εν πολλοίς επιβεβαιώνει τα ευρήματα του κεφαλαίου III.4. Υπάρχουν όμως και σημαντικές διαφοροποιήσεις στη σύσταση σε ΛΟ, οι οποίες προφανώς οφείλονται στην αύξηση του μύκητα σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (και συνεπώς σε αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N). Όπως και στην περίπτωση του κεφαλαίου III.4, το ΛΟ που ανιχνεύτηκε στις μεγαλύτερες ποσότητες ήταν το λινελαϊκό ($\Delta^9,12\text{C}18:2$). Ωστόσο, η συγκέντρωσή του παρουσίασε αυξομειώσεις σε σχέση με το χρόνο ζύμωσης, ενώ γενικά αυξανόταν αξιοσημείωτα με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας (από ~46,0% σε ~65%, κ.β.). Περαιτέρω, στη δεύτερη θέση αλλά με σημαντική διαφορά σε σχέση με το λινελαϊκό οξύ, ανιχνεύτηκε το παλμιτικό οξύ (C16:0), του οποίου η συγκέντρωση έδειχνε να παρουσιάζει μια αυξητική τάση σε σχέση με το χρόνο καλλιέργειας (από ~13,0% σε ~29%, κ.β.) και μια (μικρή) μείωση σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο μέσο αύξησης. Σε αξιοσημείωτα χαμηλά ποσά κυμάνθηκε το ελαϊκό οξύ ($\Delta^9\text{C}18:1$) ανεξαρτήτως του χρόνου ζύμωσης και της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης που εφαρμόστηκε στο μέσο καλλιέργειας (<3,0%, κ.β.), καθώς σε αρκετές περιπτώσεις δεν ανιχνεύτηκε καν στα κυτταρικά λιπίδια. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το ελαϊκό οξύ βρέθηκε το στεατικό οξύ (C18:0), του οποίου η συγκέντρωση έβαινε αυξανόμενη σε σχέση με το χρόνο ζύμωσης και κυρίως με την αύξηση της γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας (από ~5,0% σε ~14% κ.β.). Ειδικά στην τελευταία περίπτωση και για τα τελικά σημεία της καλλιέργειας (20^η και 23^η ημέρα μετά από τον εμβολιασμό), αξιοσημείωτες ποσότητες (>10%, κ.β.) ανιχνεύτηκαν στα κυτταρικά λιπίδια του μικροοργανισμού. Τέλος, επιβεβαιώθηκαν τα προηγούμενα ευρήματα (Πίνακας III.17) σε σχέση με την ύπαρξη σε μη-αμελητέες ποσότητες κορεσμένων ΛΟ μικρής και μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (π.χ. C8:0, C10:0 και C20:0) επί των κυτταρικών λιπιδίων του μακρομύκητα, των οποίων πάντως η συγκέντρωση μειωνόταν αξιοσημείωτα (από 18% έως και 2,3% κ.β.) με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας. Επίσης, στις σχετικά υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (π.χ. Glc₀~62 και 95 g/l), υπήρξε σαφής τάση μείωσης των προαναφερθέντων αυτών ΛΟ, όσο η καλλιέργεια προχωρούσε προς το τέλος της.

Πίνακας III.26 Κινητική εξέλιξης της σύστασης σε λιπαρά οξέα (% κ.β.) των κυτταρικών λιπιδίων του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* 190 σε υγρή καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20, 30, 40, 60) υπό ανάδευση (120±5rpm), σε θερμοκρασία 32±2 °C

		Ολικά λιπαρά οξέα (% κ.β.)				
		8η	11η	17η	20η	23η
	Χρόνος (ημ)					
Glc ₀ =30 g/l C/N=20	C12:0	3,0	2,0	1,5	2,4	1,9
	C14:0	4,6	3,0	1,3	2,1	1,0
	C16:0	15,9	16,0	23,2	23,0	28,7
	C18:0	8,9	8,0	4,7	6,1	6,1
	Δ ⁹ C18:1	ίχνη*	1,5	3,0	1,5	4,5
	Δ ^{9,12} C18:2	48,3	47,1	46,1	46,3	39,8
	Λοιπά**	19,3	22,4	20,2	18,6	18,0
Glc ₀ =42,7 g/l C/N=30	C12:0	4,0	3,9	2,4	4,9	3,4
	C14:0	4,0	1,7	1,8	2,4	2,3
	C16:0	13,0	17,7	18,5	18,6	16,3
	C18:0	3,0	6,1	5,1	6,0	4,6
	Δ ⁹ C18:1	1,00	ίχνη	1,0	1,6	1,0
	Δ ^{9,12} C18:2	50,0	53,2	50,8	48,4	54,5
	Λοιπά	25,0	17,4	20,4	18,1	17,9
Glc ₀ =62 g/l C/N=40	C12:0	1,0	1,5	2,0	0,5	2,9
	C14:0	1,0	1,0	1,5	1,5	ίχνη
	C16:0	15,0	15,0	19,1	22,0	18,6
	C18:0	2,0	3,0	6,2	6,3	5,8
	Δ ⁹ C18:1	ίχνη	ίχνη	ίχνη	3,6	ίχνη
	Δ ^{9,12} C18:2	65,0	63,0	60,0	61,3	67,5
	Λοιπά	16,0	16,5	11,2	4,8	5,2
Glc ₀ =95,4 g/l C/N=60	C12:0	1,7	1,5	4,8	ίχνη	ίχνη
	C14:0	0,7	1,5	1,5	ίχνη	1,0
	C16:0	15,6	14,1	20,0	19,9	23,5
	C18:0	2,5	1,5	4,1	11,2	14,2
	Δ ⁹ C18:1	4,7	2,0	4,2	1,0	ίχνη
	Δ ^{9,12} C18:2	65,7	64,2	55,0	64,9	59,0
	Λοιπά	9,1	15,2	10,4	3,0	2,3

*Ίχνη: <0,4%, **: Λοιπά ΛΟ: κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0 και C20:0

Όπως και στα προηγούμενα εδάφια, επιζητήθηκε να αποκτηθεί μια πιο σφαιρική γνώση για τη μελέτη των λιπιδίων του μακρομύκητα *V. voluacea*. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των μικροβιακών λιπιδίων του και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους κλασμάτων (NL, G+S και PL) για τα αρχικά και τα τελικά σημεία της ζύμωσης (8^η και 20^η ημέρα μετά από τον εμβολιασμό), ο οποίος εμφανίζεται στον Πίνακα III.27. Τα αποτελέσματα της κλασμάτωσης και του ποσοτικού προσδιορισμού των κλασμάτων των μικροβιακών λιπιδίων του μύκητα *V. voluacea* επιβεβαίωσαν τα δεδομένα του κεφαλαίου III.4 για τις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20). Ειδικότερα, την 8^η ημέρα προσδιορισμού του ποσοστού των κλασμάτων παρατηρήθηκε επικράτηση του κλάσματος των NL σε όλες τις καλλιέργειες, ακολούθησαν τα G+S με ποσοστό σχεδόν το μισό από αυτό των NL (περίπου 30% σε όλες τις καλλιέργειες), ενώ τα PL κατατάχθηκαν τρίτα με πολύ μικρά ποσοστά (3-2%, κ.β.). Την 20^η ημέρα καλλιέργειας, επικρατέστερο ήταν πάλι το κλάσμα των NL με ποσοστά πάντως σημαντικά μειωμένα σε σχέση με την 8^η μέρα της ζύμωσης, ενώ στη δεύτερη θέση ακολούθησαν τα G+S με ελάχιστη διαφορά από τα ουδέτερα λιπίδια. Τέλος, τα PL ανιχνεύτηκαν πάλι σε πολύ μικρά ποσοστά (2,2-4,5%, κ.β.). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της αρχικής αυξανόμενης συγκέντρωσης γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας στα ποσοστά των NL και G+S, σε αντίθεση με τα PL όπου παρατηρήθηκε μείωσή τους, κυρίως την 20^η ημέρα της ζύμωσης (από 4,5% σε 1,5%, κ.β.).

Πίνακας III.27 Κλάσματα των κυτταρικών λιπιδίων (% κ.β. των ολικών λιπιδίων) του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 κατά την αύξησή του σε θρεπτικό μέσο GPYS με αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20, 30, 40, 60) υπό ανάδευση (120±5 rpm), σε θερμοκρασία 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 8^η και 20^η ημέρα

Χρόνος (ημ)	Λιπιδιακά κλάσματα	Ποσοστό (% κ.β.)			
		C/N=20	C/N=30	C/N=40	C/N=60
8 ^η	NL	64,4	65,1	67,3	68,0
	G+S	32,6	30,6	30,7	30,0
	PL	3,0	2,3	2,0	2,0
20 ^η	NL	49,7	52,3	55,6	56,5
	G+S	45,8	44,2	42,2	42,0
	PL	4,5	3,5	2,2	1,5

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων μετρήσεων

Σύμβολα: NL - ουδέτερα λιπίδια, G+S - γλυκολιπίδια και σφιγκολιπίδια, PL - φωσφολιπίδια

Επιπρόσθετα, μετά τον προσδιορισμό της ποσότητας των τριών κλασμάτων του ενδοκυτταρικού λίπους του *V. voluacea* AMRL 190, ακολούθησε ανάλυση της σύστασης αυτών σε ΛΟ σε δύο σημεία της κινητικής (8^η-αρχή, 20^η-τέλος), τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στον Πίνακα III.28. Αναλύοντας τα αποτελέσματα τόσο της 8^{ης} όσο και της 20^{ης} ημέρας παρατηρείται παρόμοια σύσταση των λιπιδίων σε ΛΟ στις καλλιέργειες και με τους τέσσερις διαφορετικούς λόγους C/N. Το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}\text{C18:2}$) ήταν αυτό που παράχθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα, με το μεγαλύτερο ποσοστό του να εντοπίζεται στο κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων και να αυξάνεται (έως 77,3% κ.β.) όταν η ποσότητα γλυκόζης στην καλλιέργεια αυξήθηκε στα ~95 g/l. Υψηλό ήταν το ποσοστό του $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ και στα άλλα δυο λιπιδιακά κλάσματα (G+S, PL), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξησή του στο κλάσμα των PL στο υπόστρωμα με την υψηλότερη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($\text{Gl}_0=95,4$ g/l, C/N=60). Ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (C16:0) του οποίου το μέγιστο ποσοστό εντοπίστηκε στο κλάσμα των G+S (~17 έως ~33%, κ.β.) και το οποίο αυξάνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης ($\text{Gl}_0\sim 43-95$ g/l - C/N=30-60). Σε ακόμα μικρότερες ποσότητες ακολούθησε το στεατικό οξύ (C18:0) με την μέγιστη ποσότητα να εντοπίζεται στο κλάσμα των PL (5,0-15%, κ.β.) για όλες τις καλλιέργειες, μόνο που στην περίπτωση αυτή το λιπαρό οξύ μειωνόταν στους λόγους C/N=30 και 60. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα εντοπίστηκαν σε μικρές ποσότητες στα τρία κλάσματα κάθε καλλιέργειας, ενώ προσδιορίστηκαν και σημαντικές ποσότητες (έως 25,5% κ.β.) από κορεσμένα ΛΟ μικρής και μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (π.χ. C8:0, C10:0 και C20:0), τα οποία στην πλειονότητά τους μειώνονταν με τον χρόνο ζύμωσης.

Ακόμα, ο προσδιορισμός του δείκτη ακορεστότητας (U.I.) των λιπαρών οξέων των λιπιδιακών κλασμάτων (Πίνακας III.29) δεικνύει ότι τα περισσότερα κορεσμένα λιπίδια παράχθηκαν στο λόγο C/N=20, όπως και ότι από τα τρία κλάσματα, το πιο κορεσμένο ήταν αυτό των PL. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης (C/N=60) αυξήθηκε η ακορεστότητα του κλάσματος των PL (U.I.=1,1-1,23), με αντίστοιχη μείωση της ακορεστότητας του κλάσματος των NL. Σε κάθε καλλιέργεια, ωστόσο, το περισσότερο ακόρεστο κλάσμα ήταν αυτό των NL.

Πίνακας III.28 Σύσταση σε λιπαρά οξέα (% κ.β.) των ολικών λιπιδίων (TL), των ουδετέρων λιπιδίων (NL), των γλυκολιπιδίων και σφιγκολιπιδίων (G+S) και των φωσφολιπιδίων (PL) του *Volvariella volvacea* AMRL 190 σε υγρή καλλιέργεια (χρήση GPYS μέσου) με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη σε ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις (C/N=20, 30, 40, 60), υπό αναδευόμενες συνθήκες (120±5 rpm) στους 32± 2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 8^η και 20^η ημέρα

Χρόνος (ημ)	Λιπαρά οξέα (%, κ.β.)	C/N=20				C/N=30				C/N=40				C/N=60			
		TL	NL	G+S	PL	TL	NL	G+S	PL	TL	NL	G+S	PL	TL	NL	G+S	PL
8 ^η	C12:0	3,0	1,5	2,5	4,0	4,0	2,2	3,0	5,5	1,0	ιχνη*	ιχνη	1,5	1,7	ιχνη	1,0	2,0
	C14:0	4,6	1,5	2,0	5,0	4,0	2,0	3,1	6,0	1,0	0,5	ιχνη	1,5	0,7	ιχνη	1,0	1,0
	C16:0	15,9	15,0	26,0	18,0	13,0	10,3	17,5	15,0	15,0	14,5	31,6	25,0	15,6	5,2	33,0	16,1
	C18:0	8,9	7,2	8,0	11,0	3,0	2,1	2,0	5,0	2,0	1,5	4,0	10,7	2,5	ιχνη	1,5	5,0
	^{Δ9} C18:1	ιχνη	ιχνη	ιχνη	ιχνη	1,00	2,1	1,5	ιχνη	ιχνη	ιχνη	ιχνη	ιχνη	4,7	5,0	ιχνη	3,0
	^{Δ9,12} C18:2	48,3	56,0	54,0	39,5	50,0	65,0	55,0	43,0	65,0	69,1	59,0	45,2	65,7	77,3	52,0	60,0
	Λοιπά**	19,3	18,8	7,5	22,5	25,0	16,3	17,9	25,5	16,0	14,4	5,4	16,1	9,1	12,5	11,5	12,9
20 ^η	C12:0	2,4	1,5	1,0	5,0	4,9	ιχνη	0,5	4,1	0,5	ιχνη	0,5	2,0	ιχνη	1,0	1,0	ιχνη
	C14:0	2,1	0,5	ιχνη	5,0	2,4	ιχνη	1,0	3,0	1,5	0,7	0,5	2,0	ιχνη	1,0	1,0	2,0
	C16:0	23,0	13,5	39,0	25,6	18,6	14,2	31,0	15,0	22,0	20,8	35,4	23,0	19,9	19,5	33,1	21,0
	C18:0	6,1	5,5	3,1	10,5	6,0	4,0	6,0	6,0	6,3	ιχνη	1,5	15,3	11,2	9,6	3,0	15,0
	^{Δ9} C18:1	1,5	ιχνη	ιχνη	ιχνη	1,6	ιχνη	2,0	2,5	3,6	2,5	1,5	8,0	1,0	ιχνη	ιχνη	ιχνη
	^{Δ9,12} C18:2	46,3	64,0	50,4	31,8	48,4	68,0	54,0	46,3	61,3	66,2	52,3	39,0	64,9	68,0	53,2	55,5
	Λοιπά	18,6	8,0	6,5	22,1	18,1	13,8	5,5	23,1	4,8	9,8	8,3	8,7	3,0	0,9	8,7	6,5

*Ιχνη: <0,2%, **: Λοιπά ΛΟ: κυρίως αποτελούνται από C8:0, C10:0 και C20:0

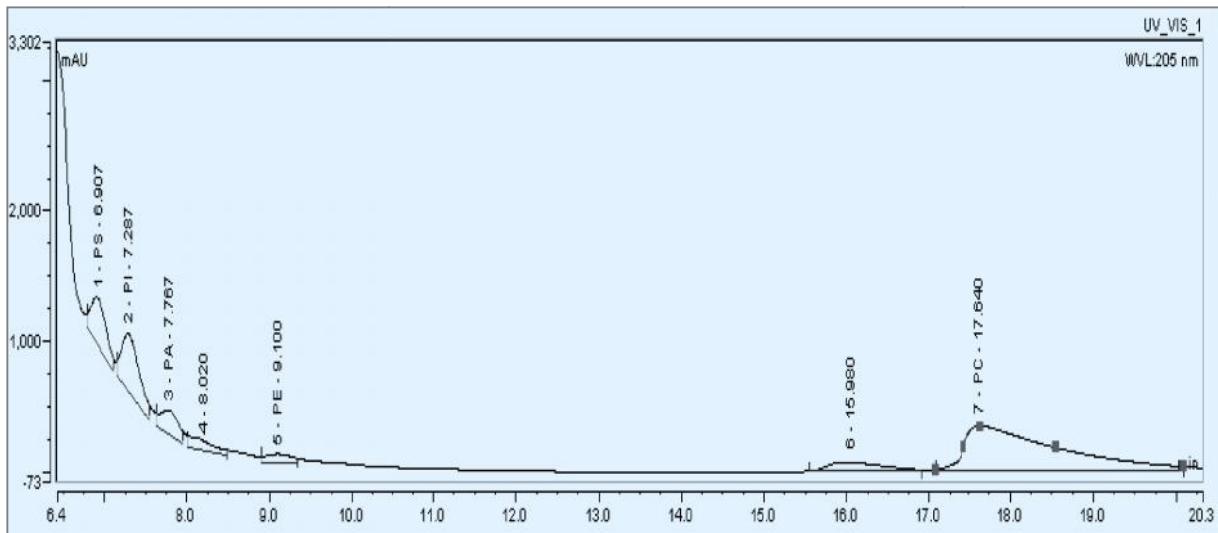
Πίνακας III.29 Δείκτης ακορεσιτότητας (U.I.) των λιπαρών οξέων των κλασμάτων του μακρομόκητα *Volvariella volvacea* AMRL 190 κατά την αύξησή του σε θρεπτικό μέσο GPYS με αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20, 30, 40, 60) υπό ανάδευση (120±5 rpm), σε θερμοκρασία 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 8^η και 20^η ημέρα

Χρόνος (ημ)	Λιπιδιακά κλάσματα	U.I.			
		C/N=20	C/N=30	C/N=40	C/N=60
8 ^η	NL	1,12	1,32	1,38	1,60
	G+S	1,08	1,12	1,18	1,04
	PL	0,79	0,86	0,90	1,23
20 ^η	NL	1,28	1,36	1,35	1,36
	G+S	1,01	1,10	1,06	1,06
	PL	0,64	0,95	0,86	1,11

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων μετρήσεων.

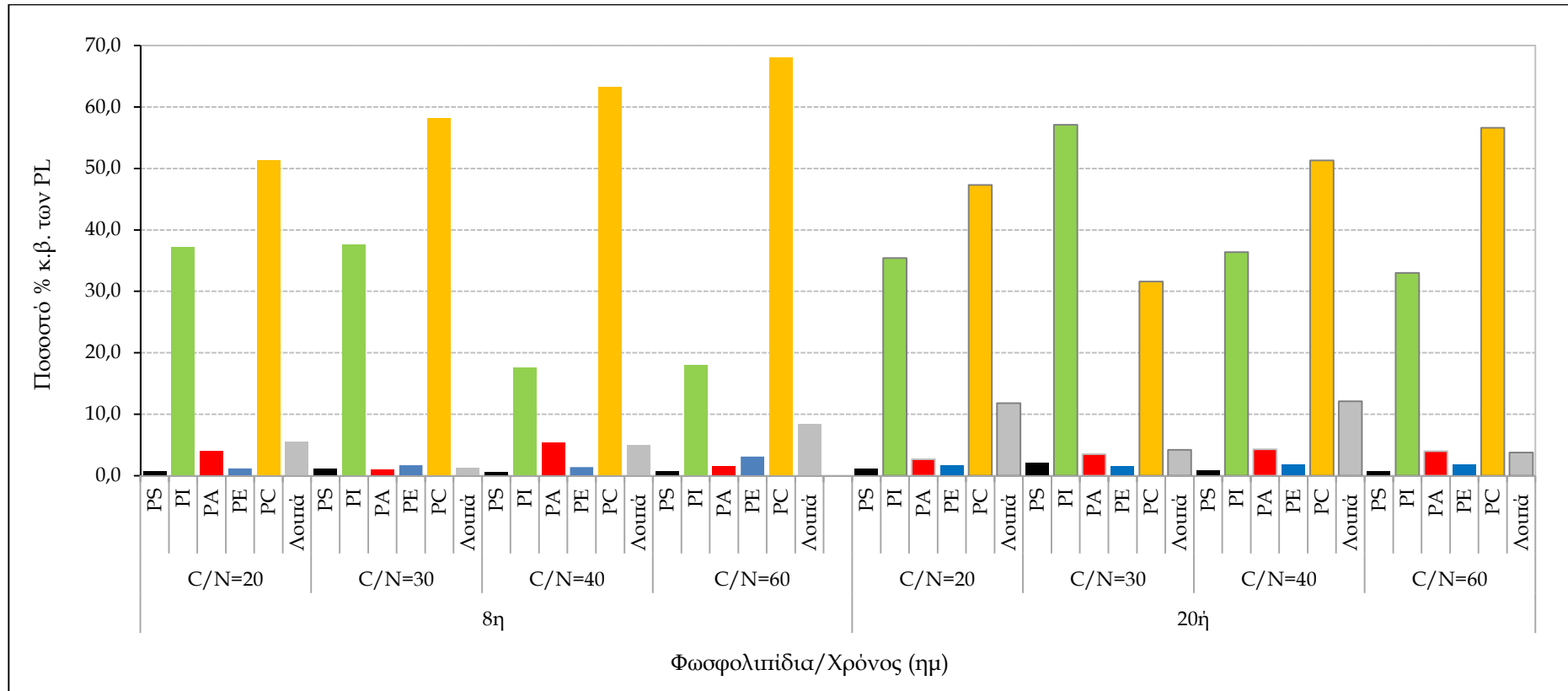
Σύμβολα: NL - ουδέτερα λιπίδια, G+S - γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια, PL - φωσφολιπίδια

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κλάσματος των φωσφολιπιδίων (PL) σε κλάσεις με σκοπό να μελετηθούν οι πιθανές αλλαγές στο προφίλ των PL του μακρομόκητα *V. volvacea* AMRL 190 σε υγρές καλλιέργειες με υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη με αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N την 8^η και 20^η ημέρα της ζύμωσης (Γράφημα III.34). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κλάση με το μεγαλύτερο ποσοστό (31-68%, κ.β.) ήταν η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και ακολουθούσε η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) με ποσοστά 17,6 έως 57%, κ.β., ενώ η συγκέντρωση της κλάσης φωσφατιδικό οξύ (PA) ήταν σημαντικά μικρότερη (1,5-5,5%, κ.β.). Ακόμα, ανιχνεύτηκαν οι κλάσεις φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη PE, αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες. Επίσης, παρατηρήθηκε τάση αύξησης του ποσοστού της PC με την αύξηση του λόγου C/N στο μέσο καλλιέργειας, με αντίστοιχη μείωση του ποσοστού της PI, κυρίως στην αρχή της ζύμωσης (8^η ημέρα). Αντίθετα, αύξηση καταγράφηκε στα ποσοστά της PI σε όλους τους λόγους C/N από τη αρχική (8^η) προς την τελική (20^η) ημέρα της ζύμωσης, με αντίστοιχη μείωση της PC. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση των φωσφολιπιδίων του μακρομόκητα *V. volvacea* AMRL 190 (ανάπτυξη σε υπόστρωμα με λόγο C/N=30 - 20^η ημέρα ζύμωσης) δίνεται στην Εικόνα III.6.



Εικόνα III.6 Χρωματογράφημα των φωσφολιπιδίων του μακρομύκητα *Volvariella volvacea* κατά την καλλιέργειά του σε υπόστρωμα γλυκόζης με C/N=30 την 20^η ημέρα της ζύμωσης

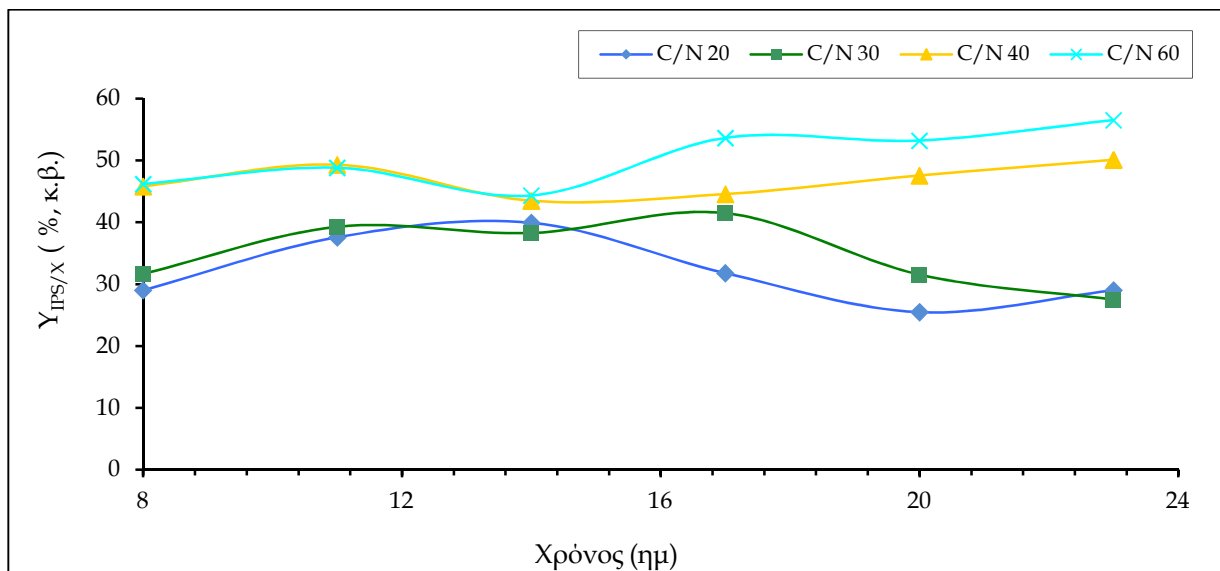
Σύμβολα: 1-PS: φωσφατιδυλσερίνη, 2-PI: φωσφατιδυλινσιτόλη, 3-PA: φωσφατιδικό οξύ, 5-PE φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, 7-PC: φωσφατιδυλοχολίνη, 4,6: άλλα μη ταυτοποιημένα φωσφολιπίδια



Γράφημα III.34 Κλάσεις φωσφολιπιδίων (% κ.β. των ολικών φωσφολιπιδίων) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε θρεπτικό μέσο GRY5 με αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20, 30, 40, 60) υπό ανάδευση (120±5 rpm), σε θερμοκρασία 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 8^η και 20^η ημέρα

Σύμβολα: PC - φωσφατιδυλοχολίνη, PE - φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, PA - φωσφατιδικό οξύ, PI - φωσφατιδυλινοσιτόλη, PS - φωσφατιδυλσερίνη, Λοιπά - άλλα μη ταυτοποιημένα PL

Επιπρόσθετα, η καλλιέργεια του μακρομύκητα *V. voluacea* AMRL 190 σε υγρές καλλιέργειες με υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη με αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N συνοδεύτηκε και από αξιοσημείωτη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (τόσο σε απόλυτες τιμές - g/l, όσο και σε σχετικές τιμές - %, κ.β. επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας) (βλ. Πίνακα III.25). Αξιοσημείωτο πάντως είναι το γεγονός ότι όσο αυξανόταν ο λόγος αυτός (και συνεπώς όσο οι συνθήκες γίνονταν περισσότερο περιοριστικές σε άζωτο) αυξανόταν σημαντικά και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Έτσι, για την καλλιέργεια με $Glc_0 \sim 30$ g/l (C/N=20), η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας ($Y_{IPS/X}$, %, κ.β.) ήταν 40%, ενώ στην αντίστοιχη καλλιέργεια με $Glc_0 \sim 95$ g/l (C/N=60), η τιμή αυτή ήταν 56,6% (Πίνακας III.25). Σε ό,τι αφορά την παραγωγή IPS σε απόλυτες τιμές, η μέγιστη τιμή ενδοπολυσακχαριτών που παρατηρήθηκε ήταν 12,2 g/l. Η κινητική εξέλιξης των ολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς μυκηλιακής μάζας ($Y_{IPS/X}$, % κ.β.) κατά την αύξηση του μακρομύκητα *V. voluacea* AMRL 190 σε υγρές καλλιέργειες με υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη που παρουσίαζαν αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N δίνεται στο Γράφημα III.35. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης και συνεπώς του αρχικού λόγου C/N ευνόησε τη σύνθεση IPS ανά μονάδα μυκηλιακής μάζας. Ακόμα, στα πειράματα με μικρότερη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (π.χ. $Glc_0 = 30$ και 45,8 g/l), μέρος των ενδοκυτταρικών παραχθέντων πολυσακχαριτών αποικοδομήθηκαν, με



Γράφημα III.35 Κινητική εξέλιξης των συνολικών ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς μάζας κατά την αύξηση του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε θρεπτικό μέσο GPYS με αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (λόγοι C/N=20, 30, 40, 60) υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 32 ± 2 °C. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια, ενώ το κάθε σημείο της ζύμωσης είναι ο μέσος όρος τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων

συνακόλουθη μείωση του συντελεστή $Y_{IPS/X}$ όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης κατήλθε κάποιου χαμηλού ορίου (μετά τη 17^η ημέρα), με απόρροια ανάλωση μέρους των ενδοπολυσακχαριτών προς ενέργεια συντήρησης των μυκηλιακών δομών (βλ. Γράφημα III.32α και III.35).

Επίσης, ανάλυση των IPS που παράχθηκαν την αρχική (8^η) και τελική (20^η) ημέρα της καλλιέργειας του *V. voluacea* σε υποστρώματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης μετά από υδρόλυσή τους (Πίνακας III.30) έδειξε ότι αποτελούνταν κύρια από γλυκόζη (από 84,5% έως 100,0%, κ.β.), ακολούθησε η φρουκτόζη και τέλος η μαννιτόλη σε πολύ μικρά ποσοστά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο χρόνος της καλλιέργειας είχε σημαντική επίδραση στη σύσταση των πολυσακχαριτών καθώς σε όλους τους λόγους C/N που μελετήθηκαν, αρχικά παράχθηκε γλυκόζη και μαννιτόλη, ενώ προς το τέλος της ζύμωσης γλυκόζη και φρουκτόζη, ενώ για τη γλυκόζη παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής της από 8^η στη 20^η ημέρα. Ακόμη, θα πρέπει να σημειωθεί ότι καθώς το ποσοστό της γλυκόζης αυξάνονταν με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας, τόσο η φρουκτόζη όσο και η μαννιτόλη μειώνονταν.

Πίνακας III.30 Ανάλυση ενδοπολυσακχαριτών του μακρομύκητα *Volvariella voluacea* AMRL 190 σε απλά σάκχαρα κατά την καλλιέργειά του σε θρεπτικό μέσο GPGYS με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20,30,40,60), υπό ανάδευση (120±5 rpm), σε θερμοκρασία 32±2 °C. Χρόνος ζύμωσης: 8^η και 20^η ημέρα

Χρόνος (ημ)		Σάκχαρα (% κ.β.)			
		C/N=20	C/N=30	C/N=40	C/N=60
8 ^η	Γλυκόζη	96,0	96,55	98,46	100,0
	Φρουκτόζη	-	-	-	-
	Μαννιτόλη	4,0	3,45	1,54	-
20 ^η	Γλυκόζη	84,57	87,35	90,0	93,13
	Φρουκτόζη	15,43	12,65	10,0	6,87
	Μαννιτόλη	-	-	-	-

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της κινητικής και φυσιολογικής συμπεριφοράς (ήτοι η διερεύνηση παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης, η παραγωγή της κυτταρικής μάζας, η κατανάλωση των σακχαρούχων υποστρωμάτων, η συσσώρευση και σε κάποιες περιπτώσεις η αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών υλικών όπως πολυσακχαριτών και λιπιδίων, η έκκριση εξωπολυσακχαριτών, η σύσταση σε λιπαρά οξέα του ενδοκυτταρικού λίπους, σε αρκετές περιπτώσεις η ενδεδειγμένη μελέτη των διαφόρων λιπιδιακών κλασμάτων καθώς και η σύσταση σε μονοσακχαρίτες των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών) σε διάφορα στελέχη εδωδιμων και φαρμακευτικών μακρομυκήτων κατά την αύξησή τους σε υγρές αναδεδυόμενες και/ή στατικές καλλιέργειες. Μεγάλη έμφαση δόθηκε στη δυνατότητα αύξησης και παραγωγής μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων για στελέχη του μακρομύκητα *V. voluacea* καλλιεργούμενου με υγρές ζυμώσεις, καθώς υπήρχε έλλειψη βιβλιογραφικών δεδομένων για αυτού του είδους τη βιοδιεργασία. Σε ένα πρώτο επίπεδο, ένας αρκετά μεγάλος αριθμός εδωδιμων και φαρμακευτικών μυκήτων (11 στελέχη) αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξής τους σε 4 διαφορετικά υποστρώματα γλυκόζης (κύρια πηγή άνθρακα) και τα οποία είναι τυπικώς απαντώμενα στις υγρές καλλιέργειες ποικίλων μακρομυκήτων (GPYS, GPY, MCM, GPS) και μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μυκηλιακής μάζας, κυτταρικών λιπιδίων και εξωπολυσακχαριτών από τους μύκητες αυτούς. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη κινητική και φυσιολογική μελέτη για τα 6 πιο ενδιαφέροντα από τα στελέχη των μακρομυκήτων που εξετάστηκαν προηγουμένως (*A. aegerita* AMRL 104, *F. velutipes* AMRL 271, *G. applanatum* AMRL 341, *M. esculenta* AMRL 36 και *P. pulmonarius* AMRL 177), ενώ επίσης 4 στελέχη του μύκητα *V. voluacea* (AMRL 188, 190, 191, 192, κυρίως όμως το στέλεχος AMRL 190), μελετήθηκαν ως προς τη φυσιολογία της αύξησής τους εξονυχιστικά. Ιδιαίτερα το στέλεχος *V. voluacea* 190 καλλιεργήθηκε σε υποστρώματα με διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου και στη συνέχεια υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης (C/N=20-60), όπου εξετάστηκαν οι προαναφερθείσες παράμετροι. Για την επιλογή στελέχους *V. voluacea* και πηγών άνθρακα και αζώτου, προηγήθηκε των κινητικών μελετών σε κωνικές φιάλες μελέτη της ταχύτητας γραμμικής αύξησης του μυκηλίου σε τρυβλία με υποστρώματα στερεοποιημένα με άγαρ.

Η επίδραση της σύνθεσης του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας στη βιοσυνθετική δυναμική (παραγωγή μυκηλιακής μάζας, κυτταρικών λιπιδίων και εξωπολυσακχαριτών) των 11 στελεχών διαφορετικών ειδών μακρομυκήτων που προαναφέρθηκαν, κατά την ανάπτυξή τους στα 4 υποστρώματα με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, έδειξε ότι η παραγωγή

μυκηλιακής μάζας και μεταβολικών προϊόντων επηρεάστηκε κατά τρόπο αρκετά σημαντικό, τόσο από τη σύσταση των χρησιμοποιηθέντων μέσων, όσο και από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης για τους περισσότερους από τους υπό μελέτη μακρομύκητες. Ως γνωστόν, το είδος του υποστρώματος και κυρίως η διαθέσιμη πηγή άνθρακα και αζώτου παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στον τρόπο εκμετάλλευσης του υποστρώματος από τον έκαστο μύκητα και στην αντίστοιχη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων (Stamets, 2000; Okhuoya, 2000). Ο συνήθης τρόπος ανάπτυξης των μυκήτων σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα για παραλαβή μυκηλιακής βιομάζας και διαφόρων μεταβολιτών γίνεται με τη χρήση απλών πηγών άνθρακα με κυρίαρχη τη γλυκόζη (Chandra και Purkayastha, 1977; Garraway και Evans, 1984; Elisashvili κ.α., 2009; Meng κ.α. 2010; Nwokoye κ.α., 2010). Σε περιορισμένο αριθμό εργασιών έχει αναφερθεί και η χρήση λακτόζης (π.χ. για την παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδερικού οξέος από το στέλεχος *G. lucidum* (Tang και Zhong, 2002), όπως και σακχαρόζης (π.χ. για την καλλιέργεια του μύκητα *G. lucidum* σε μελέτη του Chen, 2002), ενώ σακχαρόζη, μαννόζη και λακτόζη και συνδυασμοί αυτών χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του *M. elata* (Winder, 2006). Ως πηγές αζώτου, προτιμώνται συνήθως η πειπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης (Fasidi και Akwakwa, 1996; Moonmoon κ.α., 2008; Elisashvili κ.α., 2009; Meng κ.α., 2010; Paraspyridi κ.α., 2011). Καθώς τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν αποστειρωμένα πριν εμβολιαστούν με τους μακρομύκητες (απουσία ανταγωνιστών) και η κύρια πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη, ενώ ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πειπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, αναμενόταν υψηλή κυτταρική παραγωγή. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το υπόστρωμα GPYS και ακολούθως το υπόστρωμα GYS ευνόησαν την παραγωγή βιομάζας στο σύνολο των ανώτερων μυκήτων, ενώ στα υποστρώματα MCM και GPY καταγράφηκαν χαμηλότερες τιμές. Πράγματι, η βασική διαφοροποίησή τους ήταν στην προσθήκη αλάτων (υπόστρωμα MCM), μακροστοιχείων/αλάτων και ιχνοστοιχείων (υποστρώματα GPYS και GYS), γεγονός που έκανε τα τρία αυτά υποστρώματα πιο πλούσια στη σύνθεση από το GPY.

Σε ό,τι αφορά την επίδραση της ανάδευσης (120 rpm) στη παραγωγή βιομάζας κατά την καλλιέργεια των μελετώμενων μακρομυκήτων, τα αποτελέσματα μεταξύ αναδεδόμενων/στατικών καλλιέργειών έδειξαν ότι αυτή ήταν άμεσα σχετιζόμενη με το είδος του μύκητα. Παρατηρήθηκε ότι οι μύκητες *M. esculenta*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *V. voluacea* και λιγότερο ο *A. aegerita* έδωσαν υψηλές τιμές βιομάζας σε ανακινούμενη και μη κατάσταση, ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα για το σύνολο των μακρομυκήτων που μελετήθηκαν, η ανάδευση της καλλιέργειας ευνόησε την παραγωγή βιομάζας (εκτός από τον *G. applanatum*). Ειδικότερα, για τον *V. voluacea*, η σύγκριση μεταξύ

στατικών και αναδεδυμένων καλλιέργειών έδειξε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά στη X_{max} και το συντελεστή απόδοσης $Y_{X/GI}$, γεγονός αρκετά ενδιαφέρον, καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η μορφολογία του μυκηλίου (υφές, σφαιρίδια) κατά τη διάρκεια της κινητικής αύξησής του επιδρά στη παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων (Park κ.α., 2002; Tang και Zhong, 2003; Feng κ.α., 2010). Τα αποτελέσματα σχετικά με την θετική επίδραση της ανάδευσης συμφωνούν με την αντίληψη ότι ο αερισμός ευνοεί τη μυκηλιακή αύξηση σε υγρά θρεπτικά μέσα (Xu και Yun, 2004; Lee κ.α., 2004) και μάλιστα ότι η βιομάζα που παράγεται σε 1 ημέρα αναδεδυμένης καλλιέργειας αναλογεί στη βιομάζα που παράγεται σε 1,5 ημέρα στατικής (Leatham και Griffin, 1984; Song και Nair, 1987). Γενικά, οι εδωδιμοί μύκητες κατά την καλλιέργειά τους σε υγρές ζυμώσεις ευνοούνται από τις μέτριες ταχύτητες ανάδευσης (≤ 150 rpm), γιατί σε αντίθετη περίπτωση δημιουργείται διατμητική τάση που δρα ανασταλτικά. Στις αναδεδυμένες καλλιέργειες των υπό εξέταση μακρομυκήτων εφαρμόστηκαν περίπου 120 στροφές/λεπτό, ρυθμός σχεδόν ιδανικός καθώς σε χαμηλές στροφές ανάδευσης έχουν σημειωθεί υψηλότερες τιμές βιομάζας (André κ.α., 2010; Kim κ.α., 2010).

Εκτός της εφαρμογής ή μη ανάδευσης, η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των μακρομυκήτων όσον αφορά στις τιμές της παραγόμενης βιομάζας θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορές μεταξύ των μακρομυκήτων ως προς τη φυσιολογία θρέψης τους, καθώς παρουσιάζουν διαφορές στα ενζυμικά συστήματα που διαθέτουν για εκμετάλλευση των υποστρωμάτων προς παραγωγή βιομάζας, καθώς και στην διαφορετική ταχύτητα αύξησής τους στα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας. Ωστόσο, σε πολλές από τις πραγματοποιηθείσες καλλιέργειες, ελήφθησαν πολύ ικανοποιητικές τιμές ξηράς μυκηλιακής βιομάζας, δεδομένου και του γεγονότος ότι οι συνθήκες δεν ήταν αριστοποιημένες. Έτσι, υψηλές συγκεντρώσεις μυκηλιακής μάζας της τάξης των ~ 18 - 20 g/l ελήφθησαν ακόμη και κατά το στάδιο της αρχικής επιλογής (screening) των μυκήτων με καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε μέχρι τις 16 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό (π.χ. στελέχη *P. pulmonarius* και *P. ostreatus*), ενώ επιμήκυνση της ζύμωσης για ~ 24 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα περαιτέρω αύξηση της τιμής της ξηράς βιομάζας για σχεδόν όλους τους μύκητες που μελετήθηκαν ($\sim 22,5$ g/l για τον *P. pulmonarius*, ~ 20 g/l για τον *F. velutipes*, ~ 16 g/l για τον *V. voluacea*, $\sim 15,5$ g/l για τον *G. applanatum*, και ~ 14 g/l για τον *M. esculenta*). Σχετικά μικρότερες, αλλά πάντως ικανοποιητικές τιμές μυκηλιακής κυτταρικής μάζας επιτεύχθηκαν για τους υπόλοιπους μύκητες (~ 11 g/l για τον *G. lucidum*, $\sim 10,5$ g/l για τον *A. aegerita* και τον *A. auricula-judae*, $\sim 9,6$ g/l για τον *M. elata* και ~ 5 g/l για τον *L. edodes*), ενώ η παραγωγή ξηράς μυκηλιακής

μάζας επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από την σακχαρούχο πηγή άνθρακα όσο και από τον αυξανόμενο αρχικό λόγο C/N για το μύκητα *V. voluacea* (~21,4 g/l σε C/N 60).

Μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν σε καλλιέργειες βυθού διαφόρων στελεχών των εν λόγω μυκήτων κατέγραψαν σε αρκετές περιπτώσεις τιμές παραγόμενης βιομάζας αντίστοιχες ή και σχετικά μικρότερες σε σχέση με την παρούσα εργασία. Έτσι, κατά τη μελέτη των Yang κ.α. (2000) ο μύκητας *G. lucidum* σε υπόστρωμα γλυκόζης 50 g/l παράγαγε 2,0 g/l μυκηλιακής βιομάζας και με τη προσθήκη ελαιικού οξέος η βιομάζα αυξήθηκε από 2,0 g/l σε 4,6 g/l. Για το ίδιο στέλεχος μύκητα, οι Chang κ.α. (2006) κατέγραψαν μικρότερη τιμή βιομάζας (1,70 g/l και 1,35 g/l) σε υποστρώματα ακατέργαστης ζάχαρης και λακτόζης αντίστοιχα, ενώ σε υπόστρωμα γλυκόζης και άλλων πηγών άνθρακα (φρουκτόζη, σακχαρόζη και εκχύλισμα βύνης - όλα σε αρχικές συγκέντρωσης 20 g/l) οι τιμές ήταν ακόμα μικρότερες (π.χ. στη γλυκόζη παράχθηκε βιομάζα 0,80 g/l). Προσθήκη διαφόρων φυτικών ελαίων (ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, σογιέλαιο) ωστόσο αύξησε σημαντικά την παραγόμενη βιομάζα με τη μέγιστη τιμή να επιτυγχάνεται με προσθήκη ηλιέλαιου (5,4 g/l). Για τον ίδιο μύκητα, οι Babitskaya κ.α. (2005) κατέγραψαν υψηλότερη τιμή βιομάζας (11,4 g/l) σε υπόστρωμα με λόγο C/N ίσο με 18 (περίπου ο ίδιος των πειραμάτων της παρούσας εργασίας) και αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l, ενώ οι Lomberh κ.α. (2002) σε υπόστρωμα γλυκόζης κατέγραψαν παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας 6,0 g/l (τιμές αντίστοιχες ή και μικρότερες σε σχέση με την παρούσα εργασία για το μύκητα *G. lucidum*). Επίσης, οι Tang και Zhong (2002) ανέφεραν μέγιστες τιμές ξηράς μυκηλιακής μάζας ~22 g/l, τόσο σε αναδευόμενες φιάλες όσο και σε μηχανικώς αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα, σε συστήματα ημι-συνεχούς τροφοδοτούμενης ζύμωσης (fed-batch culture) χρησιμοποιώντας το στέλεχος *G. lucidum* CGMCC 5.616. Με το ίδιο στέλεχος, οι Fang και Zhong (2002α,β) και οι Tang κ.α. (2011) ανέφεραν τιμές μυκηλιακής μάζας κυμαινόμενες μεταξύ των ορίων 17-22 g/l, τόσο σε αναδευόμενες φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρες. Σε άλλα πειράματα, σύμφωνα με τους Stajić κ.α. (2011) διάφορα στελέχη του *G. lucidum* εμφάνισαν μυκηλιακή μάζα κυμαινόμενη μεταξύ των τιμών 3-28 g/l σε αναδευόμενες φιάλες.

Για τον μακρομύκητα *G. applanatum*, οι Lee κ.α. (2007) ανέφεραν ανάμεσα σε διάφορες πηγές άνθρακα που μελέτησαν με αρχική συγκέντρωση σακχάρου στα 40 g/l (χρήση φρουκτόζης, γλυκόζης, μαλτόζης, λακτόζης και σακχαρόζης) ότι η φρουκτόζη έδωσε την υψηλότερη παραγωγή κυτταρικής βιομάζας (19,4 g/l) σε σχέση με τη γλυκόζη (17,8 g/l) και τη μαλτόζη (18,9 g/l), ενώ σχετικά μικρότερες τελικές συγκεντρώσεις βιομάζας (~15 g/l) επιτεύχθηκαν για τη σακχαρόζη και τη λακτόζη. Αντιθέτως, οι Lomberh κ.α. (2002) σε παρόμοιο με το δικό μας υπόστρωμα ανέφεραν παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας 4,4 g/l

μετά από δέκα ημέρες καλλιέργειας. Επίσης, οι Paraspyridi κ.α. (2011) καλλιέργησαν τον μακρομύκητα *G. australe* ATHUM 4345 χρησιμοποιώντας γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης ως κύρια θρεπτικά συστατικά σε ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε μηχανικώς αναδεδυόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 20 l και πέτυχαν μέγιστες τελικές συγκεντρώσεις βιομάζας της τάξης των ~10 g/l κατόπιν αριστοποίησης της διεργασίας ζύμωσης (στην πιο πάνω περίπτωση όμως, η ζύμωση ολοκληρώθηκε ταχύτερα σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, σε ~120 h δηλαδή ~5 ημέρες).

Οι Maziero κ.α. (1999) ανέφεραν ότι κατά την καλλιέργεια του *L. edodes* σε υπόστρωμα γλυκόζης (αρχικής συγκέντρωσης ~40 g/l), η οποία έλαβε χώρα σε διάστημα 14 ημερών σε αναδεδυόμενες φιάλες, η βιομάζα ήταν 4,70 g/l, τιμή αντίστοιχη με αυτές της παρούσας διατριβής. Επίσης, οι Lombardi κ.α. (2002) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* σε αναδεδυόμενες φιάλες (ζύμωση διάρκειας 10 ημερών) κατέγραψαν μυκηλιακή βιομάζα 6,1 g/l, τιμή σχετικά υψηλότερη σε σχέση με τη μέγιστη επιτευχθείσα για το μύκητα αυτό στην παρούσα εργασία (μέγιστη τιμή μυκηλιακής μάζας 4,6 g/l). Εξάλλου, καλλιέργεια του *L. edodes* σε γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης έδωσε μετά από αριστοποίηση των συνθηκών βιομάζα 6,88 g/l (Feng κ.α., 2010). Άλλες μελέτες συμπίπτουν με τα ποσοτικά δεδομένα της παρούσας διδακτορικής διατριβής όσον αφορά στο είδος *L. edodes*, καθώς σε καλλιέργεια 20 ημερών παράχθηκε ξηρά βιομάζα ~5,0 g/l όταν χρησιμοποιήθηκε ως υλικό εκκίνησης η ακάθαρτη γλυκερόλη, απόβλητο της διεργασίας παραγωγής βιοντήζελ, αλλά η παραγωγή μυκηλιακής μάζας είχε προηγουμένως αριστοποιηθεί ως προς τη θερμοκρασία επώασης, την ανάδευση και το αρχικό pH του μέσου καλλιέργειας (André κ.α., 2010). Σε αντίστοιχα αποτελέσματα οδηγήθηκαν και οι Hasegawa κ.α. (2005), οι οποίοι πραγματοποίησαν την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *L. edodes* Le 1 σε συστήματα αναδεδυόμενων φιαλών χρησιμοποιώντας γεωργο-χημικά υπολείμματα ως υποστρώματα και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας που επιτεύχθηκε ήταν ~5,0 g/l.

Αναφορικά με τους μύκητες του γένους *Pleurotus*, οι Gern κ.α. (2008) ανέφεραν για καλλιέργεια βυθού διάρκειας 8-14 ημερών του *P. ostreatus* σε αναδεδυόμενες φιάλες (ταχύτητα ανάδευσης 120 rpm), σχετικά υψηλότερη παραγωγή ξηράς μυκηλιακής μάζας (26,64 g/l) σε σχέση με την παρούσα εργασία, όπου όμως στην περίπτωσή τους η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 40 g/l και αρχική συγκέντρωση εκχυλίσματος καλαμποκιού 20 g/l. Αντιθέτως, οι Ardon κ.α. (1996) κατέγραψαν για τον ίδιο μύκητα πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις παραγόμενης βιομάζας (4,8 g/l) σε υπόστρωμα γλυκόζης και εκχυλίσματος από στέλεχος βαμβακιού. Για το μανιτάρι *P. pulmonarius*, οι El-Dein κ.α. (2004) κατέγραψαν ως μέγιστη τιμή παραχθείσας

βιομάζας σε καλλιέργειες με αναδεδόμενες φιάλες αυτή των 20,45 g/l που είναι αντίστοιχη με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Οι Confortin κ.α. (2008) πραγματοποίησαν καλλιέργειες του μύκητα *P. sajor-caju* σε μηχανικώς αναδεδόμενους βιοαντιδραστήρες ενεργού όγκου 5 l χρησιμοποιώντας μια πληθώρα σακχάρων ως υλικών εκκίνησης της ζύμωσης (γλυκόζη, σακχαρόζη, κ.λ.π.) και οι τιμές της ξηράς μυκηλιακής μάζας που ελήφθησαν ήταν μεταξύ των τιμών 5,9 και 8,2 g/l.

Η φυσιολογία θρέψης του βλαστικού μυκηλίου των ειδών *Morchella* έχει μελετηθεί εκτενώς, δεδομένης και της μεγάλης δυσκολίας παραγωγής ασκοκαρπιών του μύκητα σε ελεγχόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα, για το μύκητα *M. esculenta*, έχουν αναφερθεί τιμές ξηράς μυκηλιακής μάζας της τάξης των 8,6 g/l (σε ζύμωση ~5 ημερών), μετά από αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας όπου χρησιμοποιήθηκαν 30 g/l γλυκόζης (Meng κ.α. 2010), ενώ οι Xu κ.α. (2008α), σε ανάλογες μελέτες αριστοποίησης σημειώνουν αποδόσεις 4,5-6,9 g/l, τιμές που είναι μικρότερες σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Αντίθετα, σε άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων/ΕΘΙΑΓΕ καταγράφηκαν υψηλές τιμές βιομάζας σε θρεπτικό υλικό PDB (εκχύλισμα πατάτας + 20 g/l γλυκόζη) στις 17 ημέρες: 17,49g/l για τον *M. esculenta* και 8,18 g/l για τον *M. elata* (Φιλιππούσης, αδημοσίευτα στοιχεία). Προγενέστερες μελέτες του μύκητα *M. esculenta* σε υγρά θρεπτικά μέσα με διάφορες πηγές άνθρακα έδειξαν πωχή ανάπτυξη του μυκηλίου του στην ινουλίνη (Brock, 1951; Willam κ.α., 1956; Kaul, 1978). Από τον Brock (1951) έχει αναφερθεί ότι το άμυλο είναι η καλύτερη πηγή άνθρακα για τον *M. esculenta* και ακολουθούν οι μαλτόζη, φρουκτόζη, τυρανόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη. Καλλιέργειες των *Morchella hortensis*, *Morchella crassipes* και *M. esculenta* που πραγματοποιήθηκαν σε υποστρώματα γλυκόζης, μαλτόζης και λακτόζης έδωσαν παρόμοιες τιμές βιομάζας στη γλυκόζη ή μαλτόζη. Στη λακτόζη, η βιομάζα των *M. hortensis* και *M. crassipes* δε διέφερε από αυτή των δύο άλλων σακχάρων, ενώ για τον *M. esculenta* η παραγόμενη βιομάζα στη λακτόζη ήταν λιγότερη από τη μισή σε σχέση με αυτή που παράχθηκε στις γλυκόζη και μαλτόζη (Litchfield κ.α., 1968). Ωστόσο, ο Φιλιππούσης (2003β) έδειξε ότι τα διάφορα είδη διαφοροποιούνται ως προς τη προτίμησή τους στις πηγές άνθρακα. Γενικά, διαπίστωσε ότι καλά χρησιμοποιούμενα σάκχαρα από όλα τα είδη *Morchella* που μελέτησε είναι κατά φθίνουσα σειρά η μαλτόζη, η γλυκόζη, το άμυλο και η σακχαρόζη. Συγκεκριμένα, η μαλτόζη το άμυλο και η ινουλίνη αναδείχθηκαν καλύτερες πηγές άνθρακα για στελέχη ανοιχτόχρωμων ειδών (*M. vulgaris*, *M. rotunda*, *M. crassipes*), ενώ για τα σκουρόχρωμα (*M. elata*, *M. conica*, *M. angusticeps*) η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η ινουλίνη. Σε πιο πρόσφατη έρευνα (Meng κ.α., 2010) για τον μύκητα *M. esculenta* αναφέρεται

ότι η γλυκόζη επάγει την παραγωγή βιομάζας περισσότερο από άλλα σάκχαρα (φρουκτόζη, λακτόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη). Οι διαφορές αυτές μεταξύ των ειδών ως προς τη φυσιολογία θρέψης θα μπορούσαν ίσως να εξηγήσουν την επιλεκτική προτίμηση των μυκήτων αυτών για συγκεκριμένες τροφικές φωλιές, όπως επίσης και την ανάπτυξη μυκορριζικών σχέσεων με συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές, το ριζικό σύστημα των οποίων αποτελεί την πηγή ανεφοδιασμού τους με τους απαραίτητους υδατάνθρακες για την αύξηση της αποικίας και την ανάπτυξη των ασκοκαρπίων τους (Φιλιππούσης, 2003β).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ποσοτικά δεδομένα σχετιζόμενα με την παραγωγή μυκηλιακής μάζας από τους μύκητες *A. auricula-judae*, *F. velutipes*, *A. aegerita* και *V. volvacea* σε υγρές καλλιέργειες είναι πολύ περιορισμένα. Συγκεκριμένα, για τον μύκητα *A. auricula-judae* έχει αναφερθεί σχετικά υψηλότερη τιμή σε σχέση με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας στο υλικό GPYS (10,6 g/l, 16^η ημέρα) από τους Wu κ.α. (2006) που κατέγραψαν 14,5 g/l βιομάζας σε αναδεδυόμενη καλλιέργεια 6 ημερών με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης 40 g/l. Αντίθετα, τα αποτελέσματά μας που αναφέρονται στη X_{max} του *F. velutipes* (10,9-19,9 g/l, 16^η-20^η ημέρα αντίστοιχα, GPYS) είναι σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από αυτά των Maziero κ.α. (1999) που σημειώνουν βιομάζα 8,28 g/l σε 14 ημερών αναδεδυόμενες καλλιέργειες του μύκητα σε υπόστρωμα γλυκόζης (αρχικής συγκέντρωσης ~40 g/l). Ακόμη χαμηλότερες αποδόσεις βιομάζας (της τάξης των ~3,2 g/l) κατέγραψαν οι Shin κ.α. (2007) στο στέλεχος του *F. velutipes* KCTC 6367 μετά από αριστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης σε μηχανικώς αναδεδυόμενους βιοαντιδραστήρες. Ακόμη, η καλλιέργεια του *A. aegerita*, σε παρόμοιο με το δικό μας υπόστρωμα, έδωσε αποτελέσματα παραχθείσας βιομάζας αρκετά υποδεέστερα (4,2 g/l τη δέκατη ημέρα της καλλιέργειας; Lomberh κ.α., 2002) σε σχέση με την παρούσα εργασία (7,5-10,5 g/l, 16^η-24^η ημέρα αντίστοιχα GPYS). Όμως, όταν προστέθηκε εκχύλισμα καλαμποκιού η συγκέντρωση μυκηλιακής μάζας αυξήθηκε πολύ (τελική συγκέντρωση ~17 g/l). Περαιτέρω, σε πείραμα των Kim κ.α. (2005) η παραγωγή βιομάζας του μακρομύκητα *A. cylindracea* αριστοποιήθηκε με στατιστική μέθοδο πειραματικού σχεδιασμού (orthogonal matrix method) και η τελική συγκέντρωση βιομάζας σε πειράματα αναδεδυόμενων φιαλών έφτασε μέχρι και τα ~20-25 g/l. Παρόλα αυτά, χρησιμοποιώντας το αριστοποιημένο θρεπτικό μέσο, η καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα όγκου 5 l είχε ως αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση μυκηλιακής μάζας να είναι της τάξης των 12 g/l.

Τέλος, στις περιορισμένες σε σύγκριση με άλλους μύκητες εργασίες που καταγράφουν την παραγωγή βιομάζας του *V. volvacea*, αναφέρεται τιμή X_{max} για το μύκητα *V. volvacea* LPB77 κατά την αύξησή του σε αναδεδυόμενες φιάλες ~11 g/l όταν ως υλικά εκκίνησης

χρησιμοποιήθηκαν υπολείμματα της καλλιέργειας πατάτας και cassava (Tonial κ.α., 2000). Χαμηλότερες τιμές βιομάζας (0,6-3 g/l) παράχθηκαν και κατά την καλλιέργεια άλλων στελεχών του *V. voluacea* σε εκχυλίσματα γεωργικών υπολειμμάτων σε φιάλες υπό ανάδευση (Akinyele και Adetuyi, 2005), ενώ προσθήκη 1% κ.β. φυτικών ελαίων (ηλιέλαιο, σογιέλαιο, αραχιδέλαιο) και εστέρων του παλμιτικού, στεατικού και ελαϊκού οξέος σε υγρό υπόστρωμα γλυκόζης ευνόησε σημαντικά την παραγωγή βιομάζας (~8,5 g/l) του *V. voluacea* (Li κ.α., 1992).

Πέρα από το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία σε ορισμένες περιπτώσεις επιτεύχθηκαν πολύ ικανοποιητικές συγκεντρώσεις ξηράς μυκηλιακής μάζας (π.χ. $X \geq 20$ g/l), ενίοτε ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν σάκχαρο ήταν (αρκετά ή και ιδιαίτερα) ικανοποιητικός. Έτσι σε καλλιέργειες που έλαβαν χώρα με τους μακρομύκητες *A. aegerita* και *F. velutipes* ο συντελεστής απόδοσης $Y_{X/Glc}$ (γλυκόζη ήταν το σάκχαρο που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες αυτές) έλαβε τιμές της τάξης του ~0,70 g/g. Σε άλλες περιπτώσεις (π.χ. *M. esculenta*, *G. applanatum* και *V. voluacea*) ο συντελεστής απόδοσης έλαβε τιμές της τάξης των ~0,45-0,60 g/g, σε μία από τις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν (*P. pulmonarius*), ο συνολικός συντελεστής απόδοσης $Y_{X/Glc}$ ήταν πραγματικά άριστος (~0,9 g/g), ανεξαρτήτως από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης στο μέσο της καλλιέργειας. Αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης ξηράς βιομάζας προς το αναλωθέν σάκχαρο είναι ~0,8 g/g (Fakas κ.α., 2008; Koutinas κ.α., 2009; Vamvakaki κ.α., 2010), είναι ευκόλως αντιληπτό το γεγονός ότι μέρος και λοιπών οργανικών συστατικών τα οποία βρίσκονταν στο μέσο καλλιέργειας (π.χ. πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε αρχικές συγκεντρώσεις 3,5 και 2,5 g/l) αναλώθηκαν από το μύκητα αυτό ως πηγές άνθρακα (πιθανώς αντίστοιχα φαινόμενα έλαβαν χώρα και σε άλλους μύκητες). Σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία, ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης γλυκόζης προς το αναλωθέν σάκχαρο έχει λάβει αντίστοιχες (ή συνήθως μικρότερες) τιμές σε σχέση με τις μέγιστες τιμές (π.χ. 0,8-0,9 g/g) που επιτεύχθηκαν στην παρούσα εργασία. Εξαιρέσεις όπου πραγματικά υψηλές τιμές του συντελεστή απόδοσης βιομάζας έχουν ληφθεί (της τάξης των 0,70-0,82 g/g), αναφέρονται από τους Maziero κ.α. (1999) για τους μύκητες *Tricholoma crassum* και *Lepista* sp. κατά την αύξησή τους στη γλυκόζη, από τους Confortin κ.α. (2008) σε καλλιέργειες του μύκητα *P. sajor-caju* σε μηχανικώς αναδεδόμενους βιοαντιδραστήρες με πληθώρα σακχάρων χρησιμοποιούμενων ως υλικών εκκίνησης της ζύμωσης και από τους Tang και Zhong (2004) για την καλλιέργεια του *G. lucidum* στη λακτόζη υπό μη αναδεδόμενες συνθήκες. Γενικώς, για ένα μεγάλο αριθμό μακρομυκήτων που μελετήθηκαν (π.χ. *Agaricus* sp., *F. velutipes*, *L. edodes*, *Ganoderma* sp.,

Pleurotus sp.), τιμές του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν υπόστρωμα ήταν της τάξης των $\sim 0,3-0,6$ g/g (Nair κ.α., 1989; Tang και Zhong, 2002; Babitskaya κ.α., 2005; André κ.α., 2010; Tang κ.α., 2011).

Τα κινητικά δεδομένα της παρούσας μελέτης του *V. volvacea* σε ζυμώσεις βυθού έδειξαν ότι η χρήση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου επέδρασε σημαντικά στη παραγωγή βιομάζας, με τις καλύτερες επιδόσεις να λαμβάνονται για τα σάκχαρα γλυκόζη, άμυλο, φρουκτόζη και δευτερευόντως στη ξυλόζη, κυρίως στις ανακινούμενες καλλιέργειες (σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπέρασε τα 15 g/l) και για τις πηγές αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με αυτά των Garcha κ.α. (1979) που υποδεικνύουν το άμυλο, τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ως καλύτερες πηγές άνθρακα για την καλλιέργεια του *Volvariella* sp.. Ακόμη, συμφωνούν και με τον Volz (1972), ο οποίος κατά τη διερεύνηση διαφόρων πηγών άνθρακα για την παραγωγή βιομάζας από μεταλλαγμένα στελέχη *Volvariella* sp. διαπίστωσε καλύτερη αξιοποίηση του αμύλου σε σύγκριση με την μαλτόζη, σακχαρόζη και γλυκόζη που υποστήριξαν καλή ανάπτυξη του μύκητα. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη όπου έγινε αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας (30 °C, pH=6,0, προσθήκη βιταμινών κ.α.) καταγράφηκε σε στέλεχος του *V. esculenta* $X_{\max} \sim 5,0$ g/l με φρουκτόζη ως κύρια πηγή άνθρακα (Jonathan κ.α., 2004). Η καλή χρησιμοποίηση της φρουκτόζης από στέλεχος του *V. volvacea* επισημάνθηκε και από τους Chandra και Purkayastha (1977).

Αντίθετα, όταν η αξιολόγηση των διαφόρων πηγών άνθρακα έγινε με βάση την ταχύτητα αύξησης του μύκητα καλλιέργειες στερεάς κατάστασης σε τρυβλία παρατηρήθηκε ότι ο μύκητας εμφάνισε τη μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης στους δισακχαρίτες μαλτόζη (έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με Kr 10,47 mm/ημέρα) και σακχαρόζη, ενώ γρήγορη εξάπλωση του μυκηλίου έδειξαν και τα σάκχαρα σορβιτόλη, φρουκτόζη, άμυλο και γλυκόζη, με ακόλουθες τις πηγές άνθρακα λακτόζη, ξυλόζη και μαννόζη. Για την πληρέστερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, επιπρόσθετα έγινε και εκτίμηση της μυκηλιακής πυκνότητας της αποικίας καθώς, όπως έχει επισημανθεί σε στερεές ζυμώσεις άλλων μακρομυκητών, η ταχύτητα αύξησης του μυκηλίου και η παραγόμενη βιομάζα συχνά σχετίζονται αρνητικά (Fasidi, 1996; Philipproussis κ.α., 2011). Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η θρεπτική κατάσταση του μέσου καλλιέργειας επηρεάζει τόσο την ανάπτυξη όσο και τη μορφολογία της αποικίας. Η ανάπτυξη του μυκηλίου σε ένα πλούσιο σύνθετο υλικό μειώνει την κατά μήκος επέκταση των υφών και αυξάνει την συχνότητα διακλάδωσης τους με αποτέλεσμα την δημιουργία πυκνού μυκηλιακού ιστού (Prosser, 1994). Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι τα τρυβλία με άμυλο, φρουκτόζη, γλυκόζη αλλά και ξυλόζη, αν και εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές ταχύτητας από ό,τι αυτά της μαλτόζης είχαν μεγαλύτερη

πυκνότητα μυκηλίου ενώ αντίθετα στα τρυβλία με τις σακχαρόζη και σορβιτόλη οι υφές ήταν αραιότερες, γεγονός που υποδηλώνει μικρότερη παραγωγή βιομάζας.

Τα αποτελέσματα μας στις καλλιέργειες στερεάς κατάστασης είναι σε αντιστοιχία με αυτά των Reyes κ.α. (1998) που εξέτασαν τέσσερα στελέχη του μύκητα *V. voluacea* (δύο εμπορικά Vnc1 και Vnc2 και δύο αυτοφυή EAAC-0001 και EAAC-0002) και υποδεικνύουν τη μαλτόζη ως μια αρκετά ευνοϊκή πηγή άνθρακα, με αρκετά μεγάλη ταχύτητα γραμμικής αύξησης και πυκνότητα μυκηλίου, όχι όμως και ως βέλτιστη. Σύμφωνα με τα δεδομένα τους, οι μεγαλύτερες ταχύτητες αύξησης αλλά και η μεγαλύτερη πυκνότητα μυκηλίου σημειώθηκαν στα σάκχαρα άμυλο, σορβιτόλη, γλυκόζη και κυτταρίνη, ενώ αντίθετα στη σακχαρόζη σημειώνουν μεγάλη ταχύτητα αύξησης αλλά λεπτότερο μυκήλιο συγκριτικά με τα παραπάνω σάκχαρα. Γεγονός είναι πως το κάθε στέλεχος είχε διαφορετική προτίμηση στις πηγές άνθρακα, καθώς το Vnc1 προτίμησε τους πολυσακχαρίτες (άμυλο, κυτταρίνη), το Vnc2 τη σακχαρο-αλκοόλη σορβιτόλη και τα αυτοφυή το άμυλο. Ακόμη, τα δεδομένα μας συμφωνούν και με αυτά των Imtiaj κ.α. (2007) που αναφέρουν χαμηλές τιμές ταχύτητας αύξησης του *V. voluacea* στα σάκχαρα λακτόζη και γαλακτόζη. Όσον αφορά στο άμυλο και τη γλυκόζη, έχουν αναφερθεί από τους Ofosu-Asiedu κ.α. (1984) ως οι πιο κατάλληλες πηγές άνθρακα για την αύξηση του μύκητα *V. voluacea*, ενώ αντίθετα οι Chakravarty και Mallick (1979) κατέγραψαν μεγαλύτερη αύξηση του ίδιου μύκητα όταν καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε γλυκόζη σε σύγκριση με το άμυλο. Ακόμα, οι Chang-Ho και Yee (1977) εξέτασαν διάφορες πηγές άνθρακα όπως γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη, κελοβιόζη, άμυλο και ξυλάνη σε καλλιέργεια στερεάς φάσης του *V. voluacea* και παρατήρησαν πως η μεγαλύτερη βιομάζα παράχθηκε στο υπόστρωμα του αμύλου, κατόπιν της μαννόζης και γλυκόζης και τέλος στο υπόστρωμα της ξυλόζης. Οι Torres-López και Hepperly (1988) καταγράφοντας την ανάπτυξη της αποικίας (σε μήκος και πυκνότητα) ενός αυτοφυούς στελέχους *V. voluacea* παρατήρησαν ότι αυτή ενισχύθηκε με τη χρήση των πολυσακχαριτών κυτταρίνη και άμυλο και όχι των δισακχαριτών λακτόζη και μαλτόζη. Επίσης, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν εν μέρει με αυτά της μελέτης των Fasidi και Akwakwa (1996), όπου μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στην μυκηλιακή αύξηση του μύκητα *V. speciosa* σε στερεή καλλιέργεια και αναφέρθηκε ότι μετά τη μαννιτόλη, η καλύτερη αύξηση επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση της φρουκτόζης και της μαλτόζης, εξίσου καλά αποτελέσματα έδωσαν το άμυλο και η γλυκόζη, ενώ τη μικρότερη ανάπτυξη έδωσε η σακχαρόζη.

Όσον αφορά στην κατανάλωση των ποικίλων χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων (πηγών άνθρακα) στις ζυμώσεις βυθισμένου τύπου του *V. voluacea*, τα αποτελέσματα της

παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η μεγαλύτερη κατανάλωση υπήρξε στα θρεπτικά μέσα με γλυκόζη, φρουκτόζη, άμυλο και ξυλόζη και με τη μέγιστη κατανάλωση να καταγράφεται στο τέλος της καλλιέργειας (23^η ημέρα), τόσο κατά την στατική όσο και κατά την αναδεδυόμενη καλλιέργεια. Υπό μη αναδεδυόμενες συνθήκες, ο μακρομύκητας κατανάλωσε τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη χωρίς να σημειώνονται σημαντικές διαφορές στη ποσότητα που έμεινε ακατανάλωτη, ακολούθησε η ξυλόζη και τέλος το άμυλο. Αντίθετα, σε ό,τι αφορά την αναδεδυόμενη καλλιέργεια καταναλώθηκαν κατά σειρά η φρουκτόζη, το άμυλο, η γλυκόζη και τέλος η ξυλόζη. Γενικά, τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες που υποδεικνύουν τη γλυκόζη και το άμυλο ως τα σάκχαρα που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του μυκηλίου (Tseng, 1974; Chakravarty και Mallick, 1979; Ofosu-Asiedu κ.α., 1984). Αν και η γλυκόζη θεωρείται η πιο αξιοποιήσιμη μορφή του άνθρακα για το μεταβολισμό πολλών μανιταριών, το άμυλο (πολυμερές της γλυκόζης) βρέθηκε να είναι εξίσου ικανοποιητικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα. Η προτίμηση του μύκητα στη γλυκόζη και τα πολυμερή της έχει επισημανθεί παλαιότερα και από τους Chandra και Purkayastha (1977) που ωστόσο σημείωσαν καλή ανάπτυξη και στη φρουκτόζη, αλλά όχι στη σακχαρόζη. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους Reyes κ.α. (1998) όσον αφορά στην ευνοϊκή επίδραση των πολυσακχαριτών στην αποδοτικότητα της μυκηλιακής αύξησης, έναντι των μονοσακχαριτών γαλακτόζη και γλυκόζη και των δισακχαριτών μαλτόζη και λακτόζη.

Τέλος, συνοψίζοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στην αξιολόγηση διαφόρων πηγών άνθρακα για την αύξηση του μυκηλίου των 11 εξεταζόμενων μακρομυκητών σε τρυβλία και κωνικές φιάλες, συμπεραίνεται ότι αρκετά καλή ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη, καθώς μεταβολίζεται εύκολα τόσο από τους ξυλοσηπιτικούς μύκητες λευκής σήψης: *G. lucidum*, *G. applanatum*, *A. auricula-judae*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* (Hsieh κ.α., 2005; Adejoye κ.α., 2006; Kim κ.α., 2006; Wu κ.α., 2006; Gern κ.α., 2008; Xu κ.α., 2008β; Elisashvili κ.α., 2009; Feng κ.α., 2010; Papaspyridi κ.α., 2011), όσο και από τους μύκητες αποσύνθεσης υπολειμμάτων *A. aegerita*, *V. voluacea*, *M. elata* και *M. esculenta* (Brock, 1951; Volz, 1972; Chandra και Purkayastha, 1977; Ofosu-Asiedu κ.α., 1984; Meng κ.α., 2010). Ωστόσο, πολλοί μύκητες των γενών *G. applanatum*, *G. australe*, *G. lucidum*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius* δείχνουν ιδιαίτερη ικανότητα μεταβολισμού της φρουκτόζης και της μαλτόζης (Lee κ.α., 2007), της λακτόζης (Tang και Zhong, 2002, 2003; Zhong και Tang, 2004; Chang κ.α., 2006) και της σακχαρόζης (El-Dein κ.α., 2004), ενώ η ξυλόζη δείχνει να ευνοεί την αύξηση των μυκήτων του γένους *Pleurotus* (Papaspyridi κ.α., 2010). Η ανάπτυξη των μυκήτων του γένους *Morchella*

χαρακτηρίζεται από ικανότητα μεταβολισμού ποικίλων πηγών άνθρακα, μεταξύ των οποίων καλύτερες αποδόσεις επιτυγχάνονται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν μαλτόζη, γλυκόζη, άμυλο και σακχαρόζη (Kaul, 1978; Feng κ.α., 2000; Φιλιππούσης, 2003β; Kalyoncu κ.α., 2009). Στις ίδιες πηγές άνθρακα, ιδιαίτερα στο άμυλο, αναπτύσσεται πολύ καλά και ο *V. voluacea* (Volz, 1972). Αξίζει να σημειωθεί ότι το άμυλο δεν δείχνει να ευνοεί την ανάπτυξη των μανιταριών λευκής σήψης που προαναφέρθηκαν. Τέλος, η φρουκτόζη έχει αναφερθεί ως καλή πηγή άνθρακα για την αύξηση μυκήτων των γενών *P. ostreatus*, *V. voluacea*, *A. aegerita*, *F. velutipes* και *L. edodes* (Oso, 1977; Feng κ.α., 2000; Hsieh κ.α., 2005; Shin κ.α., 2007), ενώ πτωχή ανάπτυξη στο σάκχαρο αυτό εμφάνισαν πολλοί μύκητες του γένους *Morchella* (Φιλιππούσης, 2003β).

Αν και δεν προσδιορίστηκε στα πειράματά μας η δραστηριότητα ενζύμων, από το γεγονός ότι το στέλεχος *V. voluacea* που μελετήθηκε παρουσίασε στις συνθήκες των πειραμάτων μας σημαντική κατανάλωση του αμύλου στην αναδεδυόμενη καλλιέργεια, ενώ η μαλτόζη ως μόνη πηγή άνθρακα οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή βιομάζας και μειωμένη κατανάλωση υποστρώματος θα μπορούσε να εικαστεί ότι η αποικοδόμηση του αμύλου οδηγεί κυρίως σε γλυκόζη, υποδηλώνοντας περιορισμένη δραστηριότητα του ενζύμου β-αμυλάσης που υδρολύει τους εξωτερικούς α-1,4 δεσμούς που συνδέουν τα μόρια της γλυκόζης μεταξύ τους για παραγωγή μαλτόζης. Αντίθετα, η μικρότερη κατανάλωση του αμύλου κατά τη στατική καλλιέργεια μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανάδευση και ο αερισμός επιδρούν στην αύξηση της έκκρισης των αμυλολυτικών ενζύμων (α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση, πολλουλανάση) του μύκητα. Επίσης, η πολύ μικρή κατανάλωση της μαλτόζης, τόσο στην στατική όσο και στην αναδεδυόμενη καλλιέργεια, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενεργότητα του ενζύμου α-γλυκοζιδάση, το οποίο υδρολύει τους α-1,4 δεσμούς του δισακχαρίτη μαλτόζης είναι πολύ περιορισμένη. Ακόμα, εντόπωση προκάλεσε η διαπίστωση ότι το στέλεχος του *V. voluacea* αξιοποίησε ελάχιστα τη σακχαρόζη για την ανάπτυξή του, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολία για την παρουσία ιμπερτάσης. Ωστόσο, αδυναμία αξιοποίησης της σακχαρόζης έχει αναφερθεί και στο παρελθόν για τον *G. lucidum* (Tang και Zhong, 2002)

Τα παραπάνω συμπεράσματα ενισχύονται περαιτέρω αν λάβουμε υπόψη την ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος (r_s '' g/l/d), από τα οποία επιβεβαιώνεται ότι καταναλώθηκαν γρηγορότερα το άμυλο στην αναδεδυόμενη καλλιέργεια (1,69) και ακολούθως η φρουκτόζη στην αναδεδυόμενη και στατική (1,44 και 1,35 αντίστοιχα). Αρκετά γρήγορα όμως καταναλώθηκε και η γλυκόζη και στις δύο συνθήκες καλλιέργειας (1,26 και 1,19 g/l/d αντίστοιχα), όπως και η ξυλόζη στην στατική καλλιέργεια (1,10 g/l/d). Αυτό

έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παραγόμενης βιομάζας και ενισχύει το συμπέρασμα ότι η φρουκτόζη και το άμυλο αποτέλεσαν τα πιο ευνοϊκά υποστρώματα σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας υπό συνθήκες ανάδευσης, η ξυλόζη έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στη στατική καλλιέργεια, ενώ η γλυκόζη αποτέλεσε πολύ ικανοποιητικό υποστρώμα τόσο σε συνθήκες ανάδευσης όσο και στη στατική καλλιέργεια, αποτέλεσμα αναμενόμενο καθώς όπως ήδη έχει αναφερθεί πολλοί ερευνητές χρησιμοποίησαν ως κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη στα πειράματα καλλιέργειας του *V. voluacea* (Volz, 1972; Ofosu-Asiedu κ.α., 1984; Chen κ.α., 2003). Ωστόσο, όπως διαπιστώνεται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος, ευθέως συναρτώμενη με την ειδική ταχύτητα παραγωγής βιομάζας, είναι πολύ μεγαλύτερη στις ζύμες (πχ. 4,8 και 8,4 g/l/d αναφέρεται στη ζύμη *Yarrowia lipolytica*, σε υποστρώματα γλυκόζης και γλυκερόλης αντίστοιχα) από ό,τι στους μύκητες, τιμές σαφώς εγγύτερες στα αποτελέσματα από τον δικό μας μακρομύκητα. Από την άλλη πλευρά, ιδιαίτερα ενδιαφέρον ήταν το εύρημα της παρούσας εργασίας κατά το οποίο η ταχύτητα κατανάλωσης της γλυκόζης (r_s''') αύξανε κατά τρόπο αρκετά αξιοσημείωτο στις καλλιέργειες με τους αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N (και συνεπώς με τις αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης). Η αύξηση της ταχύτητας κατανάλωσης του ανθρακούχου υποστρώματος r_s''' σε συνθήκες ενδεχόμενης παρεμπόδισης από το υπόστρωμα καθώς και περιορισμού σε άζωτο είναι αξιοσημείωτη και σε κάθε περίπτωση, αντίθετη σε σχέση με αποτελέσματα της βιβλιογραφίας που ελήφθησαν από μη-εδώδιμους μύκητες, όπως της ζύμης *Y. lipolytica* και του κατώτερου μύκητα *T. elegans* όπου η r_s''' μειωνόταν και μάλιστα κατά τρόπο ιδιαίτερα αξιοσημείωτο με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος (Paranikolaou κ.α., 2006, 2008, 2009, 2010; Chatzifragkou κ.α., 2011).

Όσον αφορά στον συντελεστή απόδοσης $Y_{X/S}$, παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη τιμή του σημειώθηκε στην αναδευόμενη καλλιέργεια του αμύλου (0,65) και της ξυλόζης (0,61). Το ίδιο φάνηκε να ισχύει και για την φρουκτόζη, καθώς στην στατική καλλιέργεια η τιμή του $Y_{X/S_{max}}$ ήταν πολύ ικανοποιητική και υψηλότερη από τον συνολικό συντελεστή απόδοσης (0,67 έναντι 0,50 αντίστοιχα) και αυτό έρχεται σε συμφωνία με την υψηλή τιμή της κατανάλωσης του υποστρώματος r_s''' . Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η υψηλή ταχύτητα κατανάλωσης (r_s''') του συγκεκριμένου υποστρώματος δεν συνοδεύτηκε με ανάλογη μετατροπή του σε βιομάζα. Στο άμυλο αλλά και στην ξυλόζη ο συντελεστής $Y_{X/S}$ εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ της στατικής και της αναδευόμενης καλλιέργειας. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι το άμυλο στην αναδευόμενη καλλιέργεια είχε διπλάσιο $Y_{X/S}$ σε σχέση με την στατική και σε συνδυασμό με την υψηλή τιμή r_s''' οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στην αναδευόμενη

καλλιέργεια όχι μόνο καταναλώθηκε με πολύ γρήγορο ρυθμό από τον μύκητα αλλά μετατράπηκε και σε μεγάλη ποσότητα βιομάζας. Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα για την ξυλόζη, καθώς οι συντελεστές $Y_{X/S}$ (0,67) και $Y_{X/S_{max}}$ (0,61) σημείωσαν υψηλές τιμές. Το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μύκητας κατανάλωσε την ξυλόζη, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αξιοποίηση υδρολυμένων λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων που παράγουν σάκχαρα πλούσια σε ξυλόζη καθώς και για παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP). Λόγω του γεγονότος ότι υπάρχουν λίγοι μικροοργανισμοί που καταναλώνουν την ξυλόζη και οι οποίοι χρησιμοποιούνται προς παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Αγγελής, 2007), το αποτέλεσμα της κατανάλωσης της ξυλόζης από τον μύκητα *V. voluacea* είναι αρκετά ενθαρρυντικό. Όμως, παρατηρήθηκε ότι η μεγάλη μετατροπή της ξυλόζης σε βιομάζα προήλθε από μικρή ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος, ενώ το αντίθετο συνέβη κατά την στατική καλλιέργεια της ξυλόζης, γεγονός που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Πιθανώς, τα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στον καταβολισμό της ξυλόζης είναι πιο ευαίσθητα στην ανάδευση και τον αερισμό σε σχέση με άλλα ένζυμα που μεταβολίζουν τις τυπικές εξόζες (π.χ. ένζυμα του τυπικού γλυκολυτικού σχήματος). Περαιτέρω, το γεγονός ότι στις περισσότερες από τις τυπικές εξόζες, ειδικά στις αναδευόμενες καλλιέργειες, ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς την αναλωθείσα εξόζη δίδει τιμές σχετικά χαμηλότερες (περί το 15-20% κ.β.) σε σχέση με την αύξηση στην ξυλόζη (βλ. Πίνακα III.21), υποδεικνύει πιθανώς ότι ο μικροοργανισμός υπό τις αναδευόμενες συνθήκες προέβη σε ανάλωση της ξυλόζης κυρίως μέσω του μονοπατιού της κετολάσης (το οποίο αποδίδει 1,3 moles ακέτυλο-CoA ανά 100 g ξυλόζης) σε σχέση με αυτό των φωσφορικών πεντοζών (το οποίο αποδίδει 1,0 mole ακέτυλο-CoA ανά 100 g ξυλόζης - μέσω του τυπικού γλυκολυτικού σχήματος, από 100 g εξόζης παράγονται 1,1 moles ακέτυλο-CoA). Από την άλλη πλευρά, στις στατικές καλλιέργειες που πραγματοποιούνται στην ξυλόζη, παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες βιομάζας (σε g/l) που προσεγγίζουν τις τιμές αυτών της φρουκτόζης ή της γλυκόζης, με μικρότερους όμως συντελεστές απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν σάκχαρο σε σχέση με τις εξόζες, υποδεικνύοντας για τις στατικές καλλιέργειες μεταβολισμό μέσω του σχήματος των φωσφορικών πεντοζών.

Όσον αφορά στην επίδραση διαφόρων πηγών αζώτου (πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, ουρία, $(NH_4)_2SO_4$, γλυκίνη, NH_4NO_3 , NH_4HCO_3 , $NaNO_3$, τρυπτοφάνη και L-γλουταμινικό οξύ) στη αύξηση του μυκηλίου του *V. voluacea* 190 που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, φάνηκε ότι η ουρία είχε την μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης, αλλά η πυκνότητα των μυκηλίων στα τρυβλία που περιείχαν την ουρία ήταν πολύ μικρότερη από αυτή των τρυβλίων που περιείχαν πεπτόνη (είχε το πυκνότερο μυκήλιο) και εκχύλισμά ζύμης (είχε το

δεύτερο πυκνότερο μυκήλιο). Στις υπόλοιπες πηγές αζώτου, η πυκνότητα σήνηδε με την ταχύτητα (εκτός από τον μάρτυρα που επίσης είχε πολύ λεπτό μυκήλιο). Οι Moonmoon κ.α. (2008) στη μελέτη τους σχετικά με την επίδραση διαφόρων πηγών αζώτου στην αύξηση του μυκηλίου του μύκητα *V. voluacea* ανάμεσα σε πέντε πηγές αζώτου (πειπόννη, NaNO_3 , NH_4NO_3 , εκχύλισμα ζύμης και ουρία) μέτρησαν την μεγαλύτερη ταχύτητα γραμμικής αύξησης στα τρυβλία που περιείχαν πειπόννη (7,05 mm/ημέρα, τιμή παρόμοια με της παρούσας μελέτης). Ακολούθησε το εκχύλισμα ζύμης (6,12 mm/ημέρα, επίσης παρόμοια τιμή) και το NaNO_3 με τιμή 5,37 mm/ημέρα, ενώ στο NH_4NO_3 και στην ουρία η αύξηση ήταν σχεδόν μηδενική. Η ουρία επίσης όπως και το NaNO_3 δεν ευνόησαν την ανάπτυξη ενός αυτοφυούς στελέχους *V. voluacea* σύμφωνα με τους Torres-López και Hepperly (1988), σε αντίθεση με την πειπόννη και το εκχύλισμα ζύμης όπου καταγράφηκε η μεγαλύτερη διάμετρος αποικίας και το πιο πυκνό μυκήλιο. Όσον αφορά στην ουρία, στην μελέτη των Reyes κ.α. (1998) ο μύκητας *V. voluacea* είχε χαμηλή έως μέτρια αύξηση ενώ και άλλοι μύκητες όπως οι *G. lucidum*, *Schizophyllum commune* και *M. procerum* αναπτύσσονταν πολύ καλά στην ουρία (Jayasinghe κ.α., 2008; Imtiaj κ.α., 2008; Shim κ.α., 2005). Ακόμα, σύμφωνα με τους Reyes κ.α. (1998) το εκχύλισμα σόγιας, η πειπόννη και η γλυκίνη έδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα για όλα τα στελέχη. Επίσης, ο μύκητας *Volvariella speciosa* σε μελέτη για την αύξηση του μυκηλίου σε διάφορες πηγές αζώτου όπου μετρήθηκε το βάρος (επί ξηρού) του μυκηλίου, έδειξε ότι μπορεί να αναπτυχθεί κάλλιστα σε καλλιέργειες στερεού υποστρώματος που περιέχουν ουρία ως πηγή αζώτου ($73 \text{ mg}/30\text{cm}^3$), όπου βέλτιστα αποτελέσματα έδωσε η τρυποφάνη με $177 \text{ mg}/30\text{cm}^3$ (Kurtzman και Chang-Ho, 1982; Fasidi και Akwakwa, 1996). Ακόμα, στην παρούσα εργασία υπάρχει μέτρια ανάπτυξη και στις καλλιέργειες με πηγή αζώτου το NH_4NO_3 , ενώ αντίθετα το NaNO_3 και το L-γλουταμινικό οξύ είχε μηδενική ανάπτυξη. Για τις πηγές αζώτου NH_4NO_3 και NaNO_3 , η μελέτη των Reyes κ.α. (1998) παρουσιάζει για κάποια από τα στελέχη του *V. voluacea* πολύ χαμηλή ανάπτυξη και για κάποια αρκετά μεγάλη συνεπώς δε μπορεί να προκύψει ένα τελικό συμπέρασμα για το εάν οι πηγές αυτές επιδρούν αρνητικά ή θετικά στην αύξηση του μύκητα. Αντίθετα, οι Chandra και Purkayastha (1977) υποστήριξαν ότι ο μύκητας αναπτύχθηκε πολύ καλά σε γλουταμινικό οξύ και οι Garcha κ.α. (1979) υποστήριξαν το ίδιο για την ανόργανη πηγή αζώτου NH_4NO_3 . Στην παρούσα μελέτη ο *V. voluacea* είχε στο γλουταμινικό οξύ μηδενική αύξηση, αλλά στο NH_4NO_3 παρουσίασε καλή πυκνότητα μυκηλίου. Για τις ανόργανες αζωτούχες πηγές $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και NH_4HCO_3 δε βρέθηκαν μελέτες που να βεβαιώνουν ή όχι την μεγάλη ταχύτητα αύξησης του *V. voluacea* που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, παρά μόνο μαρτυρία για πολύ καλή ανάπτυξη του ίδιου μύκητα (μέτρηση παραγωγής βιομάζας

μετρημένη σε g ξηρής βιομάζας) σε στερεές καλλιέργειες που περιείχαν τις πηγές αυτές (Volz, 1972). Επίσης, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε μικρή ανάπτυξη του μυκητομύκητα σε στερεά υποστρώματα που περιείχαν τρυπτοφάνη (επιβεβαιώνοντας εν μέρει και την πολύ χαμηλή έως μηδενική αύξηση του *V. voluacea* και στην παρούσα μελέτη).

Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη διαφόρων μακρομυκήτων υπό την επίδραση ποικίλων πηγών αζώτου έχει εξεταστεί σε υγρές καλλιέργειες όπου παρατηρήθηκε π.χ. για το *G. lucidum* προτίμηση στην πειπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης (Hsieh κ.α., 2006), για τον *P. pulmonarius* στο NaNO_3 (El-Dein κ.α., 2004). Κατά τον Brock (1951) πηγές αζώτου όπως ασπαραγίνη, ουρία, πειπτόνη, γλουταμινικό οξύ, αμμωνιακά άλατα, νιτρικό νάτριο, νιτρώδες νάτριο και καυστικό νάτριο είναι καλές πηγές αζώτου για την μυκηλιακή αύξηση των μυκήτων *M. conica*, *M. deliciosa*, *M. hybrida*, *M. esculenta*, *M. angusticeps* και *M. crassipes* σε υγρές ζυμώσεις. Αργότερα, ο Φιλιπούσης (2003β) χρησιμοποίησε το ίδιο θρεπτικό μέσο με τον Brock και έδειξε ότι η πειπτόνη, το τρυγικό αμμώνιο, η ουρία, η αλανίνη, το ασπαραγινικό οξύ και το νιτρικό νάτριο ευνοούν την ανάπτυξη του μυκηλίου, η οποία όμως δεν πραγματοποιείται με το γλουταμινικό οξύ και το χλωριούχο αμμώνιο. Τέλος, η κυστεΐνη, η ασπαραγίνη και το νιτρώδες νάτριο έδειξαν αρνητική επίδραση στην παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας. Γενικά, πάντως παρατηρήθηκε ότι οι οργανικές πηγές αζώτου αυξάνουν την παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τις ανόργανες (Brock, 1951; Kaul, 1977; Φιλιπούσης, 2003β). Οι Meng κ.α. (2010) δοκίμασαν να καλλιεργήσουν τον μύκητα *M. esculenta* σε διάφορες πηγές αζώτου συμπεραίνοντας ότι το εκχύλισμα ζύμης και το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ είναι αυτές που ωθούν τον μύκητα να δώσει την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (6,3-6,5 g/l). Συμπερασματικά, μετά από μελέτη πολλών πηγών αζώτου φαίνεται ότι οι οργανικές πηγές είναι πιο ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μυκηλίου των περισσότερων ειδών μακρομυκήτων από ό,τι οι ανόργανες, ωστόσο ορισμένα είδη (π.χ. *G. lucidum*, *Agaricus nevoii*, *Inonotus levis*) μπορούν να αναπτυχθούν εξίσου καλά και σε ανόργανες πηγές (Jayasinghe κ.α., 2008; Elisashvili κ.α., 2009). Σημειώνεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η ποσότητα στην οποία προστίθεται η πηγή αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, καθώς υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν μείωση ως και ανάσχεση της μυκηλιακής αύξησης (Torres-López και Herperly, 1987; Chang-Ho, 1980).

Τα αποτελέσματά μας σχετικά με την θετική επίδραση του υψηλού λόγου C/N=60:1 στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας του *V. voluacea* είναι σε συμφωνία με διάφορα βιβλιογραφικά δεδομένα, τόσο σε στερεά όσο και σε υγρά θρεπτικά μέσα. Στο παρελθόν, οι Torres-López και Herperly (1987) που καλλιεργήσαν του *V. voluacea* σε τρυβλία με διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου (λόγοι 15, 30, 60), κατέγραψαν μέγιστη γραμμική αύξηση στον

λόγο 60:1, μέτρια στον 30:1 και ελάχιστη στον 15:1 και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για τον *V. voluacea* καταλληλότερος είναι ο λόγος C/N=60:1. Ακόμη, οι Moonmoon κ.α. (2008) μελέτησαν την ταχύτητα αύξησης του *V. voluacea* σε τρυβλία με διάφορες αναλογίες άνθρακα (γλυκόζη) - αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) όπως 6:1, 12:1, 18:1, 24:1, 36:1, 48:1 και 96:1. Η ταχύτητα στους λόγους αυτούς αυξανόταν μέχρι τον 36:1 (μέγιστη ταχύτητα) και μετά από αυτόν μειωνόταν, χωρίς ωστόσο οι τιμές να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Στην παρούσα μελέτη, όπου εξετάστηκε η επίδραση αυξανόμενης συγκέντρωσης γλυκόζης (C/N=20, 30, 40 και 60) στην παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων του *V. voluacea* σε ζυμώσεις βυθισμένου τύπου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο λόγος 60:1 ήταν ο βέλτιστος για την ανάπτυξη του μακρομύκητα, καθώς παράχθηκε η μέγιστη μυκηλιακή μάζα (21,4 g/l), ακολούθησαν χωρίς να διαφέρουν μεταξύ τους οι 40:1 (16,7 g/l) και 30:1 (16,6 g/l) και τέλος ο λόγος 20:1 (13,8 g/l). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο C/N=20, αν και ήταν ο λιγότερο παραγωγικός σε ό,τι αφορά τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας, εμφάνισε (μαζί με τον C/N=30) ταχύτερη παραγωγή μυκηλιακής μάζας σε σχέση τις καλλιέργειες στους λοιπούς λόγους (μέγιστη βιομάζα την 14^η ημέρα, ενώ στους άλλους δυο λόγους την 23^η). Αυτό το οποίο θα πρέπει να τονιστεί πάντως στις ανωτέρω καλλιέργειες σχετίζεται με το γεγονός ότι, ενώ οι καλλιέργειες σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης όπου διατηρήθηκε σταθερή η αρχική συγκέντρωση αζώτου συνοδεύτηκαν από αύξηση της παραγόμενης ξηράς μυκηλιακής μάζας (σε g/l), ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν σάκχαρο $Y_{X/Glc}$ μειώθηκε ουσιωδώς με την αύξηση του αρχικού λόγου C/N, πιθανώς λόγω παρεμπόδισης εκ της χρησιμοποιούμενης γλυκόζης (σε ορισμένες τιμές η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν αρκετά υψηλή π.χ. >90 g/l). Σε μελέτες που αφορούν άλλους μακρομύκητες, οι Besralova κ.α. (2002) κατά την καλλιέργεια διαφόρων στελεχών *P. ostreatus* σε τρυβλία και κωνικές φιάλες κατέγραψαν σημαντικά μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε λόγο C/N=40 από ό,τι σε 15. Ακόμα, οι Gern κ.α. (2008) κατά την καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε υγρό θρεπτικό μέσο γλυκόζης κατέγραψαν αύξηση της βιομάζας από τα 20 στα 40 g/l γλυκόζης και η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν μόνο 67%, αν και η ποσότητα του οργανικού αζώτου είχε αυξηθεί, αναφέροντας ότι η τελική αύξηση στην βιομάζας σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης και όχι του αζώτου. Ακόμα, οι Fang και Zhong (2002a) σε μελέτη τους στον *G. lucidum* διαπίστωσαν ότι αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης από 20 έως 50 g/l είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση και της παραγόμενης βιομάζας, ωστόσο περαιτέρω αύξηση στα 65 g/l προκάλεσε μείωσή της, εξηγώντας το φαινόμενο αυτό στη παρεμπόδιση λόγω υψηλής οσμωτικής πίεσης. Ωστόσο, για άλλους μακρομύκητες έχουν αναφερθεί υψηλές αποδόσεις σε μυκηλιακή μάζα σε χαμηλούς λόγους C/N, όπως π.χ. C/N

10-20 για είδη του γένους *Morchella* (Litchfield κ.α. 1963; El-Wakeil κ.α., 1982; Feng κ.α., 2000). Ακόμη, σε πιο πρόσφατη μελέτη (Φιλιππούσης, 2003β) διαπιστώθηκε διαφοροποίηση μεταξύ του ανοιχτόχρωμου είδους *M. esculenta* (καλύτερη ανάπτυξη σε λόγους C/N 10:1-24:1) σε σχέση με το σκουρόχρωμο *M. elata* (ευνοείται σε υψηλότερες τιμές του λόγου C/N 24:1- 44:1). Ακόμα, οι Wu κ.α. (2004), εξετάζοντας την παραγωγή βιομάζας του μύκητα *Pleurotus tuber-regium* σε διάφορους λόγους C/N (6:1, 12:1, 18:1, 24:1, 36:1, 48:1, 96:1) υποστήριξαν ότι την μέγιστη παραγωγή την είχε στο λόγο 24:1. Συμπερασματικά, η καταλληλότητα του λόγου C/N για τη μυκηλιακή αύξηση εξαρτάται από το είδος του μακρομύκητα, καθώς και τις χρησιμοποιούμενες πηγές άνθρακα και αζώτου. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η καλλιέργεια του *V. voluacea* σε στερεά υποστρώματα για την παραγωγή καρποφοριών γίνεται σε ελαφρώς ζυμωμένα άχυρα ρυζιού ή υπολείμματα βαμβακιού χωρίς την προσθήκη επιπλέον αζώτου, καθώς φαίνεται ότι ο καταλληλότερος λόγος C/N για την ανάπτυξή του είναι 45-50, αν και η μέγιστη διάσπαση της κυτταρίνης επιτεύχθηκε σε C/N=24-36 (Chang-Ho και Yee, 1977).

Τέλος, τα δεδομένα από τις καλλιέργειες του *V. voluacea* σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης έδειξαν ραγδαία μείωση του συντελεστή απόδοσης βιομάζας $Y_{X/Glc}$ (από ~0,55-0,60 g/g για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l σε ~0,27-0,29 g/g για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 95 g/l). Το ανωτέρω φυσιολογικό δεδομένο προφανώς συνδέεται με φαινόμενα παρεμπόδισης από το υπόστρωμα (γλυκόζης) για τις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης λόγω της αυξημένης οσμωτικής πίεσης, με απόρροια ανάληψη μέρους της διαθέσιμης γλυκόζης προς κάλυψη της ενέργειας συντήρησης (energy of maintenance requirements) των μυκηλίων του μικροοργανισμού. Σε ακριβώς αντίστοιχες παρατηρήσεις οδηγήθηκαν και οι Tang και Zhong (2002) οι οποίοι πραγματοποίησαν καλλιέργειες του μύκητα *G. lucidum* σε υποστρώματα με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση λακτόζης και ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας προς αναλωθείσα λακτόζη μειώθηκε από 0,40 g/g σε 0,28 g/g όταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης αυξήθηκε από τα 20 στα 65 g/l. Σε αντίστοιχα αποτελέσματα οδηγήθηκαν και οι Fang και Zhong (2002) σε μελέτη τους για τον ίδιο μύκητα και για αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης από 20 έως 65 g/l. Περαιτέρω, αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και κατά την καλλιέργεια του *T. sinense* σε υποστρώματα με βάση τη σακχαρόζη σε υγρές καλλιέργειες αναδεδυόμενων φιαλών. Η συγκέντρωση της ξηράς μυκηλιακής μάζας αυξήθηκε αξιοσημείωτα (από 12,5 σε 24,0 g/l) όταν η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης αυξήθηκε από τα 20 στα 125 g/l, αλλά ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας

παρουσίασε κατακόρυφη πτώση (από 0,60 σε 0,28 g/g), προφανώς λόγω παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος (Tang κ.α., 2008).

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, ένα πλήθος πολυσακχαριτών έχει απομονωθεί από μύκητες και ιδιαίτερα από φαρμακευτικά μανιτάρια (Tabata κ.α., 1981; Lee και Kang, 1996; Kim κ.α., 1999; Tang κ.α., 2011). Έρευνες έχουν δείξει ότι οι πολυσακχαρίτες των μυκήτων κατέχουν πολλές ενδιαφέρουσες βιολογικές λειτουργίες όπως αντικαρκινική, αντιιική, αντιμικροβιακή, ανοσοδιεγερτική ή άλλη φαρμακευτική δράση και συμβάλουν σημαντικά στην πρόληψη πολλών σοβαρών ασθενειών. Πολλοί βασιδιομύκητες περιέχουν τέτοιους βιολογικά ενεργούς πολυσακχαρίτες (Wasser και Weis, 1999). Εν τω μεταξύ, πολλές φαρμακευτικές βιομηχανίες έχουν δείξει μεγάλο ενδιαφέρον στην παραλαβή, επεξεργασία και τυποποίηση ορισμένων πολυσακχαριτών λόγω των παραπάνω δράσεων τους και ιδιαίτερα του μορίου της β-γλυκάνης, ενός πολυσακχαρίτη ο οποίος θεωρείται ότι έχει σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες και βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του μυκηλίου.

Μέχρι πρόσφατα, περιοριστικό στοιχείο της διαδεδομένης χρήσης των βιοδραστικών πολυσακχαριτών των μανιταριών ήταν το γεγονός ότι οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες (EPS) παραλαμβάνονταν από το καρπόσωμα του μακρομύκητα, ο οποίος αναπτυσσόταν σε στερεή φάση και η καλλιέργειά του διαρκούσε για μεγάλο χρονικό διάστημα ενώ υπήρχε εξίσου μεγάλη δυσκολία στον έλεγχο της ποιότητας. Εν αντιθέσει, οι σύγχρονες μελέτες στρέφουν την προσοχή τους στην παραλαβή φαρμακευτικών πολυσακχαριτών από το μυκήλιο των μακρομυκήτων που αναπτύσσεται σε καλλιέργειες βυθού (Das κ.α., 2010). Οι καλλιέργειες βυθού έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των στερεών ζυμώσεων όπως είναι η σύντομη διάρκεια της καλλιέργειας, τα χαμηλά κόστη παραγωγής, ο καλύτερος έλεγχος των συνθηκών ανάπτυξης, το υψηλότερο ποσοστό παραγωγής, καθώς επίσης και η ευκολότερη διαδικασία παραλαβής (Lee κ.α., 2004).

Όσον αφορά στο υπόστρωμα που ευνοεί την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS), είναι γενικά αποδεκτό ότι η γλυκόζη και οι οργανικές πηγές αζώτου (π.χ. πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, εκχύλισμα καλαμποκιού) ευνοούν την παραγωγή EPS στους ανώτερους μύκητες (Manu-Tawiah και Martin, 1987; Burns κ.α., 1994; Fasidi και Olorunmaiye, 1994; Wang κ.α., 2005; Gern κ.α., 2008; Elisashvili κ.α., 2009). Οι Zhou κ.α. (2009) ανέφεραν ότι ο συνδυασμός γλυκόζης και πεπτόνης είχε τη θετικότερη επίδραση στη παραγωγή EPS του *Grifola umbellata*, ενώ οι Meng κ.α. (2010) σε καλλιέργεια του *M. esculenta* παρέλαβαν τους περισσότερους EPS με γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης. Οι Fang και Zhong (2002α) από την άλλη, υποστήριξαν ότι συνδυασμός πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης βελτίωσε τη παραγωγικότητα των EPS στον *G. lucidum*. Ακόμα, οι Elisashvili κ.α. (2009) σε μελέτη τους σε

οκτώ βασιδιομόκητες (μεταξύ των οποίων και οι *G. lucidum*, *P. dryinus* κ.α.) βρήκαν ότι οι γλυκόζη, μαλτόζη και μαννιτόλη ήταν οι πιο κατάλληλες πηγές άνθρακα για παραγωγή βιομάζας και EPS.

Από τη διερεύνηση της επίδρασης 4 θρεπτικών μέσων στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από τους 11 μακρομύκητες δείχθηκε ότι η βιοσύνθεσή τους ευνοήθηκε περισσότερο στο θρεπτικό μέσο γλυκόζης/πεπτόνης/εκχυλίσματος ζύμης (GPY) σε σχέση με το GPYS που έδειξε να ευνοεί την παραγωγή βιομάζας στους περισσότερους μακρομύκητες, υποδεικνύοντας ότι τα προσθετικά (μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία) δεν παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο στη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, ανάλογο τουλάχιστον με τη θετική τους επίδραση στην παραγωγή βιομάζας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι η βιοσύνθεση των EPS μεγιστοποιήθηκε στα θρεπτικά μέσα που δεν ευνόησαν τη μεγάλη παραγωγή βιομάζας και αντίστροφα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όλων των μυκήτων, από την οποία αναδείχθηκε η αρνητική συσχέτιση της παραγωγής βιομάζας με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Ανάλογα συμπεράσματα έχουν προκύψει από παρόμοιου τύπου μελέτες για τον μακρομύκητα *G. lucidum* (Hsieh κ.α., 2005; 2006). Ωστόσο, διαφορετική συμπεριφορά με υψηλή παραγωγή EPS σε συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας έχουν επιδείξει στελέχη των μυκήτων *P. pulmonarius* (El-Dein κ.α., 2004) και *A. auricula-judae* (Wu κ.α., 2006). Η ισχυρή αυτή ένδειξη ότι υφίσταται διαφορετική επίδραση της φύσης και της σύνθεσης του θρεπτικού υποστρώματος στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας και στη βιοσύνθεση EPS, ενισχύεται περαιτέρω από τα ευρήματα και άλλων εργασιών που αναφέρονται κυρίως στο *G. lucidum* (Tang και Zhong, 2002; Papinutti κ.α., 2010). Αναλυτικότερα, οι Tang και Zhong (2002) μελετώντας τον *G. lucidum* σε υπόστρωμα λακτόζης αναφέρουν ότι το σάκχαρο ευνόησε την παραγωγή βιομάζας, αλλά όχι αυτή των EPS. Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Tang κ.α. (2008) κατά την καλλιέργεια του *T. sinense* σε ανακινούμενες φιάλες όπου διαπίστωσαν ότι η σακχαρόζη ευνόησε την παραγωγή βιομάζας αλλά όχι την παραγωγή EPS. Ακόμη, ανάλογες περιπτώσεις αρνητικής σχέσης μεταξύ της παραγωγής βιομάζας και της συσσώρευσης εξωπολυσακχαριτών έχουν αναφερθεί και για τον *G. lucidum*, η παραγωγή βιοδραστικών EPS του οποίου έχει μελετηθεί εκτενώς (Yang και Liao, 1998).

Από τα δεδομένα των πειραμάτων μας προκύπτει ότι υψηλή παραγωγή εξωπολυσακχαριτών σημειώνεται στα πρώιμα στάδια της καλλιέργειας (8^η, 12^η ημέρα), όπου η παραγωγή ξηράς βιομάζας ήταν περιορισμένη. Αντίθετα, όσο εξελισσόταν η καλλιέργεια και αυξανόταν η συγκέντρωση της παραγόμενης μυκηλιακής μάζας, βαθμιαία (ή/και απότομα) λάμβανε χώρα μείωση της συγκέντρωσης των παραγόμενων EPS (πιθανώς

πραγματοποιείται αποικοδόμηση αυτών). Φαίνεται όμως πως η αποικοδόμηση αυτή δε σχετιζόταν με έλλειψη υποστρώματος από το περιβάλλον αύξησης, αφού στις περισσότερες από τις καλλιέργειες η συγκέντρωση των σακχάρων (π.χ. στις περιπτώσεις της γλυκόζης, σακχαρόζης, ξυλόζης) ήταν αρκετά υψηλή όταν λάμβανε χώρα η βιο-αποικοδόμηση των EPS. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενες σχετικές αναφορές που κατέγραψαν σταθεροποίηση ή και μείωση των EPS μεταξύ 8^{ης} και 12^{ης} ημέρας για τους *G. lucidum* και *G. applanatum* (Lee κ.α., 2007; Tang και Zhong, 2003; El-Dein κ.α., 2004; Hsieh κ.α., 2005, 2006) ή και ακόμα νωρίτερα για τους *A. auricula-judae* (Wu κ.α., 2006) και *G. lucidum* (Yang και Liao, 1998). Ωστόσο, αν και στη βασική καλλιέργεια του *G. lucidum* η μείωση των EPS άρχισε αρκετά νωρίς (7^η ημέρα), τροφοδότησή της με επιπλέον γλυκόζη ενδυνάμωσε την παραγωγή των EPS για τρεις ακόμα ημέρες, οπότε και η συγκέντρωσή τους άρχισε να μειώνεται (Wagner κ.α., 2004). Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι η ανάδευση είχε θετική επίδραση στην παραγωγή των EPS, γεγονός που συμφωνεί με αρκετές εργασίες, πιθανώς λόγω καλύτερης οξυγόνωσης των κυττάρων (Zhong και Tang, 2004), ακόμα και για τον *G. applanatum* που εμφάνισε χαμηλότερη βιομάζα σε αναδεδυόμενες συνθήκες. Ωστόσο, αν και η ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm θεωρήθηκε ιδανική για την παραγωγή EPS σε φιάλες στον μακρομύκητα *G. lucidum* (Yang και Liao, 1998) υψηλότερη ταχύτητα ανάδευσης (έως 400 rpm σε 2-l βιοαντιδραστήρα) είχε αρνητική επίδραση, πιθανώς λόγω αυξημένων διατμητικών τάσεων του μυκηλίου. Σε άλλες περιπτώσεις ωστόσο π.χ. στον *V. voluacea* δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην παραγωγή EPS υπό στατικές ή αναδεδυόμενες συνθήκες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις π.χ. *P. pulmonarius* η ανάδευση είχε αρνητική επίδραση. Όπως έχει προαναφερθεί, η μορφολογία του μυκηλίου (μυκηλιακές υφές/mycelial clumps ή σφαιρίδια/pellets) κατά την αύξηση των μυκήτων σε υγρές καλλιέργειες επιδρά, εκτός από την ποσότητα της βιομάζας και στη ποσότητα των παραγόμενων EPS. Οι Park κ.α. (2002) ανέφεραν ότι ο σχηματισμός σφαιριδίων (χαρακτηριστικό αναδεδυόμενης καλλιέργειας σε μέτρια ταχύτητα) ευνόησε την σύνθεση EPS στον *C. militaris*, ενώ οι Lee κ.α. (2004) υποστήριξε το αντίθετο για τον *G. frondosa*, όπως και οι Feng κ.α. (2010) για τους EPS του *L. edodes*.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο διαχωρισμός των μυκήτων που μελετήθηκαν σε ομάδες, ανάλογα με τον χρόνο παραγωγής της μέγιστης τιμής των EPS και την προτίμησή τους στις συνθήκες ανάδευσης. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι *A. aegerita*, *G. applanatum*, *F. velutipes* και *M. esculenta* η παραγωγή EPS των οποίων έδειξε να ευνοείται σε συνθήκες ανάδευσης, στη δεύτερη ανήκει ο *P. pulmonarius* που δε φάνηκε να επηρεάζεται από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης και στη τρίτη ο *V. voluacea* που έδειξε μεγιστοποίηση παραγωγής σε στατικές

φιάλες. Ωστόσο, παρά τα γεγονόσ ότι η παραγωγή των EPS στην παρούσα μελέτη δεν έγινε σε αριστοποιημένες συνθήκες, οι τιμές τους ήταν άξιες σύγκρισης με τη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς στους μακρομύκητες *L. edodes*, *G. lucidum*, *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *A. auricula-judae*, *P. pulmonarius* και *V. volvacea* οι μέγιστες τιμές τους κυμαίνονταν από 1,00 g/l (*P. pulmonarius*) μέχρι 1,77 g/l (*L. edodes*). Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις η παραγωγή EPS ήταν αξιόλογη παρά την περιορισμένη ποσότητα παραγόμενης βιομάζας, π.χ. στον *G. lucidum* ή στον *L. edodes* στο υπόστρωμα GPY (από 0,8 g/l και 3,5 g/l βιομάζας αντίστοιχα παράχθηκαν ~1,62 g/l EPS).

Η παραγωγή EPS από φαρμακευτικά μανιτάρια έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών. Οι Maziero κ.α. (1999), σε μελέτη 56 ειδών βασιδιομυκήτων σε ζυμώσεις βυθού διάρκειας 7 και 14 ημερών, με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (39 g/l), στους 25 °C και ταχύτητα ανακίνησης 150 rpm, παρατήρησαν ότι τα είδη *F. velutipes*, *L. edodes* και *P. ostreatus*, την 7^η και 14^η ημέρα της καλλιέργειας παράγααν EPS συγκέντρωσης 1,05 g/l, 0,49 g/l και 0,57 g/l (7^η ημέρα) και 1,74 g/l, 1,18 g/l και 0,32 g/l (14^η ημέρα) αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες τιμές για τα στελέχη *F. velutipes* (κυρίως) και *L. edodes* είναι πολύ υψηλότερες από εκείνες του δικού μας πειράματος, ενώ για το στέλεχος *P. ostreatus* οι τιμές είναι παρόμοιες. Για το είδος *P. ostreatus* επίσης αναφέρεται από τους Gern κ.α. (2008) ότι η μέγιστη παραγωγή πολυσακχαριτών προσδιορίστηκε στα 20 mg/l/d, σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης τα 40 g/l και εκχύλισμα ζύμης (5 g/l) σε ανακινούμενη φάση (120 rpm). Όσον αφορά στο είδος *P. pulmonarius*, οι El-Dein κ.α. (2004) κατέγραψαν τη μέγιστη παραγωγή EPS (280 mg/100 ml) σε ζύμωση διάρκειας 10 ημερών με μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου τη γλυκόζη (5,5% β/ο) και το νιτρικό κάλιο (0,4% β/ο), τιμή κατώτερη των δικών μας αποτελεσμάτων. Άξιο αναφοράς από τους ίδιους μελετητές είναι ότι το συγκεκριμένο είδος μύκητα φάνηκε να έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί ένα μεγάλο αριθμό σακχάρων εκ των οποίων η γλυκόζη ευνόησε την παραγωγή EPS, ενώ η σακχαρόζη την παραγωγή βιομάζας. Για το είδος *A. auricula-judae* (Wu κ.α., 2006) σε ιδανικές συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία 28 °C, pH 5,4, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 40 g/l και χρήση πειπόνης/εκχυλίσματος ζύμης) παράχθηκαν 2,0-2,5 g/l EPS, τιμή αρκετά μεγαλύτερη από τη δική μας (0,48 g/l). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε βιοαντιδραστήρα 7-l stirred η ποσότητα των παραγόμενων EPS αυξήθηκε σε 4,5 g/l. Κατά την καλλιέργεια του μύκητα *M. esculenta* σε υπόστρωμα γλυκόζης, η βέλτιστη παραγωγή EPS (2318,52 μg/ml) σημειώθηκε στην ίδια αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (30 g/l) και σε παρόμοια θερμοκρασία (25 °C), αλλά σε αναδευόμενες φιάλες (150 rpm) και κατά τη διάρκεια 5 ημερών (Xu κ.α., 2008α). Η συγκεκριμένη όμως συγκέντρωση θεωρείται πολύ υψηλή για τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Σχετικά με το μύκητα *G. lucidum*, υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές για την παραλαβή EPS σε καλλιέργειες βυθού. Με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης του υποστρώματος από 20 έως 30 g/l, η παραγωγή των EPS μπορεί να φτάσει τα 3,02 g/l, ενώ ο συντελεστής $Y_{EPS/X}$ την τιμή 0,19 (Zhang κ.α., 2007). Παρομοίως, οι Babitskaya κ.α. (2005) ανέφεραν ότι οι συνθήκες παραγωγής EPS βελτιστοποιήθηκαν (4 - 4,8 g/l) στους 25-30 °C, με αρχικό pH 4 - 6, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/l και C/N ίσο με 25, καθώς και ότι ο έντονος αερισμός ευνόησε μονάχα την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και για αυτό προτάθηκε μια μέση ταχύτητα ανάδευσης στα 100 rpm. Αντιθέτως, οι Chang κ.α. (2006) ανέφεραν ως βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του *G. lucidum* τους 34 °C, σε pH 6,5 και ανακίνηση 160 rpm, με κύρια πηγή άνθρακα ακατέργαστη ζάχαρη στα 71,4 g/l. Η μέγιστη τιμή που σημειώθηκε για τους παραχθέντες EPS σε αυτές τις συνθήκες ήταν 0,42 g/l. Επιπρόσθετα, οι Hsieh κ.α. (2005, 2006) σχολίασαν για το συγκεκριμένο μύκητα ότι η προσθήκη γλυκόζης ευνόησε περισσότερο την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών σε σχέση με άλλες πηγές άνθρακα (με τη προσθήκη 60 g/l γλυκόζης αυξήθηκε σημαντικά η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών - 1,69 g/l). Οι Fang και Zhong (2002α,β) συμπέραναν ακόμα σε καλλιέργεια του *G. lucidum* ότι όσο μειωνόταν το pH (μέχρι το 3,5) αυξανόταν αξιοσημείωτα η παραγωγή των EPS, η μέγιστη τιμή των οποίων έφτασε το ~1,0 g/l σε κλειστού τύπου καλλιέργεια σε αναδεδόμενες φιάλες, ενώ συγκέντρωση ~1,5 g/l επιτεύχθηκε από τους Stajić κ.α. (2011) για άλλο στέλεχος του ίδιου μύκητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη ποσότητα παραγόμενων EPS από τον *G. lucidum* που έχει αναφερθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία ήταν 5,7 g/l, όταν γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε σε ημισυνεχή καλλιέργειά του σε αναδεδόμενες φιάλες (Wagner κ.α., 2004). Επίσης, για το είδος *G. applanatum* αναφέρεται από τους Lee κ.α. (2007) ότι οι πηγές άνθρακα μαλτόζη και γλυκόζη είχαν τη θετικότερη επίδραση στην παραγωγή EPS (1,35 g/l και 1,25 g/l αντίστοιχα) και η υψηλή παραγωγή παρατηρήθηκε τις αρχικές μέρες της ζύμωσης (8^η με 12^η ημέρα), σε μέτρια θερμοκρασία (25 °C) και σε υψηλές συγκεντρώσεις άνθρακα (60 g/l). Οι τιμές που προέκυψαν ήταν υψηλότερες από εκείνες του παρόντος πειράματος. Ακόμα, όπως έχει αναφερθεί από τους Tang κ.α. (2008), η παραγωγή EPS από τον *T. sinense* στις 120 rpm μεγιστοποιήθηκε παρουσία λακτόζης, σε αντίθεση με τη βιομάζα όπου καταγράφηκαν οι χαμηλότερες τιμές, ενώ επιπλέον σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της λακτόζης (από 20 σε 125 g/l) παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση των παραγόμενων EPS. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη λιπαρών υλών (π.χ. φυτικών ελαίων, λιπαρών οξέων) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας έχει αναφερθεί ότι εκτός από τη βιομάζα, προάγει και τη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Παραδείγματα αποτελούν η προσθήκη παλμιτικού οξέος στην καλλιέργεια του *G. lucidum* (Yang κ.α., 2000) και ηλιελαίου

σπου *C. militaris* (Park κ.α., 2002). Από όλες τις παραπάνω μελέτες για την παραγωγή EPS σε υγρές καλλιέργειες, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρουσίασαν παρόμοιες ή και καλύτερες τιμές, ενώ όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι καλλιέργειές μας δεν είχαν αριστοποιηθεί υποδεικνύοντας τη δυναμική των χρησιμοποιούμενων αυτών στελεχών προς αυτού του είδους τη βιοδιεργασία.

Τέλος, ο συντελεστής απόδοσης των παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών βάσει της καταναλωθείσης γλυκόζης ($Y_{EPS/S}$) που υπολογίστηκε για τους μελετώμενους μακρομύκητες στα 4 διαφορετικά υποστρώματα κυμαίνονταν σε μεγάλο εύρος, ωστόσο οι μέγιστες τιμές του (από 0,04 έως 1,44 g/g) καταγράφηκαν τη 12^η ημέρα στο θρεπτικό μέσο GPY και στις στατικές καλλιέργειες. Καλλιέργεια στο GPYS έδειξε ότι ο $Y_{EPS/S}$, αν και παρουσίασε πάλι τις μέγιστες τιμές του (0,04 έως 0,24 g/g) στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (8^η-12^η ημέρα) στους μακρομύκητες *A. aegerita* και *F. velutipes* ευνοήθηκε από την ανάδευση, σε αντίθεση με τους *G. applanatum* και *P. pulmonarius*. Ακόμα, για τους *M. esculenta* και *V. voluacea* ο $Y_{EPS/S}$ ήταν αρκετά χαμηλός και παρόμοιος σε στατικές και αναδεδυόμενες καλλιέργειες (0,03-0,07 g/g). Ακόμη, διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση της εκμετάλλευσης της γλυκόζης προς σχηματισμό βιομάζας ($Y_{X/Glc}$) με την βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών ($Y_{EPS/Glc}$), γεγονός που συμφωνεί με αντίστοιχες παρατηρήσεις άλλων ερευνητών (π.χ. στον *A. auricula-judae* - Wu κ.α., 2006). Επιπρόσθετα, από την ανάλυση των δεδομένων που αφορούν στους συντελεστές απόδοσης εξωπολυσακχαριτών και ενδοπολυσακχαριτών βάση της καταναλωθείσης γλυκόζης ($Y_{EPS/Glc}$ και $Y_{IPS/Glc}$ αντίστοιχα) προέκυψε ένδειξη ότι υφίσταται ανταγωνιστική σχέση μεταξύ της βιοσύνθεσης EPS και IPS όσον αφορά στην εκμετάλλευση του καταναλισκόμενου υποστρώματος που έδειξε να είναι ισχυρότερη στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες των μυκήτων *A. aegerita*, *G. applanatum* και *P. pulmonarius*. Διαφορετικό προφίλ βιοσύνθεσης EPS και IPS έχει καταγραφεί και σε ανάλογες μελέτες που αφορούν τον *G. lucidum* από τους Fang και Zhong (2002β), Fang κ.α. (2002).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στη σύνθεση EPS από το μακρομύκητα *V. voluacea* σε υγρές καλλιέργειες δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί. Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα από άλλους μακρομύκητες, οι μέγιστες τιμές (1,0-1,2 g/l) που επιτεύχθηκαν στην παρούσα εργασία είναι αξιοσημείωτες, καθώς οι συνθήκες παραγωγής τους δεν ήταν αριστοποιημένες. Ακόμα, ήταν σημαντική τόσο η επίδραση της πηγής άνθρακα όσο και της εφαρμογής ή όχι ανάδευσης στη συγκέντρωση της EPS_{max} . Η γλυκόζη, ωστόσο, σε στατικές και αναδεδυόμενες συνθήκες ήταν το σάκχαρο που ευνόησε την παραγωγή EPS στον *V. voluacea*. Ακολούθησαν οι φρουκτόζη, μαλτόζη και σακχαρόζη υπό στατικές συνθήκες και οι μαλτόζη, ξυλόζη υπό αναδεδυόμενες. Θα πρέπει να

αναφερθεί ότι το άμυλο όπου σημειώθηκε η υψηλότερη τιμή βιομάζας (υπό ανάδευση) ήταν το σάκχαρο που ευνόησε λιγότερο από όλα την παραγωγή EPS, αποτέλεσμα που είναι σε συμφωνία με μελέτες οι οποίες έλαβαν χώρα σε άλλους μακρομύκητες (π.χ. στον *F. velutipes*; Shin κ.α., 2007). Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τις EPS_{max} συγκεντρώσεις, η ανάδευση είχε θετική επίδραση στα υποστρώματα με πηγή άνθρακα την ξυλόζη (όπου η παραγωγή βιομάζας ήταν μικρότερη) και αρνητική στις φρουκτόζη και σακχαρόζη, ενώ στις γλυκόζη και μαλτόζη δεν παρατηρήθηκε επίδραση.

Ωστόσο, η επίδραση της πηγής άνθρακα στον $Y_{EPS/S}$ ήταν εμφανής, καθώς σε περαιτέρω καλλιέργεια του *V. voluacea* η τιμή του συντελεστή στη μαλτόζη και στη σακχαρόζη (υπό ανάδευση) αυξήθηκε σε 2,79 και 0,36 g/g αντίστοιχα. Στη βιβλιογραφία έχει προσδιοριστεί αρκετές φορές ο $Y_{EPS/S}$. Οι Maziero κ.α. (1999) ανέφεραν πως το 75% των στελεχών που καλλιέργησαν υπό ανάδευση εμφάνισαν στη γλυκόζη $Y_{EPS/S}$ από 0,02 έως 0,10 g/g, με τις μέγιστες τιμές να καταγράφονται στους *Agaricus* sp. (0,761 g/g) και *Calvatia cyathiformis* (0,293 g/g). Για τον *G. lucidum* σε υπόστρωμα λακτόζης έχει αναφερθεί συντελεστής $Y_{EPS/S}$ από 11,36 έως 17,00 mg/g για 20 έως 65 g/l λακτόζης αντίστοιχα, υποδηλώνοντας αύξησή του με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης (Tang και Zhong, 2002). Για τον μύκητα *T. sinense*, ο μέγιστος $Y_{EPS/S}$ (45,48 mg/g) υπολογίστηκε στη σχετικά υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης (65 g/l; Tang κ.α., 2008), αλλά και ο $Y_{EPS/S}$ στον *A. brasiliensis* φάνηκε πως ευνοήθηκε από τις σχετικά υψηλές (20-50 g/l) αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Zou, 2006).

Ένα σημαντικό κομμάτι της παρούσας ερευνητικής εργασίας σχετίστηκε με την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) από ποικίλους εδώδιμους και φαρμακευτικούς μύκητες, κατά την καλλιέργειά τους σε υγρές ζυμώσεις (με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη), ενώ έμφαση δόθηκε στη σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών από τον *V. voluacea* σε υποστρώματα γλυκόζης αλλά και άλλων σακχάρων. Ακόμα, η σύσταση σε απλά σάκχαρα των παραγόμενων πολυσακχαριτών αναλύθηκε κατά την καλλιέργεια των μακρομυκήτων σε αμφότερες τις στατικές και τις κινούμενες ζυμώσεις, σε ποικίλες φάσεις του αυξητικού κύκλου τους. Σε πολλές από τις πραγματοποιηθείσες καλλιέργειες και παρά το γεγονός το οποίο αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια (δηλαδή μη αριστοποιημένες συνθήκες αύξησης των μακρομυκήτων, καλλιέργεια σε συνθήκες μη σταθερού pH, ενδεχομένως όχι σε βέλτιστες συνθήκες αερισμού, κ.λ.π.) η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών ήταν πραγματικά εντυπωσιακή (π.χ. τιμές IPS_{max} κυμαινόμενες από 5,8 έως ~11 g/l, συνολικά πολυσακχαρίτες κυμαινόμενοι από ~30 έως ~65% κ.β. επί ξηράς μυκηλιακής μάζας) για τους μακρομύκητες *A. aegerita*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius* και *G. applanatum*. Ειδικά για τον *V. voluacea*,

σημαντική ήταν η επίδραση των πηγών άνθρακα, όπως και της εφαρμογής ή όχι ανάδευσης, στην παραγωγή των IPS με τη γλυκόζη (4,5-5,5 g/l, ~40%, κ.β.) και το άμυλο (5,2 g/l, 33%, κ.β.) να αποτελούν τα καλύτερα υποστρώματα (στατικές και αναδευόμενες καλλιέργειες αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης από 30,0 σε 95,4 g/l είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση 12,23 g/l (56,6%, κ.β.) ενδοπολυσακχαριτών, ποσότητα πραγματικά αξιοσημείωτη.

Θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε λοιπόν ότι πολλοί από τους μελετώμενους στην παρούσα εργασία μύκητες (π.χ. *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *V. voluacea*, κ.λ.π.) δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως «μικροβιακά κυτταρικά εργαστήρια» («microbial cell factories») για παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών κατά την αύξηση των μικροοργανισμών αυτών σε σακχαρούχα υποπροϊόντα. Για να γίνει κατανοητή η δυνατότητα και η δυναμική των μικροοργανισμών της παρούσας εργασίας, θα πρέπει να συγκριθούν με δεδομένα της σύγχρονης βιβλιογραφίας για άλλα μανιτάρια, καθώς για τους περισσότερους από τους μακρομύκητες που μελετήσαμε, συμπεριλαμβανομένου και του *V. voluacea*, η βιβλιογραφία που ερευνήθηκε δεν αναφέρει πληροφορίες που αφορούν στη βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών.

Η αριστοποίηση της παραγωγής των IPS από άλλους μακρομύκητες έχει μελετηθεί σε ποικίλες πηγές άνθρακα. Έτσι, οι Rokhrel και Ohga (2007) υποστήριξαν ότι η γλυκόζη ήταν το καταλληλότερο σάκχαρο για τη σύνθεση των IPS από τον φαρμακευτικό μακρομύκητα *L. decastes* κατά την αύξησή του σε αναδευόμενες φιάλες και ακολούθησαν η ξυλόζη και η σορβιτόλη, ενώ στη φρουκτόζη καταγράφηκε η ελάχιστη παραγωγή. Επίσης, από τις πηγές αζώτου, το εκχύλισμα ζύμης ευνόησε την σύνθεση των IPS (32,5% κ.β.), ενώ δεύτερη καλύτερη ήταν το ανόργανο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και ακολούθησαν το NH_4NO_3 και η πειπόνη, καταρρίπτοντας τον επικρατούντα ισχυρισμό ότι στις ανόργανες πηγές αζώτου παράγονται μικρότερες ποσότητες πολυσακχαριτών. Κατόπιν αριστοποίησης των συνθηκών αύξησης αναφέρθηκαν μέγιστες ποσότητες IPS της τάξης των 2,3 g/l (οι οποίες αντιστοιχούσαν σε τιμές περίπου 32% κ.β. πολυσακχαρίτες επί ξηράς μυκηλιακής μάζας). Σημειώνεται ότι στη γλυκόζη παρατηρήθηκε ταυτόχρονη μέγιστη παραγωγή βιομάζας, EPS και IPS, φαινόμενο που είναι σε ασυμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Αναλυτικότερα, όπως ήδη αναφέρθηκε, από την ανάλυση των δεδομένων που αφορούν στους συντελεστές απόδοσης εξωπολυσακχαριτών και ενδοπολυσακχαριτών βάση της καταναλωθείσης γλυκόζης διαπιστώσαμε ότι η παραγωγές EPS και IPS σχετίζονται αρνητικά (ιδιαίτερα στις αναδευόμενες καλλιέργειες των μυκήτων *A. aegerita*, *G. applanatum* και *P. pulmonarius*), γεγονός που εκδηλώνεται με χρονική διαφοροποίηση της βιοσύνθεσής τους, για μεν τους

EPS στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, για δε τους IPS προς το τέλος της ζύμωσης. Ακόμη, διαπιστώθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της εκμετάλλευσης της γλυκόζης προς σχηματισμό βιομάζας ($Y_{X/Glc}$) με την βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών ($Y_{IPS/Glc}$), τόσο στις στατικές όσο και στις αναδευόμενες καλλιέργειες, καθώς και τη θετική συσχέτιση των συντελεστών απόδοσης των παραγόμενων IPS ανά μονάδα αναλωθείσας γλυκόζης ($Y_{IPS/Glc}$) με τον αντίστοιχο των λιπιδίων ($Y_{L/Glc}$), κυρίως στις αναδευόμενες καλλιέργειες.

Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της εξάρτησης της βέλτιστης απόδοσης από τη σύνθεση του θρεπτικού υλικού και τις συνθήκες καλλιέργειας, καθώς και από το είδος και στέλεχος του μύκητα που αναπτύχθηκε σε κάθε περίπτωση. Ωστόσο, η διαπίστωση μας ενισχύεται περαιτέρω από τα πρόσφατα ευρήματα των Tang και Zhong (2002) και Tang κ.α. (2008) για τον φαρμακευτικό βασιδιομύκητα *G. lucidum* και τον εδώδιμο ασκομύκητα *T. sinense*. Συγκεκριμένα κατά την καλλιέργεια του *T. sinense* (κινέζικη τρούφα) σε συστήματα αναδευόμενων φιαλών (καλλιέργειες αντίστοιχου τύπου με τις δικές μας) που αναφέρουν μέγιστη τιμή IPS_{max} της τάξης των 1,9 g/l (οι οποίες αντιστοιχούσαν σε τιμές πολυσακχαριτών επί ξηράς μάζας $Y_{IPS/X}$ 12,73%, κ.β.) σε υπόστρωμα σακχαρόζης, ενώ σε γλυκόζη, μαλτόζη και λακτόζη οι τιμές των IPS ήταν 1,55, 1,43 και 0,38 g/l αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι η σακχαρόζη ευνόησε και την παραγωγή βιομάζας, αλλά όχι την παραγωγή EPS δεικνύοντας την διαφορετική επίδραση της πηγής άνθρακα στην αύξηση και παραγωγή μεταβολικών προϊόντων των μακρομυκήτων. Ο μακρομύκητας *G. lucidum* 5.616 όταν καλλιεργήθηκε σε συστήματα ανακινούμενων φιαλών με τη γλυκόζη χρησιμοποιούμενη ως πηγή άνθρακα, βρέθηκε να παράγει πολυσακχαρίτες σε μέγιστες τιμές της τάξης των ~1,2 g/l - 11%, κ.β. (Fang κ.α., 2002). Οι Tang και Zhong (2002) στο ίδιο στέλεχος του *G. lucidum* ανέφεραν IPS_{max} τιμές της τάξης των ~2,5 g/l (14,65%, κ.β.) σε καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τη λακτόζη (αναδευόμενες φιάλες και εργαστηριακοί βιοαντιδραστήρες), σάκχαρο που ευνόησε την παραγωγή βιομάζας αλλά όχι αυτή των EPS. Περαιτέρω, σε επόμενο στάδιο οι Tang κ.α. (2011) έκαναν με επιτυχημένο τρόπο κλιμάκωση μεγέθους της βιοδιεργασίας τους (scale-up of the bioprocess) σε μεγάλου όγκου αναδευόμενους βιοαντιδραστήρες (με όγκους κυμαινόμενους μεταξύ 7,5 και 220 l) και ανέφεραν τιμές IPS_{max} της τάξης των ~5 g/l (~20%, κ.β.). Οι Zhou κ.α. (2009) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *G. umbellata* κατέγραψαν τις μέγιστες τιμές IPS στο υπόστρωμα της γλυκόζης (3,83 g/l), πολύ υψηλότερες από αυτές των φρουκτόζης και σακχαρόζης. Ο παρασιτικός μακρομύκητας *Cordyceps pruinosus*, ο οποίος καλλιεργήθηκε σε αναδευόμενες φιάλες σε θρεπτικά μέσα τα οποία αποτελούνταν από μελάσες, παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση και τιμές IPS_{max} της τάξης των 5,1 g/l μετά από καλλιέργεια 9 ημερών (Xiao κ.α., 2004). Σε αντίστοιχα πειράματα που

πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρες όγκου 25 l, τιμές πολυσακχαριτών της τάξης των 9,5 g/l επιτεύχθηκαν αλλά πολύ ταχύτερα (π.χ. μέσα σε ~2 ημέρες) (Χiao κ.α., 2004).

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι στις καλλιέργειες της παρούσας εργασίας όπου επιτεύχθηκαν οι ανωτέρω τιμές IPS ο αρχικός λόγος C/N δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλός (ήταν ~20). Οι λόγοι ~18-25:1 θεωρήθηκαν και από τους Babitskaya κ.α. (2005) ως οι καταλληλότεροι για την παραγωγή IPS (~9-13%, κ.β.) από τον *G. lucidum*, οι οποίοι επισήμαναν επιπλέον ότι η αύξηση της πηγής άνθρακα μπορεί να αυξήσει την παραγωγή των IPS, μέχρι όμως ορισμένης συγκέντρωσης, δεικνύοντας ότι υπάρχει ένας άριστος λόγος για την μέγιστη παραγωγή IPS. Το γεγονός αυτό, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, μπορεί να χαρακτηριστεί ως αρκετά ενδιαφέρον, δεδομένου του γεγονότος ότι η βιβλιογραφία αναφέρει ότι καλλιέργειες σε σχετικά υψηλούς (και αυξανόμενους) λόγους C/N θεωρούνται ως δυνάμενες να παράξουν σε ικανοποιητικές ποσότητες IPS (π.χ. στον *G. lucidum* από τους Fang και Zhong, 2002α,β; Zhong και Tang, 2004; Hsieh κ.α., 2005, στον *G. umbellata* από τους Zhou κ.α., 2009). Ακόμα, καθώς η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης προκάλεσε τη δημιουργία μικρότερου μεγέθους σφαιριδίων βιομάζας και το μικρό μέγεθος ευνόησε τη σύνθεση IPS, οι Fang και Zhong (2002α) εξήγησαν κατά αυτόν τον τρόπο την θετική επίδραση της αύξησης του λόγου C/N στην παραγωγή IPS (παραγωγή 1,19 g/l, 7,96%, κ.β. με 50 g/l γλυκόζη). Ακόμα, τονίστηκε ότι η αύξηση των IPS κατά την αύξηση του λόγου C/N είναι αποτέλεσμα της αύξησης στην αρχική συγκέντρωση γλυκόζης και λιγότερο του αζώτου. Αντίθετα, για την καλλιέργεια του *G. applanatum* σε αναδεδυόμενες φιάλες έχει αναφερθεί (Lee κ.α., 2007) ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρου είχε σαν αποτέλεσμα μείωση των παραγόμενων IPS, ενώ σε σταθερή συγκέντρωση σακχάρου η αύξηση του λόγου C/N (43:1) αρχικά αύξησε, αλλά στη συνέχεια (129:1) προκάλεσε μείωση των IPS, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο.

Περαιτέρω και προς ενίσχυση των ανωτέρω, όταν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες του μακρομύκητα *V. voluacea* σε συνθήκες αυξανόμενου αρχικού περιορισμού σε άζωτο (υγρές καλλιέργειες σε αυξανόμενες αρχικούς συγκεντρώσεις γλυκόζης), η παραγωγή IPS_{max} αυξήθηκε εντυπωσιακά, τόσο σε ό,τι αφορά τις απόλυτες τιμές (g/l) όσο και τις σχετικές τιμές (% ποσοστό κ.β. επί ξηράς μυκηλιακής μάζας) με μέγιστες τιμές IPS να είναι της τάξης των ~12,3 g/l και ~57% κ.β. επί ξηράς μάζας. Πάντως, οι περιπτώσεις υψηλής παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση μακρομυκήτων (π.χ. *A. aegerita*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius* και *G. applanatum*) σε υποστρώματα τα οποία δεν ήταν περιοριστικά σε άζωτο, υποδηλώνουν ότι η έλλειψη αζώτου, αν και ευνοεί τη

συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών, δεν είναι αναγκαία και ικανή συνθήκη για να συντεθούν σε μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες. Προφανώς, τα εμπλεκόμενα στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και στη συσσώρευση πολυσακχαριτών ένζυμα και ειδικά η φωσφορο-φρουκτοκινάση (PFK) και η ισομεράση της γλυκόζης (PGI) λειτουργούν και υπό συνθήκες ισόρροπης αύξησης. Σημειώνεται ότι σε στερεές καλλιέργειες του εδώδιμου μύκητα *V. voluacea* όπου υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα, παρατηρήθηκε ότι στο καρπόσωμά του συσσωρεύτηκαν υψηλές ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών (33,8%, κ.β. – Chang 1974; 45,8% - Mau κ.α., 1997), αντίστοιχες με αυτές που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία κατά την καλλιέργειά του σε υγρά υποστρώματα, οι οποίες μάλιστα μεταβάλλονταν στη διάρκεια των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του μανιταριού. Σε μελέτες των μανιταριών *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* και *Cordyceps militaris* (Chang κ.α., 2001), προσδιορίστηκε η ποσότητα των πολυσακχαριτών του μυκηλίου (37,5 έως 56,7%, κ.β.), οι οποίες για τον *A. camphorata* βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες από αυτές του καρποσώματος (Huang κ.α., 1999). Γενικά, έχουν αναφερθεί αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις πολυσακχαριτών στα καρποσώματα των μακρομυκήτων, π.χ. 61-64%, κ.β. σε *P. ostreatus*, *P. cystidiosus* και *L. edodes* (Yang κ.α., 2001), 46,6-81,8%, κ.β. σε *P. ostreatus* (Bano και Rajarathanam, 1988; Chang και Miles, 2004), 50,7%, κ.β. σε *P. cystidiosus*, 57,4%, κ.β. σε *Volvariella diplasia*, 73,1%, κ.β. σε *F. velutipes* και 67,5-78%, κ.β. σε *L. edodes* (Chang και Miles, 2004), 44,0-74,3% κ.β. σε διάφορα αυτοφυή και εδώδιμα μανιτάρια (Crisan και Sands, 1978).

Επιπρόσθετα, μελετώντας την κινητική παραγωγής των ενδοπολυσακχαριτών από τον *V. voluacea* παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής τους με το χρόνο ζύμωσης, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και σε άλλους μακρομύκητες. Οι Zhou κ.α. (2009) κατέγραψαν μείωση στην ποσότητα των παραγόμενων IPS στα τελευταία στάδια της καλλιέργειας του *G. umbellata* στο βασικό μέσο καλλιέργειας, αλλά και στο αριστοποιημένο. Μείωση καταγράφηκε και στους IPS του *G. lucidum* μετά την 8^η ημέρα καλλιέργειάς του σε γλυκόζη, όταν χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μεγέθη εμβολίων (Fang κ.α., 2002). Για τον ίδιο μακρομύκητα, η καλλιέργειά του τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρα και κατά την εξέταση διαφόρων παραμέτρων π.χ. ταχύτητας ανάδευσης, βαθμού αερισμού οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης των πολυσακχαριτών από τα αρχικά στάδια της ζύμωσης (Yang και Liao, 1998). Επιπλέον και μετά από δοκιμή ποικίλων τιμών pH, οι Fang και Zhong (2002β) κατέγραψαν στη κινητική παραγωγής IPS από τον *G. lucidum* στασιμότητα ή και μείωση στη παραγωγή τους μετά την 8^η ημέρα της ζύμωσής του σε γλυκόζη. Σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των IPS κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *T. sinense* σε διάφορα σάκχαρα επισημάνθηκε και από τους Tang κ.α. (2008).

Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει ότι τα ενδοκυτταρικά σάκχαρα τα οποία βιοσυντίθενται από ανώτερους μύκητες στα μυκήλια και στα καρποσώματα, κυρίως περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες όπως γλυκογόνο, πουλουλάνη, β-γλυκάνες κ.λ.π., δισακχαρίτες όπως τρεχαλόζη και απλά σάκχαρα ή σακχαρο-αλκοόλες, όπως η μαννιτόλη (Hammond και Nichols, 1979; Mau κ.α., 1997; Galiotou-Panayotou κ.α., 1998; Tang και Zhong, 2002; Xiao κ.α., 2004; Israilides κ.α., 2008; Tang κ.α., 2007). Τα ενδοκυτταρικά αυτά προϊόντα έχουν μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις έχουν ανοσοδιεγερτικές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές και υποχοληστερινικές ιδιότητες (Tang κ.α., 2007; Fazenda κ.α., 2008). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύσταση σε απλά σάκχαρα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών διαφόρων μακρομυκήτων (*A. aegerita*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *M. esculenta*, *P. pulmonarius* και *V. voluacea*) όπου ανιχνεύτηκε κυρίως γλυκόζη και σε μικρότερες συγκεντρώσεις φρουκτόζη, μαννιτόλη και ξυλιτόλη, η συγκέντρωση των οποίων επηρεάστηκε σημαντικά από τη χρονική στιγμή της ζύμωσης, όπως και από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης. Παρ' όλα αυτά, η γλυκόζη ανιχνεύτηκε στους IPS όλων των μακρομυκήτων και μάλιστα η ποσότητά της ήταν πραγματικά πολύ υψηλή (ποσοστό >70% κ.β.), φτάνοντας σε πολλές περιπτώσεις σε ποσοστά >90% (*A. aegerita*, *V. voluacea*) ή και το 100% (καλλιέργεια του *V. voluacea* σε φρουκτόζη, ξυλόζη, μαλτόζη, σακχαρόζη ή σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης). Μαννιτόλη ανιχνεύτηκε σε όλους στους μακρομύκητες (μέγιστη συγκέντρωση 38,5%, κ.β. στον *M. esculenta*), όπως και φρουκτόζη (εκτός του *A. aegerita* και σε πολύ μικρή συγκέντρωση στον *P. pulmonarius* - μέγιστη συγκέντρωση 33,3%, κ.β. στον *V. voluacea*), ενώ ξυλιτόλη βρέθηκε μόνο στους *F. velutipes*, *G. applanatum* και *M. esculenta* (μέγιστη συγκέντρωση 21,0%, κ.β. στον *F. velutipes*). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ανάδευση επέδρασε σημαντικά στη συγκέντρωση των απλών σακχάρων, καθώς όχι μόνο προκάλεσε αύξηση ή μείωσή της κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις ήταν υπεύθυνη για την παρουσία ή απουσία τους (βλ. Πίνακα III.12α,β για μαννιτόλη, ξυλιτόλη σε *G. applanatum* και *M. esculenta* και Πίνακα III.24α,β για μαννιτόλη και φρουκτόζη σε υποστρώματα ξυλόζης, μαλτόζης στον *V. voluacea*). Επίσης, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των σακχάρων με την εξέλιξη της καλλιέργειας των μακρομυκήτων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η μείωση στη συγκέντρωση της γλυκόζης από την αρχή προς το τέλος της ζύμωσης στον *V. voluacea* σε υπόστρωμα γλυκόζης και για ποικίλους λόγους C/N (20-60) με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της φρουκτόζης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με πολλές εργασίες της σύγχρονης βιβλιογραφίας. Η σημαντικότερη ομοιότητα έγκειται στη παρουσία της γλυκόζης ως το πιο άφθονο σάκχαρο σε καλλιέργειες του μυκηλίου διαφόρων μακρομυκήτων όπως

των *P. pulmonarius* (Smiderle κ.α., 2012), *P. applanatum* (Lee κ.α., 2007), *G. lucidum* (Babitskaya κ.α., 2005; Stajic κ.α., 2011), *G. tsugae* (Tseng κ.α., 2005). Ωστόσο, αν και όπως αναφέρθηκε από τους Stajic κ.α. (2011), η γλυκόζη κυριάρχησε στους ενδοπολυσακχαρίτες που παρήγαγε πληθώρα αυτοφυών στελεχών *G. lucidum* σε υπόστρωμα γλυκόζης, η συγκέντρωσή της διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα στελέχη, όπως και η συγκέντρωση των απλών σακχάρων φρουκτόζη και σακχαρόζη που επίσης ανιχνεύτηκαν σε μικρότερα ποσοστά. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την ύπαρξη διαφοροποίησης ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου είδους και εξηγούνται από το διαφορετικό φυσιολογικό στάδιο του κάθε στελέχους, όπως και από τις αναβολικές ανάγκες του. Δύο στελέχη του μακρομύκητα *G. lucidum* καλλιεργήθηκαν επίσης σε βασικό και αριστοποιημένο θρεπτικό μέσο (Babitskaya κ.α., 2005) και τα παραγόμενα IPS (και EPS) αποτελούνταν σε πολύ μεγάλο ποσοστό (>84%, κ.β. των ολικών σακχάρων) από γλυκόζη, το οποίο έφτασε υπό άριστες συνθήκες καλλιέργειας το 100%, κ.β. και σε πολύ μικρότερα ποσοστά από γαλακτόζη και μαννόζη, ωστόσο η επίδραση τόσο των διαφορετικών στελεχών όσο και των συνθηκών καλλιέργειας δεν θεωρήθηκε σημαντική. Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι οι γλυκόζη, μαννιτόλη και σακχαρόζη (Hammond και Nichols, 1976) ή γλυκόζη, μαννιτόλη και τρεχαλόζη (Byrne και Brennan, 1975) αποτελούν τα κύρια υδατοδιαλυτά σάκχαρα του μυκηλίου του λευκού μανιταριού *A. bisporus*, ενώ οι μαννιτόλη και τρεχαλόζη του καρποσώματος (Rast, 1965; Hammond και Nichols, 1976). Μαννιτόλη και τρεχαλόζη περιείχαν και οι πολυσακχαρίτες των καρποσωμάτων και άλλων μανιταριών, όπως του *P. ostreatus* (Bano και Rajarathnam, 1988), του *V. volvacea* (Mau κ.α., 1997) και των αυτοφυών *Agaricus arvensis*, *Lactarius deliciosus*, *Lagermania gigantea*, *Sarcodon imbricatus* και *Tricholoma portentosum* (Barros κ.α., 2007). Ακόμα, οι Hammond και Nichols (1976, 1979) παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση της τρεχαλόζης μειώνονταν τόσο στο μυκήλιο όσο και στο καρπόσωμα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του *A. bisporus*, ενώ αντίθετα για τους Wannet κ.α. (2000) η συγκέντρωση των τρεχαλόζης και φρουκτόζης παρέμενε σχετικά σταθερή ενώ αυξάνονταν αυτή στις μαννιτόλης. Επιπλέον, οι Wannet κ.α. (2000) επισήμαναν ότι η συγκέντρωση της μαννιτόλης στο μυκήλιο του *A. bisporus* ήταν σημαντικά μικρότερη (1-5%, κ.β.) από αυτή του καρποσώματος και ότι το μυκήλιο περιείχε και μικρές ποσότητες τρεχαλόζης και φρουκτόζης. Προς ενδυνάμωση του γεγονότος ότι η συγκέντρωση των απλών σακχάρων μπορεί να διαφέρει μεταξύ του μυκηλίου, του καρποσώματος και του εκχυλίσματος του ίδιου μανιταριού έρχεται η μελέτη των Tseng κ.α. (2005), στην οποία δείχθηκε ότι η μαννιτόλη ήταν η κυριότερη πολυόλη των καρποσωμάτων του *G. tsugae*, η γλυκόζη το κυριότερο σάκχαρο του μυκηλίου και οι φρουκτόζη και γλυκόζη τα κυριότερα σάκχαρα του

δηθήματος της καλλιέργειας. Αντίστοιχα με τα αποτελέσματά μας που αφορούσαν τους ενδοπολυσακχαρίτες του *V. volvacea*, οι Mau κ.α. (1997) έδειξαν ότι τα κύρια σάκχαρα που προσδιορίστηκαν στο καρπόσωμά του ήταν η τρεχαλόζη (αποτελείται από δύο μονάδες α-D-glucose συνδεδεμένες με α,α-1,1-γλυκοζιτικό δεσμό) σε μεγάλη ποσότητα (~95%, κ.β. των ολικών σακχάρων) και δευτερευόντως η μαννιτόλη (~5%, κ.β.). Επισημαίνεται ότι, καθώς η μαννιτόλη είναι το κύριο ενεργό συστατικό που προσδίδει τη γεύση στο κοινό μανιτάρι (*A. bisporus*), οι υψηλές συγκεντρώσεις σε τρεχαλόζη και οι αντίστοιχα χαμηλές σε μαννιτόλη μπορεί να σημαίνει ότι το μανιτάρι *V. volvacea* θα έχει περισσότερο γλυκιά και όχι την τυπική γεύση του μανιταριού (Mau κ.α., 1997).

Επίσης, παρά την κυριαρχία της γλυκόζης, η σύσταση των IPS του *V. volvacea* στην παρούσα μελέτη επηρεάστηκε από τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα. Η πηγή άνθρακα έχει αναφερθεί από τους Smiderle κ.α. (2012) ότι επιδρά στην παρουσία και ανάλογη συγκέντρωση των μονοσακχαριτών, τόσο στους EPS όσο και στους IPS του *P. pulmonarius*. Έτσι, όσον αφορά στους IPS ενώ σε υποστρώματα γλυκόζης, γαλακτόζης και ξυλόζης ανιχνεύτηκε κυρίως γλυκόζη (και δευτερευόντως ξυλόζη στο υπόστρωμα της ξυλόζης), στην αραβινόζη ανιχνεύτηκε κυρίως μαννόζη. Αντίθετα, στους EPS ανιχνεύτηκαν μαννόζη, γαλακτόζη και γλυκόζη σε διάφορα ποσοστά ανάλογα την πηγή άνθρακα. Επίσης, καλλιέργεια του *G. applanatum* σε υποστρώματα γλυκόζης, φρουκτόζης, μαλτόζης και σακχαρόζης έδωσε IPS (και EPS) που περιείχαν κυρίως γλυκόζη, σε ποσοστά 76%, 80%, 71% και 48%, κ.β. αντίστοιχα, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν γαλακτόζη, μαννόζη και ξυλόζη (Lee κ.α., 2007). Επίδραση της πηγής άνθρακα όπως και της μεθόδου καλλιέργειας παρατηρήθηκε και στη σύσταση των EPS του *G. lucidum*, οι οποίοι αποτελούνταν από γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη (Sone κ.α., 1985; Wagner κ.α., 2004).

Στην παρούσα εργασία, μεταξύ των άλλων φυσιολογικών και βιοχημικών μελετών που σχετίζονται με το μεταβολισμό στελεχών εδωδιμών και φαρμακευτικών μανιταριών καλλιεργούμενων σε υγρές στατικές ή/και αναδεδυόμενες ζυμώσεις, μεγάλη σημασία δόθηκε και στην κινητική της βιοσύνθεσης καθώς και στην ανάλυση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων των εν λόγω μικροοργανισμών. Η μελέτη των λιπιδίων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της φυσιολογίας και της βιοχημείας των μικροοργανισμών λόγω των πολλαπλών και εξόχως ουσιωδών και διαφορετικών ρόλων τον οποίο δύνανται να παίξουν τα λιπίδια στο μικροβιακό κύτταρο. Πολλές ερευνητικές εργασίες υποστηρίζουν ότι η ποσότητα (σε % κ.β. επί ξηράς μικροβιακής μάζας), το ποσοστό (σε % κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων) των διαφόρων κλασμάτων (ουδέτερο κλάσμα, κλάσμα G+S, κλάσμα PL), καθώς επίσης και η

σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων κατά τη διάρκεια της μικροβιακής αύξησης δεν είναι σταθερά, η δε φυσιολογική σημασία των μεταβολών αυτών μπορεί να συσχετιστεί με τις φάσεις της αύξησης του μικροοργανισμού, τις φυσικοχημικές μεταβολές του μέσου καλλιέργειας (π.χ. αλλαγές στο pH, στο ποσοστό κορεσμού σε οξυγόνο, κ.λ.π.), καθώς επίσης και με «βαθύτερες» βιοχημικές και κυτταρολογικές αλλαγές του μικροοργανισμού (π.χ. ηλικία ή τραυματισμός του μυκηλίου, «στρες» του μικροοργανισμού λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών ή συσσώρευσης αντι-μεταβολιτών ή παρεμποδιστικών συστατικών στο περιβάλλον της αύξησης, κ.λ.π.) (Losel, 1988; Fakas κ.α., 2009α; Paranikolaou και Aggelis, 2011α). Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά της λιπογένεσης έχουν περιγραφεί για λίγους μύκητες και ακόμα λιγότερους βασιδιομύκητες και περιορίζονται κυρίως στην ανάλυση των καρποσωμάτων (Yokokawa, 1980; Nair κ.α., 1990), ενώ τα άρθρα που αναφέρονται στην παραγωγή λιπιδίων σε καλλιέργειες βυθού είναι περιορισμένου αριθμού.

Σε ό,τι αφορά στην παρούσα εργασία, η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων που έδειξε να σχετίζεται θετικά με την αύξηση της μυκηλιακής μάζας, ήταν γενικά χαμηλή (<1,0 g/l), αν και καταγράφηκαν και υψηλότερες τιμές όπως στους *M. esculenta* (2,42 g/l), *G. lucidum* (1,7 g/l) και *M. elata* (1,55 g/l). Κατά την καλλιέργεια του εδώδιμου μύκητα *V. voluacea*, η μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων παράχθηκε στο άμυλο (υπό ανάδευση) και ήταν 1,8 g/l, ενώ στις καλλιέργειες των υπόλοιπων σακχάρων ήταν <1,2 g/l, γεγονός που συνάδει με τη μη ελαιογόνο φύση του μακρομύκητα. Σημειώνεται ότι συγκεντρώσεις λιπιδίων μεγαλύτερες των 10 g/l με αντίστοιχη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδιακών αποθεμάτων εντός των κυττάρων ή των μυκηλίων >40% κ.β. θεωρούνται ιδιαίτερα ικανοποιητικές στη βιβλιογραφία (Ratledge, 1994). Ωστόσο, ο λόγος άνθρακας/άζωτο που επιλέχθηκε για τα πειράματά μας (C/N=20) δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλός ώστε να επηρεάζει επιδρά θετικά στη λιπογένεση, ενώ περαιτέρω πειραματικά δεδομένα με υψηλότερο λόγο C/N που ακολούθησαν, μας έδωσαν τη δυνατότητα αξιολόγησης της ικανότητας συσσώρευσης λιπιδίων σε εδώδιμους μύκητες. Αντίστοιχα, το συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος ($Y_{L/x}$, %, κ.β. επί ξηράς μυκηλιακής μάζας, εκχύλισμα επί χλωροφορμίου/μεθανόλης 2/1) που παράχθηκε από τους μακρομύκητες στα αρχικά πειράματα (κύρια πηγή άνθρακα η γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/l, λόγος C/N~20) κυμάνθηκε σε ποσοστά από ~3% έως ~23%, κ.β. επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας, δείχνοντας μάλιστα ότι σχετίζεται αρνητικά με την παραγωγή των εξωπολυσακχαριτών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις το ποσοστό % κ.β. επί της ξηράς μυκηλιακής μάζας ξεπέρασε το 20% (π.χ. στους μύκητες *M. elata*, *M. esculenta*, *F. velutipes*, κ.λ.π.), ποσοστό το οποίο θεωρείται ως «όριο» (threshold) πάνω από το

οποίο ένας μικροοργανισμός θεωρείται ως ελαιογόνος (δυνάμενος δηλαδή υπό ορισμένες συνθήκες αύξησης να συνθέτει λιπίδια σε υψηλά ποσά). Επίσης, στις καλλιέργειες του *V. voluacea* σε υπόστρωμα γλυκόζης, αμύλου και φρουκτόζης ο $Y_{L/x}$ σχεδόν διπλασιάστηκε στις αναδεδόμενες καλλιέργειες σε σχέση με τις στατικές. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η ανάδευση δε βελτίωσε σε όλους τους μύκητες την κατανάλωση του υποστρώματος, υποθέτουμε ότι η μεγαλύτερη σύνθεση λιπιδίων οφείλεται στην υψηλότερη τάση του διαλυμένου οξυγόνου (dissolved oxygen tension) στο θεραπευτικό μέσο που πιθανώς υπήρξε στις αναδεδόμενες φιάλες σε σχέση με τις στατικές. Όταν για την καλλιέργεια του *V. voluacea* χρησιμοποιήθηκαν διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου, το είδος του σακχάρου και η ύπαρξη ή όχι ανάδευσης είχαν σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των λιπιδίων, η οποία σε αρκετές περιπτώσεις εμφάνισε σχετικά υψηλές τιμές, αν και αυτές εντοπίστηκαν είτε στις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας και στη συνέχεια μειώθηκαν, είτε σχετιζονταν με χαμηλές τιμές βιομάζας, οπότε θα μπορούσε ενδεχομένως να υπάρχει υπερεκτίμησή της. Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λιπιδίων έδωσε λοιπόν ο *V. voluacea* στα υποστρώματα με ξυλόζη (17-18,5 %, κ.β., αναδεδόμενες και στατικές καλλιέργειες), μαλτόζη και σακχαρόζη (17%, κ.β., στατικές καλλιέργειες) και τέλος με φρουκτόζη (16%, κ.β., αναδεδόμενες καλλιέργειες).

Οι σχετικά υψηλές τιμές $Y_{L/x}$, %κ.β. που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν ενδιαφέρον εύρημα δεδομένου του γεγονότος ότι, όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, οι αρχικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε μέσα τα οποία δεν ήταν ιδιαίτερα περιοριστικά σε άζωτο (αρχικός λόγος C/N~20), ως εκ τούτου μια αναγκαία και εν πολλοίς ικανή προϋπόθεση προκειμένου να συσσωρευτούν σε ικανοποιητικές ποσότητες ενδοκυτταρικά λιπιδιακά αποθέματα (ήτοι ο υψηλός αρχικός λόγος C/N ο οποίος θα έπρεπε να είναι π.χ. >40) δεν πληρούνταν (Fakas κ.α., 2009β; Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Πράγματι, σε πολλές περιπτώσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, εδωδιμοί και φαρμακευτικοί μύκητες όπως οι *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. sajor-caju*, *Stropharia aeruginosa*, *Phellinus* spp., *F. velutipes*, *Boletus* spp., *L. edodes*, *M. esculenta*, *G. frondosa*, *V. bombycina* κ.λ.π., κατά τη μυκηλιακή φάση της αύξησης τους έχουν αναφερθεί να περιέχουν συνολικά λιπίδια σε ποσοότητες ≤10% κ.β., επί ξηράς μυκηλιακής μάζας (Nair κ.α., 1990; Dembitsky κ.α., 1992; Cheung, 1997; Bespalova κ.α., 2002; Dimou κ.α., 2002; Pedneault κ.α., 2006, 2007; André κ.α., 2010). Από την άλλη πλευρά, ποσοστά λίπους επί ξηράς μυκηλιακής μάζας αρκετά μεγαλύτερα από 10%, κ.β. έχουν αναφερθεί σε αρκετές περιπτώσεις αύξησης εδωδιμών και φαρμακευτικών μυκήτων. Έτσι, συνολικά λιπίδια σε ποσοότητες 14,2-16,3%, κ.β. έχουν αναφερθεί για τα μυκήλια των μανιταριών *Polyporus hirsutus* και *Calvatia caelata* (Sumner, 1973), ενώ σε άλλες περιπτώσεις, ακόμη μεγαλύτερες

ποσότητες λιπιδίων επί ξηράς ουσίας αναφέρθηκαν για τα μυκήλια των μακρομυκήτων *G. frondosa* (~25%, κ.β. -Tsai κ.α., 2006), *G. tsugae* (~22%, κ.β. -Tseng κ.α., 2005) και *L. edodes* (~20%, κ.β. -Feofilova κ.α., 1998). Σε άλλες εργασίες, ποσοστό λίπους κατά βάρος ~18%, κ.β. επί ξηράς ουσίας αναφέρθηκε για τα καρποσώματα του μύκητα *V. esculenta* (Gbolagade κ.α., 2006), ενώ πραγματικά υψηλές ποσότητες λιπιδίων, λαμβανομένου υπόψη ότι πρόκειται για μανιτάρια (ποσοστά της τάξης του 32-37%, κ.β.), αναφέρθηκαν για την περίπτωση του μακρομύκητα *A. camphorata* (Huang κ.α., 1999). Ωστόσο, η συγκέντρωση των λιπιδίων των καρποσωμάτων των περισσότερων ειδών μανιταριών δε ξεπερνά το 8%, κ.β. (Chang και Miles, 2004). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι: *A. bisporus* (1,7-1,8%, κ.β.), *Auricularia* sp. (8,3%, κ.β.), *F. velutipes* (1,9%, κ.β.), *L. edodes* (4,9-8%, κ.β.), *P. ostreatus* (1,6-2,2%, κ.β.), *V. volvacea* (2,4%, κ.β.), *V. diplasia* (2,6%, κ.β.) .

Τέλος, στις πρώτες σειρές των πειραμάτων (screening) και παρά το γεγονός ότι ο λόγος C/N ήταν ίδιος για όλα τα θρεπτικά μέσα, το ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας διαφοροποιούνταν (σε πολλές περιπτώσεις αξιοσημείωτα) για τα τέσσερα υποστρώματα (GPYS, GPY, GYS και MCM) στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι υγρές καλλιέργειες. Πιθανότατα οι διαφοροποιήσεις να σχετίζονται με το γεγονός ότι υπήρχαν δύο διαφορετικές πηγές αζώτου στα εν λόγω υποστρώματα, αφού ήδη στη βιβλιογραφία διάφορες έρευνες ανέφεραν ότι η χημική προέλευση της πηγής αζώτου (π.χ. χρήση ανόργανης ή οργανικής πηγής αζώτου) επηρεάζει σημαντικά το βαθμό και την κατεύθυνση της λιπογένεσης, είτε αναφερόμαστε σε ελαιογόνους, είτε σε μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Reusser κ.α., 1957; Konova κ.α., 1987; Radzabova κ.α., 1990; Ratledge, 1994; Ratledge και Wynn, 2002). Το αυτό και σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό, ισχύει για την πηγή άνθρακα, καθώς έχει δειχτεί από τη βιβλιογραφία ότι προσθήκη λιπαρών (δηλαδή υδρόφοβων) συστατικών (π.χ. ελεύθερα λιπαρά οξέα, φυτικά έλαια, κ.λ.π.) μπορεί να αυξήσει κατά πάρα πολύ το ποσοστό λίπους επί ξηράς μικροβιακής μάζας σε μικροοργανισμούς οι οποίοι δεν χαρακτηρίζονται ως «τυπικοί» ελαιογόνοι. Έτσι, προσθήκη 1% β/ο ηλιελαίου είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση της συγκέντρωσης των ΛΟ του μακρομύκητα *V. volvacea* από 2,4% σε 31,65%, κ.β. (Li κ.α., 1992), το οποίο στην συγκεκριμένη περίπτωση λειτούργησε σαν καλύτερο υπόστρωμα και από τη γλυκόζη, καθώς αλλάζοντας την περατότητα των μεμβρανών λόγω μείωσης του βαθμού ακορεστότητας των ΛΟ ευνόησε την πρόσληψη της γλυκόζης από το κύτταρο. Επίσης, σε μελέτη των Litchfield κ.α. (1963) που αφορούσε καλλιέργεια των μακρομυκήτων *M. crassipes*, *M. esculenta* και *M. hortensis* σε γλυκόζη, μαλτόζη και λακτόζη αναφέρθηκε ότι ο *M. crassipes* συνέθεσε το υψηλότερο ποσοστό λιπιδίων (3-3,7%, κ.β.) ανεξάρτητα της πηγής άνθρακα,

ωστόσο και οι τρεις μακρομύκητες είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίων στη λακτόζη (~2,5%, κ.β.) από ό,τι στη γλυκόζη και μαλτόζη.

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας εργασίας σχετιζόταν με την αύξηση του μακρομύκητα *V. voluacea* σε υγρές καλλιέργειες με βάση τη γλυκόζη, όπου χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης με σταθερή αρχική διαθεσιμότητα αζώτου (αυξανόμενοι λόγοι C/N). Στις καλλιέργειες αυτές, το μέγιστο ποσοστό λίπους κ.β. επί ξηράς μυκηλιακής μάζας αυξήθηκε αξιοσημείωτα (από 12,7% κ.β. για τον αρχικό λόγο C/N=20 σε 30,7% για C/N=60:1), σε πλήρη αρμονία με τα συμβαίνοντα στους τυπικούς ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2010, 2011α,β). Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων προϋποθέτει υψηλό λόγο C/N και η συσσώρευση αυξάνει με αύξηση του λόγου C/N μέχρι ενός σημείου, πέραν του οποίου μειώνεται (Moreton, 1988). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν και οι Reusser κ.α. (1957) σε μελέτη τους πάνω σε υγρές καλλιέργειες των μανιταριών *A. campestris* και *M. hybrida*, οι οποίοι παρατήρησαν ότι όταν αυξανόταν ο λόγος C/N, αυξάνονταν αντίστοιχα το %, κ.β. ποσοστό λιπιδίων εντός των μυκηλίων των μυκήτων. Αντίθετα, οι Bespalova κ.α. (2002) υπέδειξαν ότι η αύξηση στη συγκέντρωση του άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας (μέχρι C/N=40:1) δεν ευνόησε τη λιπογένεση στους *P. ostreatus* και *F. velutipes* και προσδιόρισαν σαν καταλληλότερους λόγους το 8-15 για τον πρώτο μύκητα και 15 για τον δεύτερο. Από την άλλη πλευρά, οι Nair κ.α. (1989) υποστήριξαν ότι η αύξηση στον λόγο C/N (από 5 έως 70:1) δεν είχε επίδραση στη συγκέντρωση των ολικών (% κ.β.) λιπιδίων του *P. sajor-caju*. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι σε καλλιέργειες στις οποίες πραγματοποιείται εξάντληση του αζώτου από το μέσο καλλιέργειας δίδεται το έναυσμα για την έναρξη μιας αλληλουχίας μεταβολικών γεγονότων σχετιζόμενων με τη βιοσύνθεση των λεγόμενων δευτερογενών (μη-συνδεδεμένων με τη μικροβιακή αύξηση) μεταβολιτών. Όπως ειπώθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, έλλειψη του αζώτου από το περιβάλλον της αύξησης έχει ως απόρροια αποικοδόμηση του ενδοκυτταρικού AMP (αντίδραση: $AMP \rightarrow IMP + NH_4^+$, καταλυόμενη από την AMP-απαμινάση) (Ratledge και Wynn, 2002). Η μείωση της συγκέντρωσης του AMP καταστέλλει, μεταξύ άλλων, τη δράση των ενζύμων 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6-PFK) και NAD- (και σε μερικές περιπτώσεις επίσης και NADP-) ισοκιτρική αφυδρογονάση (NAD-ICDH και NADP-ICDH) (Galiotou-Panayotou κ.α., 1998; Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α), με απόρροια βιοσύνθεση και συσσώρευση είτε αυξημένων ποσών ενδοπολυσακχαριτών (περίπτωση καταστολής της 6-PFK) είτε αυξημένων ποσών λιπιδίων (περίπτωση καταστολής των NAD-ICDH και NADP-ICDH) (Ratledge, 1994, 1997; Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Δεδομένου του γεγονότος

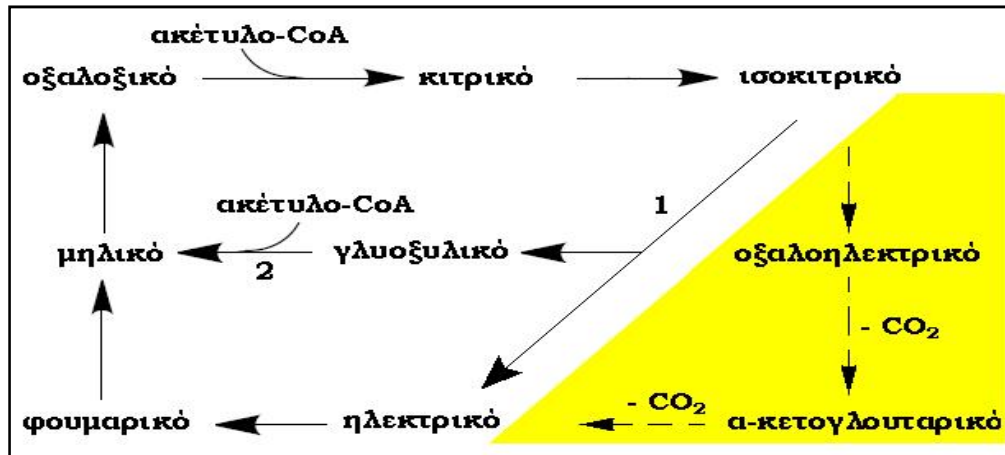
ότι η αύξηση του *V. voluacea* σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη και αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N είχε ως αποτέλεσμα (σχετικά σημαντική) αύξηση της σύνθεσης λιπιδίων (όσον αφορά στο μέγιστο ποσοστό % κ.β. των παραγόμενων κυτταρικών λιπιδίων, τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της αύξησης), υποδεικνύεται για το μακρομύκητα αυτό ύπαρξη στοιχείων φυσιολογίας αντιστοιχών με αυτά των ελαιογόνων μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα ενδεχόμενη εμπλοκή του ενζύμου ATP-κιτρική λυάση (ACL) για τη σύνθεση των κυτταρικών λιπιδίων του (η σύνθεση λιπιδίων πάντως για τους μη-τυπικούς ελαιογόνους μικροοργανισμούς γίνεται απ' ευθείας από το ακέτυλο-CoA χωρίς εμπλοκή του ενζύμου ACL). Σημειώνεται πάντως, ότι η παρουσία του ενζύμου ACL στους μύκητες θεωρείται πολύ διαδεδομένη (widespread) και δεν σχετίζεται τόσο με την ικανότητά τους να συσσωρεύουν λιπίδια, όσο με την ικανότητά τους να συνθέτουν γενικώς μη-συνδεδεμένους με τη μικροβιακή αύξηση μεταβολίτες (π.χ. ανήκοντα στον κύκλο του Krebs ή παράγωγα αυτού οργανικά οξέα όπως το κιτρικό ή το οξαλικό οξύ, ενδοπολυσακχαρίτες, κ.λ.π.) (Wynn κ.α., 1998).

Το κύριο μεταβολικό προϊόν το οποίο συντέθηκε από το μακρομύκητα *V. voluacea*, και σε σημαντικά αυξανόμενες ποσότητες όσο αύξανε ο λόγος C/N και συνεπώς ο περιορισμός σε άζωτο, ήταν οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, η συσσώρευση των οποίων επάγεται από τον περιορισμό της ενεργότητας της 6-PFK ή/και της ισομεράσης της φωσφορογλυκόζης (PGI) (Wynn κ.α., 2001, Ratledge και Wynn, 2002; Babitskaya κ.α. 2005; Fakas κ.α., 2009α; Paranikolaou και Aggelis, 2011α). Βεβαίως, όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, (πολύ) ικανοποιητική σύνθεση ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από τον *V. voluacea* όπως και από τους άλλους μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε και στο μέσο με αρχικό λόγο C/N~20 (μη περιοριστικό σε άζωτο), υποδεικνύοντας ότι ο περιορισμός σε άζωτο του μέσου καλλιέργειας δεν είναι απολύτως απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιοσύνθεση πολυσακχαριτών από τους εδώδιμους μύκητες κατά την αύξησή τους σε υγρές καλλιέργειες (Zhong και Tang, 2004). Σε κάποιες περιπτώσεις της παρούσας εργασίας, κινητική ανάλυση της σύνθεσης των IPS έδειξε ότι αυτή ήταν μια διεργασία απολύτως συνδεδεμένη με τη μικροβιακή αύξηση (π.χ. περίπτωση του μακρομύκητα *F. velutipes* – Γράφημα III.12α). Σε αντίστοιχες συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. αρχικός λόγος C/N~20 στην περίπτωση των μυκήτων *G. applanatum* και *P. pulmonarius*), η παραγωγή IPS ήταν πραγματικά πολύ υψηλή υποδεικνύοντας ότι το περιοριστικό σημείο (bottleneck) του γλυκολυτικού σχήματος βρισκόταν στο επίπεδο της 6-PFK (Evans και Ratledge, 1985; Galiotou-Panayotou κ.α., 1998) ή της PGI (Zhong και Tang, 2004) παρά το γεγονός ότι οι καλλιέργειες πραγματοποιούνταν

σε συνθήκες περίσσειας αζώτου. Το φαινόμενο αυτό μεθερμηγευόμενο σημαίνει ότι σε πολλές περιπτώσεις, η ενεργότητα των ενζύμων PGI και 6-PFK δεν ήταν ικανή να κορέσει τη ροή άνθρακα προς τη γλυκόλυση και τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, έστω και χωρίς να υπάρχει έλλειψη αζώτου, έλλειψη η οποία ενδεχομένως αν εφαρμοζόταν να αύξανε ακόμη περισσότερο τη ροή άνθρακα προς τη σύνθεση IPS (όπως ειπώθηκε στα προηγούμενα εδάφια, αυτό δείχθηκε πέρα από κάθε αμφισβήτηση για το μύκητα *V. voluacea*, για τον οποίο πραγματικά η αυξητική τάση στη σύνθεση των IPS ήταν εντυπωσιακή με τον αυξανόμενο περιορισμό σε άζωτο – βλ. Πίνακα III.27).

Το πρώτο στάδιο ελέγχου της γλυκόλυσης είναι η μεταφορά της γλυκόζης στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Μειωμένη ικανότητα μεταφοράς της γλυκόζης οδηγεί σε μείωση της ταχύτητας της γλυκόλυσης, ακόμα και παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*) (Diderich κ.α., 1999; Elbing κ.α., 2004). Η μεταφορά της γλυκόζης γίνεται με δυο μηχανισμούς: παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης λαμβάνει χώρα ενεργός μεταφορά, που γίνεται με δαπάνη ενέργειας, ενώ όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί πάνω από μια ελάχιστη τιμή (συνήθως 0,1%) η μεταφορά πραγματοποιείται με διευκολυνόμενη διάχυση, διαδικασία που δεν απαιτεί ενέργεια (Torres κ.α., 1996). Σε επόμενο επίπεδο, τα ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της γλυκολυτικής οδού είναι η PGI, η 6-PFK και η PK- πυροσταφυλική κινάση (Evans και Ratledge, 1985; Galiotou-Panayotou κ.α., 1998; Zhong και Tang, 2004) με το κιτρικό οξύ να ασκεί ισχυρή παρεμπόδιση στην 6-PFK, ενώ τα ιόντα NH_4^+ μπορούν να αναστείλουν εν μέρει αυτή την παρεμπόδιση (Evans και Ratledge, 1985; Wynn κ.α., 2001). Σε κάθε περίπτωση, τα κινητικά δεδομένα της αύξησης του μικροοργανισμού *V. voluacea* σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη όπου χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενοι αρχικοί λόγοι C/N δεικνύει επίδραση του περιορισμού του αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας στο επίπεδο της 6-PFK, της PGI, της PK και ενδεχομένως σε αυτό της NAD-ICDH. Η διαδοχική (sequential) σύνθεση αρχικώς λιπιδίων και κατόπιν πολυσακχαριτών σημαίνει ότι στις αρχικές φάσεις της καλλιέργειας (όταν υπήρχαν προφανώς σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας) η ροή της γλυκόζης δεν παρεμποδιζόταν πάρα πολύ από την 6-PFK, την PGI και την PK και συνεπώς το γλυκολυτικό σχήμα πραγματοποιείτο κατά το μάλλον ή ήττον σχετικά ικανοποιητικά. Αντίθετα, προϊούσης της καλλιέργειας και του συνακόλουθου αυξανόμενου περιορισμού σε άζωτο, πραγματοποιήθηκε μεταβολική μετάπτωση (shift) και σημαντική αύξηση στη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών στα μυκήλια του μακρομύκητα *V. voluacea*, λόγω προφανούς ανάσχεσης του γλυκολυτικού σχήματος.

Ένα ιδιαίτερα αξιοσημείωτο γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε είναι ότι σε πολλές (σχεδόν όλες) τις περιπτώσεις της κινητικής βιοσύνθεσης λιπιδίων από τους εδωδιμους μύκητες που μελετήθηκαν, παρά το γεγονός ότι κατ' ουσία δεν υπήρξε σημαντική «συσσώρευση» λίπους εντός των μυκηλιακών δομών (το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς μάζας $Y_{L/X}$ σπανίως ξεπέρασε την τιμή του 20,0% κ.β.), η εμφανής τάση που παρατηρήθηκε ήταν ότι το μέγιστο ποσοστό του $Y_{L/X}$ εμφανίστηκε στα σχετικά πρώιμα στάδια της ζύμωσης, ενώ προόδου της βιοδιεργασίας πραγματοποιήθηκε ανακατανάλωση των μικροβιακών λιπιδίων, με απόρροια σαφή μείωση της τιμής του συντελεστή $Y_{L/X}$ (βλ. για παράδειγμα τους Πίνακες III.6α,β). Ακόμη και στις περιπτώσεις της αύξησης του μακρομύκητα *V. voluacea* σε υποστρώματα που παρουσίαζαν αυξανόμενο αρχικό λόγο C/N, η σύνθεση σχετικά σημαντικών ποσών ενδοκυτταρικών λιπιδίων παρατηρήθηκε στα σχετικά πρώιμα στάδια της μικροβιακής αύξησης (βλ. Γράφημα III.33) και κατόπιν ακολούθησε ταχεία ανακατανάλωση (degradation - turnover) των μικροβιακών λιπιδίων. Αντίστοιχη μείωση στη συγκέντρωση των λιπιδίων έχει αναφερθεί και από τους Li κ.α. (1992) για υγρή καλλιέργεια του *V. voluacea*, όπως και για του *P. sajor-caju* (Nair, 1989; 1990). Η αποικοδόμηση των προηγουμένως παραχθέντων μικροβιακών λιπιδίων δε συσχετίστηκε με εξάντληση της εξωκυτταρικής πηγής άνθρακα από το περιβάλλον της αύξησης, ούτε για τις περιπτώσεις του *V. voluacea* καλλιεργουμένου σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη που παρουσίαζαν αυξανόμενο αρχικό λόγο C/N, ούτε για τις αντίστοιχες των λοιπών μακρομυκήτων καλλιεργουμένων σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη που παρουσίαζε αρχικό λόγο C/N=20 (σε αντιδιαστολή με την ανακατανάλωση των λιπιδίων, έναυσμα για την αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών δόθηκε με την εξάντληση της γλυκόζης από το μέσο της καλλιέργειας - βλ. περίπτωση του μύκητα *F. velutipes* στο Γράφημα III.11α και του μύκητα *V. voluacea* στο Γράφημα III.18β,δ). Σε κάθε περίπτωση, πάντως, η ανακατανάλωση των ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων θα πραγματοποιηθεί κυρίως μέσω της οδού της παρακάμψεως του γλυοξυλικού οξέος, η οποία λαμβάνει χώρα στα περοξεισώματα, καθώς η επαγωγή των ενζύμων του μονοπατιού αυτού επάγεται από την αύξηση σε C2 μόρια ή σε μόρια τα οποία οδηγούν στη σύνθεση ατόμων με 2 άτομα άνθρακα (δημιουργία αρχικώς άκυλο και κατόπιν ακέτυλο-CoA μέσω της διεργασίας β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων) (Αγγελής, 2007; Paranikolaou και Aggelis, 2010, 2011β). Η παράκαμψη του γλυοξυλικού οξέος φαίνεται στο Σχήμα IV.1.



Σχήμα IV.1 Διάμεσος καταβολισμός στα μικροβιακά κύτταρα μέσω της παράκαμψης του γλυοξυλικού οξέος (Αγγελής, 2007)

Το φαινόμενο της ανακατανάλωσης και αποικοδόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων έχει μελετηθεί επισταμένα στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών και σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπάρχει μια ριζική διαφοροποίηση καθώς στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς έναυσμα για την αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών λιπαρών υλών δίδεται οπωσδήποτε μετά από την εξάντληση (ή τη μη περαιτέρω δυνατότητα κατανάλωσης) της πηγής άνθρακα στο μικροοργανισμό και επισυμβαίνει κατόπιν μεταβολικής μετάπτωσης (shift) από συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο, σε συνθήκες περιοριστικές σε άνθρακα (Fakas κ.α., 2007, 2008, 2009α; Papanikolaou και Aggelis, 2010, 2011α). Η αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών λιπιδιακών αποθεμάτων στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών (όταν για παράδειγμα το ποσοστό % κ.β. των κυτταρικών λιπιδίων είναι >20-25% κ.β. πριν από τη διεργασία αποικοδόμησης) αποτελεί ένα σύνηθες φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα ανεξαρτήτως της «προϊστορίας» της ζύμωσης (ήτοι της πηγής άνθρακα η οποία χρησιμοποιείται προκειμένου ο μικροοργανισμός να παράγει λίπος) και έχει εμφανιστεί σε περιπτώσεις καλλιέργειας μικροοργανισμών σε λιπαρές ύλες (Aggelis κ.α., 1995α,β; Papanikolaou κ.α., 2001, 2002, 2011; Papanikolaou και Aggelis, 2010, 2011α), σάκχαρα (Fakas κ.α., 2007, 2008; Chatzifragkou κ.α., 2010; Vamvakaki κ.α., 2010) και γλυκερόλη (André κ.α., 2010; Makri κ.α., 2010). Σημειώνεται επίσης, ότι αποικοδόμηση των λιπιδιακών αποθεμάτων έχει εμφανιστεί και μελετηθεί σε καλλιέργειες ελαιογόνων βακτηρίων (Alvarez κ.α., 2000), ζυμών (Papanikolaou κ.α., 2001, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2003) και μυκήτων (Aggelis και Sourdis, 1997; Fakas κ.α., 2007, 2008; Chatzifragkou κ.α., 2010; Vamvakaki κ.α., 2010), η δε διεργασία συσσώρευσης/αποικοδόμησης ενδοκυτταρικών λιπιδιακών αποθεμάτων στους ελαιογόνους

μικροοργανισμούς έχει προτυποποιηθεί επιτυχώς με χρήση αναλυτικών και αριθμητικών προτύπων (Aggelis κ.α., 1995α,β; Aggelis και Sourdis, 1997; Papanikolaou και Aggelis, 2003, 2011β; Meeuwse κ.α., 2011, 2012). Αντίθετα, η παρούσα εργασία είναι μια από τις πρώτες στη διεθνή βιβλιογραφία (η πρώτη ήταν αυτή από τους Nair κ.α., 1989) η οποία δείχνει κατά τρόπο αδιαμφισβήτητο ότι και στα μυκήλια των (μη ελαιογόνων) μανιταριών, όπου δε συσσωρεύονται υψηλά ποσά λιπιδίων (στις περισσότερες περιπτώσεις βιοσυντίθενται λιπίδια σε ποσοστό <20% κ.β. επί ξηράς μάζας), πραγματοποιείται αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών λιπόφιλων συστατικών. Αντίστοιχου τύπου αποτελέσματα ανακατανάλωσης των λιπόφιλων συστατικών εντός των μυκηλίων ή των κυττάρων αναφέρονται και σε περιπτώσεις άλλων μυκήτων και ζυμών (όχι όμως σε στελέχη εδωδίων μυκήτων) όπου, παρότι η λιπογένεση ήταν σχετικά περιορισμένη (κυτταρικά λιπίδια με ποσοστό <16% κ.β. επί ξηράς μάζας), τα λιπίδια ανακαταναλώθηκαν ενώ η ζύμωση χωρούσε και η αποικοδόμηση των κυτταρικών λιπιδίων δε σχετιζόταν με μείωση της συγκέντρωσης της εξοκυτταρικής πηγής άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας (Papanikolaou κ.α., 2009; Vamvakaki κ.α., 2010). Τέλος, η ανακατανάλωση των προηγούμενως ενδοκυτταρικός παραγόμενων λιπιδίων δεν είναι μια «τυχαία» (random) διεργασία καθώς τα τριγλυκερίδια αποικοδομούνται εκλεκτικά (Alvarez κ.α., 2000; Fakas κ.α., 2007), ενώ επίσης εκλεκτική εξειδίκευση υπάρχει και σε σχέση με τα ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα τα οποία αναλώνονται προς τη β-οξειδωση ή την κυτταροπλασσία (Papanikolaou κ.α., 2001; Fakas κ.α., 2007). Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, κατά την παρούσα εργασία ο *V. voluacea* αποικοδόμησε εκλεκτικά τα ουδέτερα λιπίδιά του (Γράφημα III.20 και Πίνακας III.27), υποδεικνύοντας ότι έστω και σε μικρές συγκεντρώσεις ο μακρομύκητας αυτός δύναται να συνθέσει ποσότητες αποθησαυριστικών (reserve) λιπιδιακών αποθεμάτων.

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενα εδάφια, πέρα από την ανακατανάλωση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται ανακατανάλωση και των προηγούμενως συσσωρευθέντων IPS και EPS. Σε ό,τι αφορά τους εξωπολυσακχαρίτες, η γενική τάση που παρουσιάζεται είναι ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις αυτών παρουσιάζονται στα πρώτα στάδια των ζυμώσεων και η μείωση αυτή δε σχετίζεται με τη μείωση της γλυκόζης από το περιβάλλον της αύξησης. Σε αντιδιαστολή με την ανακατανάλωση των EPS (και των κυτταρικών λιπιδίων), έναυσμα για την αποικοδόμηση των IPS δόθηκε με την εξάντληση της γλυκόζης από το μέσο της καλλιέργειας ενώ η αποικοδόμηση αυτή είχε ως απόρροια αύξηση της ελεύθερης λιπιδίων και σακχάρων βιομάζας – βλ. περίπτωση του μακρομύκητα *F. velutipes* στο Γράφημα III.11α). Θα πρέπει να σημειωθεί πάντως στην τελευταία αυτή περίπτωση (καλλιέργεια του *F. velutipes*) ότι η αύξηση και η παραγωγή πολυσακχαριτών

έλαβε χώρα σε ένα θρεπτικό μέσο το οποίο δεν ήταν ιδιαίτερα περιοριστικό σε άζωτο (αρχικός λόγος C/N~20), ως εκ τούτου η ανακατανάλωση των IPS θα μπορούσε να συνοδεύεται από σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοξέων (όπως και φαίνεται ότι συμβαίνει δεδομένης της αύξησης της συγκέντρωσης της ελεύθερης λιπιδίων και σακχάρων βιομάζας κατά το τελευταίο στάδιο της ζύμωσης όπου οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες αποικοδομούνται). Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η ενδεχόμενη ανακατανάλωση IPS και σε περιπτώσεις μεγαλύτερης έλλειψης αζώτου από το περιβάλλον της αύξησης (π.χ. με περαιτέρω επέκταση των ζυμώσεων για το μύκητα *V. voluacea* σε υποστρώματα με υψηλό λόγο C/N, βλ. Γράφημα III.35). Πιθανώς, πάντως, η επέκταση των ζυμώσεων πέρα από τις 24 ημέρες να ακολουθείτο από μια μικρή ανακατανάλωση των ενδοπολυσακχαριτών χωρίς αντιστοιχη αύξηση της ελεύθερης λίπους και σακχάρων βιομάζας (υπενθυμίζεται ότι δεν υπάρχει άζωτο στο θρεπτικό μέσο) η οποία θα αναλωνόταν προς ενέργεια συντήρησης των μυκηλίων (Vamvakaki κ.α., 2010).

Κλασμάτωση των παραγόμενων λιπιδίων του μύκητα *V. voluacea* 190 έδειξε ότι το κλάσμα των ουδετέρων λιπιδίων (NL) ήταν το πιο άφθονο στα αρχικά στάδια της (στατικής και αναδεδυόμενης) καλλιέργειας στη γλυκόζη (~54-64%, κ.β.), ενώ σε μικρότερες ποσότητες βρίσκονταν αυτά των γλυκολιπιδίων και σφιγκολιπιδίων (G+S, ~32-38%, κ.β.) και κυρίως των φωσφολιπιδίων (PL, ~3-7%, κ.β.). Ειδικά ο λόγος των NL προς τα πολικά κλάσματα (G+S και PL) ήταν στις περισσότερες από τις καλλιέργειες >1,4 φθάνοντας κάποιες φορές και την τιμή 2,0 (φυσικά, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με την πάροδο της καλλιέργειας υπήρξε εκλεκτική κατανάλωση των NL και το κλάσμα G+S είχε σχεδόν το ίδιο ή και μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με αυτό των NL). Ωστόσο, σε κλασμάτωση άλλων στελεχών *V. voluacea* που έγινε στο τέλος της ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες φάνηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό το κατείχε το κλάσμα των NL και όχι των G+S, δεικνύοντας τη διαφορετικότητα των φυσιολογικών χαρακτηριστικών στα ποικίλα στελέχη του ίδιου μύκητα. Επίσης, όταν ο *V. voluacea* 190 καλλιεργήθηκε σε υποστρώματα διαφόρων σακχάρων, την 8^η ημέρα το μεγαλύτερο ποσοστό το κατείχαν τα NL σε αναδεδυόμενες και στατικές καλλιέργειες (46,9-58,5%, κ.β.) με εξαίρεση τα θρεπτικά μέσο της φρουκτόζης όπου υπερίσχυσαν τα G+S με ποσοστό 45,9,5% έναντι 42,9% των NL. Τα PL κυμάνθηκαν σε χαμηλά ποσοστά (<10%, κ.β.) με λίγες εξαιρέσεις (π.χ. 14,9% στη γλυκόζη και 12,3% κ.β. στη ξυλόζη στις αναδεδυόμενες και 11,5% έως 17,3%, κ.β. σε φρουκτόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη στις στατικές καλλιέργειες. Επιπλέον, από την 8^η στην 20^η ημέρα της κινητικής το ποσοστό του κλάσματος των NL μειώθηκε προς όφελος του G+S στις καλλιέργειες της γλυκόζης, φρουκτόζης, αμύλου, ενώ αυξήθηκε σε αυτές των ξυλόζης, σακχαρόζης και μαλτόζης. Μεγάλη μείωση υπέστη η τιμή

του κλάσματος των PL από την 8^η στην 20^η ημέρα της καλλιέργειας, ανεξάρτητα της εφαρμογής ανάδευσης στις καλλιέργειες. Έχοντας υπόψη το γεγονός ότι τα αποθηκευτικά λιπίδια βρίσκονται υπό τη μορφή κυρίως των ουδετέρων λιπιδίων και ότι κατά τη διάρκεια της αποδόμησης των λιπιδίων τα NL αποδομούνται κατά προτίμηση σε σχέση με τα G+S ή τα PL, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι, αν και στον *V. voluacea* παράχθηκαν σχετικά μικρές ποσότητες λιπιδίων, αυτές οι ποσότητες αποτελούν κυρίως αποθηκευτικά λιπίδια για τον μύκητα. Οι Nair κ.α. (1990) ανέφεραν νωρίτερα για τον *P. sajor-caju* ότι στο μυκήλιο η σύνθεση των λιπιδίων κατευθύνεται κυρίως προς αποθηκευτικά, ενώ στο καρπόσωμα προς δομικά συστατικά (σύνηδε με την υψηλή συγκέντρωση στερολών και πολικών συστατικών στο καρπόσωμα). Αντίθετα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ζυγομύκητες (*M. ramanniana*, *Mucor* sp. και *C. echinulata*) σε καλλιέργειά τους σε γλυκερόλη αύξησαν την ποσότητα των NL και μείωσαν των PL (Bellou κ.α., 2012), υποδεικνύοντας ότι (σε συνδυασμό με μείωση των πολυακόρεστων ΛΟ) η βιοσύνθεση των PUFA είναι συνδεδεμένη με τη μικροβιακή αύξηση. Μείωση των PL κατά την καλλιέργεια του *C. echinulata* σε υπολείμματα τομάτας και του *Thamnidium elegans* σε ακάθαρτη γλυκερόλη παρατηρήθηκε και από τους Fakas κ.α. (2006) και Fakas κ.α. (2009β) αντίστοιχα.

Οι εργασίες της βιβλιογραφίας στις οποίες έχει γίνει ποσοτικοποίηση των κλασμάτων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε μακρομύκητες είναι πράγματι πολύ περιορισμένες. Σε μελέτη που έγινε από τους Byrne και Brennan (1975) και αφορούσε την σύσταση των λιπιδίων του μύκητα *A. bisporus*, ο οποίος αναπτύχθηκε σε υγρή καλλιέργεια εκχυλίσματος βόνης για 8 έως 12 εβδομάδες παρατηρήθηκε ότι τα NL αντιπροσώπευαν το 50% του ολικού λίπους στο μυκήλιο (και στο καρπόσωμα). Όσον αφορά στο κλάσμα των PL, αυτό βρέθηκε σε ποσοστό 17% και των G+S σε ποσοστό 33%, αποτελέσματα που συμφωνούν εν μέρει με τη δική μας μελέτη. Ακόμα, σε αντίστοιχου τύπου εργασίες με την παρούσα μελέτη που πραγματοποιήθηκαν από τους Nair κ.α. (1989, 1990), έλαβαν χώρα υγρές καλλιέργειες του μύκητα *P. sajor-caju* σε ποικίλες συνθήκες αύξησης (διαφοροποίηση στη θερμοκρασία επώασης, στο αρχικό pH του μέσου, προσθήκη φυτικών ελαίων ως υποστρωμάτων, κ.λ.π.) και σε κάθε περίπτωση δείχθηκε ότι ο λόγος NL προς πολικά λιπίδια βρισκόταν μεταξύ των τιμών 1,1 και 2,0, όπως και στην παρούσα εργασία. Περαιτέρω, με μικρές εξαιρέσεις, το κλάσμα των NL ήταν το πιο άφθονο σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε άγρια μανιτάρια που ανήκαν στα γένη *Clitocybe*, *Coriolus*, *Exidia*, κ.λ.π. (Pedneault κ.α., 2008). Ακόμα, οι Dembitsky κ.α. (1992) σε μελέτες των λιπιδίων δέκα ειδών βασιδιομυκήτων προσδιόρισαν τις τιμές των NL από 32,9 (*Daedaleopsis confragora* var. *tricolor*) έως 68,1%, κ.β. (*Daedalea quercina*), των G+S από 3,7% (*Exidia grandulosa*) έως 29,5%, κ.β. (*Clitocybe* sp.) και των PL από 5,9% (*D.*

quercina) έως 48,2%, κ.β. (*Phellinus* sp.). Μόνο στην περίπτωση των μανιταριών *D. confragora*, *Mycena polygramma* και *Phellinus* sp., η ποσότητα των κλασμάτων των G+S και PL ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των NL. Αντίστοιχες ήταν και οι παρατηρήσεις σχετικά με την αύξηση μικροοργανισμών (ζυμών και μυκήτων, όχι όμως μανιταριών) σε συνθήκες οι οποίες δεν ευνοούσαν τη συσσώρευση λιπιδίων (λιπίδια επί ξηράς ουσίας <15%, κ.β.) (Fakas κ.α., 2006; André κ.α., 2009; Papanikolaou κ.α., 2009, Vamvakaki κ.α., 2010). Σε αυτές τις περιπτώσεις, κατ' αντιστοιχία με την παρούσα εργασία, το κλάσμα των NL ήταν πολύ πλουσιότερο σε σχέση με αυτά των G+S και PL, υποδεικνύοντας ότι το ουδέτερο κλάσμα είναι γενικώς το πλουσιότερο των συνολικών μικροβιακών λιπιδίων ανεξαρτήτως του ελαιογόνου χαρακτήρα των μικροοργανισμών αυτών. Σε αντίθεση ωστόσο έρχεται η εργασία των Hanuš κ.α. (2008), στην οποία οι συγκεντρώσεις των NL, G και PL ήταν 38,9-63,2 %, 1,8-12,3% και 24,5-59,3%, κ.β. αντιστοιχία.

Η βιβλιογραφία αναφέρει επίσης ότι η σύσταση σε ΛΟ του κυτταρικού λίπους για την περίπτωση των μυκήτων εξαρτάται από το είδος μύκητα (π.χ. η ύπαρξη ορισμένων ΛΟ συνιστά φυλογενετικό χαρακτηριστικό για ορισμένα φύλα μυκήτων), το στάδιο αύξησής του, καθώς επίσης και τις συνθήκες καλλιέργειας (όπως λ.χ. η πηγή άνθρακα και αζώτου του μέσου ανάπτυξης, το pH της καλλιέργειας, η θερμοκρασία επώασης και ο κορεσμός σε οξυγόνο του μέσου καλλιέργειας -Weete, 1980; Ratledge, 1997; Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α,β). Από τη βιβλιογραφία είναι γενικά αποδεκτό ότι στους ανώτερους μύκητες τα ακόρεστα λιπαρά οξέα υπερισχύουν έναντι των κορεσμένων. Συγκεκριμένα, το παλμιτικό οξύ κυριαρχεί στα κορεσμένα λιπαρά οξέα, το ελαϊκό οξύ στα μονοακόρεστα και το λινελαϊκό οξύ στα πολυακόρεστα, ενώ το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στο σύνολο τους είναι το λινελαϊκό. Τα κύρια λιπαρά οξέα που συναντιούνται στα καρποσώματα και τα μυκήλια των ανώτερων μυκήτων είναι το παλμιτικό, το στεατικό, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ (Kalac, 2009; Kavishree κ.α., 2008; Yilmaz κ.α., 2006). Εκτός από τα προαναφερθέντα λιπαρά οξέα, υπάρχουν και άλλα που παράγονται μονάχα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (π.χ. είδος μύκητα, λόγος C/N, ανάδευση, διάρκεια καλλιέργειας) και καταγράφονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις π.χ. μυριστικό, λινολενικό, παλμιτελαϊκό. Οι Besralova κ.α. (2002) ανέφεραν ότι ο λόγος C/N δεν επηρεάζει μόνο τη λιπογένεση, αλλά και την ποσοστιαία σύσταση του λίπους, καθώς επίσης και την παρουσία ή όχι κάποιων λιπαρών οξέων που βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά. Οι Dimou κ.α. (2002) ανέφεραν για το μύκητα *P. ostreatus* ότι δεν βρέθηκαν λιπαρά οξέα με μακριές ακόρεστες αλυσίδες χωρίς διατροφική αξία ή οξέα όπως το α-λινολενικό με μη επιθυμητά τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, στο στέλεχος *P. ostreatus* βάσει ερευνών δεν έχει ανιχνευθεί λινολενικό οξύ (Hadar

και Cohen-Arazi, 1986; Manu-Tawiah και Martin, 1987), ενώ στο γένος *Morchella* spp. ανιχνεύτηκε (LeDuy κ.α., 1974). Περαιτέρω δε, ο συντελεστής ακορεστότητας των ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων εξαρτάται σε πολλές περιπτώσεις από το ποσοστό της λιπογένεσης, καθώς έχει δείχτει ότι όσο μεγαλύτερες ποσότητες λιπιδίων συντίθενται στα μυκήλια των μυκήτων, τόσο το λίπος αυτό είναι λιγότερο πλούσιο σε πολυακόρεστα ΛΟ και αντιστρόφως (Konova κ.α., 1987; Kavadia κ.α., 2001; Bepalova κ.α., 2002; Papanikolaou κ.α., 2004; Fakas κ.α., 2006; Vamvakaki κ.α., 2010). Επίσης, επειδή η ακορεστότητα των λιπαρών οξέων μπορεί να αυξηθεί με μείωση της θερμοκρασίας (Song και Cho, 1991; Pedneault κ.α., 2007) ή να ελαττωθεί (Li κ.α., 1992) απαιτείται προσοχή κατά τη χρήση των λιπαρών οξέων για ταξινομικούς κ.α. λόγους (Pedneault κ.α., 2007). Οι Kavishree κ.α. (2008) πρότειναν ως επιπρόσθετο βοηθητικό εργαλείο για την ταξινόμηση ειδών του ίδιου γένους, το λόγο λινελαϊκό/ελαϊκό οξύ.

Στην παρούσα εργασία, εκτός από τις σχετιζόμενες μελέτες με την κινητική βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης των κυτταρικών λιπιδίων, πραγματοποιήθηκε εκτενής ανάλυση σχετική με τη σύσταση σε ΛΟ των συνολικών λιπιδίων που παράχθηκαν από τους μελετώμενους εδώδιμους και φαρμακευτικούς μύκητες. Γενικά, το κύριο ΛΟ που ανιχνεύτηκε στα λιπίδια των μακρομυκήτων ήταν το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9,12\text{C}18:2$) (βλ. σχετικούς Πίνακες III.4, III.7α,β, III.16, III.22α,β, κ.λ.π.), ανεξαρτήτως το είδος του μακρομύκητα που εξετάστηκε, της ύπαρξης ανάδευσης και της συγκέντρωσης ή της φύσης της σακχαρούχου πηγής άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα. Παρόλα αυτά, υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην κατανομή των ΛΟ σε σχέση με την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης, το χρόνο ζύμωσης και τη συγκέντρωση και φύση της σακχαρούχου πηγής άνθρακα (για τον μύκητα *V. voluacea*). Στην πραγματικότητα, η παρούσα εργασία κατέδειξε την ύπαρξη τριών κατηγοριών μακρομυκήτων σε ό,τι αφορά τη σύσταση των κυτταρικών ΛΟ αυτών: στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μακρομύκητες στα μυκήλια των οποίων σε κάποιες στιγμές του αυξητικού κύκλου απαντάται σε (πολύ) αυξημένα ποσοστά (π.χ. >65%, κ.β.) το ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ (περιπτώσεις των *A. aegerita*, *F. velutipes*, *G. applanatum*) (βλ. Πίνακες III.8α,β). Οι μύκητες αυτοί εμφάνισαν σε σχετικά μικρότερα ποσά τα ΛΟ $\Delta^9\text{C}18:1$ και (κυρίως) $\text{C}18:0$. Στη δεύτερη κατηγορία απαντώνται εδώδιμοι μύκητες τα λιπίδια των οποίων εμφάνισαν μεν σε σχετικά αυξημένες ποσότητες το ΛΟ $\Delta^9,12\text{C}18:2$ (π.χ. ~30-50% κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων, αναλόγως με το χρόνο ζύμωσης), αλλά περιείχαν σε σχετικά αυξημένες ποσότητες και τα ΛΟ $\Delta^9\text{C}18:1$ (κυρίως) και $\text{C}18:0$ (περίπτωση του μύκητα *M. esculenta*). Τέλος, ανάλυση σε ΛΟ των λιπιδίων του μακρομύκητα *V. voluacea* έδειξε μια σχετική διαφοροποίηση στη σύστασή τους σε σχέση με τις προηγούμενες περιπτώσεις καθώς, ενώ και στην περίπτωση αυτή το

κυριαρχούν ΛΟ ήταν το $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$, υπήρξε στα κυτταρικά λιπίδια του μικροοργανισμού αυτού βιοσύνθεση σε μη-αμελητέα ποσά κορεσμένων μικρής ή μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας ΛΟ (C8:0, C10:0, C12:0 και C20:0). Σε κάθε περίπτωση τέλος, συντίθετο σε μη-αμελητέα ποσότητα το ΛΟ C16:0 (συνήθως στη δεύτερη θέση μετά το λινελαϊκό οξύ).

Στη βιβλιογραφία, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά νωρίς, οι Holtz και Schisler (1971) ανέφεραν ότι τα ΛΟ του *A. bisporus* περιείχαν $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ σε ποσοστό 83,7%, κ.β.. Ο Sumner (1973) ανέλυσε τα λιπίδια ενός μεγάλου αριθμού βασιδιομυκήτων (*Polyporus hirsutus*, *P. pubescens*, *Trametes versicolor*, *Trametes cinnabarina*, *Trametes hispidia*), τα οποία εμφάνισαν ποσοστά λινελαϊκού οξέος 49-61%, κ.β., ενώ το C16:0 και $\Delta^9\text{C18:1}$ υπήρχαν σε μικρότερα αλλά σημαντικά ποσοστά, όπως ακριβώς και στους μακρομύκητες της παρούσας μελέτης. Ακόμα, σε μελέτη των Hadar και Cohen-Arazi (1986) που αφορούσε στον μακρομύκητα *P. ostreatus* ο οποίος καλλιιεργήθηκε υπό ανάδευση (150 rpm) σε θρεπτικό που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη έγινε σύγκριση μεταξύ των λιπιδίων που υπάρχουν στο μυκήλιο και στο καρπόσωμα. Η σύσταση των λιπιδίων σε μυκήλιο και καρπόσωμα διέφερε, καθώς το μυκήλιο περιείχε περισσότερα κορεσμένα ΛΟ (40,5%, κ.β.), δεδομένο που έρχεται σε συμφωνία με την δική μας εργασία, ενώ το καρπόσωμα περιείχε περισσότερα ακόρεστα (83%, κ.β.) με κυρίαρχο λιπαρό οξύ το $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ (65%, κ.β.). Διαφορές στη σύσταση των ΛΟ μεταξύ μυκηλίου και καρποσώματος επισήμαναν και οι Nair κ.α. (1989) με το μυκήλιο να εμφανίζεται επίσης περισσότερο κορεσμένο σε σχέση με το καρπόσωμα του *P. sajor-caju*. Ακόμα, η μελέτη των Dimou κ.α. (2002) σχετικά με τη σύσταση σε ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων μιας μεγάλης ομάδας στελεχών του μύκητα *Pleurotus* (*P. abalonus*, *P. calyptratus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* και *P. sapidus*) έδειξε ότι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλα αυτά τα είδη ήταν το $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ με ποσοστό από 33-68%, κ.β., σε σημαντικές ποσότητες βρέθηκαν το C16:0 και το $\Delta^9\text{C18:1}$ (>12%, κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων), ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις το C18:0. Παρομοίως, οι Manu-Tawiah και Martin (1987) παρατήρησαν ότι σε αναδευόμενη υγρή καλλιέργεια (συνθήκες ανάδευσης 150 rpm) με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (45 g/l), την 8^η ημέρα της καλλιέργειας το κυρίαρχο ΛΟ για το είδος *P. ostreatus* ήταν το $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ (43,5% κ.β.) και ακολούθως τα $\Delta^9\text{C18:1}$ και C16:0 (18,4% κ.β.). Από τα υψηλότερα ποσοστά $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ οξέος καταγράφηκαν από τους Nair κ.α. (1989) στο μυκήλιο (56-61%, κ.β.) και κυρίως στο καρπόσωμα (67-84%, κ.β.) του *P. sajor-caju*, ωστόσο, ο βαθμός ακορεστότητας των λιπιδίων αύξανε κατά τη διάρκεια της μυκηλιακής αύξησης σε αντίθεση με τη φάση καρποφόρησης. Στην ίδια εργασία αναφέρθηκε ότι η προσθήκη λιπαρών υλών δεν επέδρασε στο λόγο μη πολικών: πολικών λιπιδίων. Επίσης, πολύ υψηλή ήταν η συγκέντρωση του $\Delta^{9,12}\text{C18:2}$ οξέος

στα μυκήλια και καρποσώματα (56-84%, κ.β.) των *Volvariella bombycina*, *Lyophyllum ulmarium* και *P. citrinopileatus* (Cheung, 1997). Η παρουσία σε μεγάλη συγκέντρωση του $\Delta^9,12\text{C}18:2$ (72-81%, κ.β.), όπως και σε μικρότερη του C16:0 (14-29%, κ.β.) οξέος παρατηρήθηκε και για τα λιπίδια του *V. volvacea* όταν καλλιεργήθηκε σε γλυκόζη (1,5% β/ο) από τους Li κ.α. (1992), ενώ με προσθήκη 1% β/ο ηλιελαίου μειώθηκε σημαντικά η ποσότητα του $\Delta^9,12\text{C}18:2$ οξέος με ανάλογη αύξηση του $\Delta^9\text{C}18:1$ και η μείωση της ακορεστότητας παρουσία λιπαρών υλών σχετίστηκε με αλλαγές στη περατότητα της μεμβράνης. Για το είδος *F. velutipes*, σύμφωνα με τους Bespalova κ.α. (2002), από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα κυριάρχησε το $\Delta^9,12\text{C}18:2$ (26,1%) και το $\Delta^9\text{C}18:1$ οξύ (34,7%) και από τα κορεσμένα το παλμιτικό (18,3%) και το στεατικό οξύ (5,8%, κ.β.). Όσον αφορά στο είδος *L. edodes*, τα κύρια λιπαρά οξέα που ανίχνευσαν οι Kitzberger κ.α. (2009) ήταν το $\Delta^9,12\text{C}18:2$ και το C16:0, ενώ για το C18:0 η συγκέντρωσή του επί των ενδοκυτταρικών λιπιδίων εξαρτήθηκε από το στέλεχος του μύκητα. Οι Kavishree κ.α. (2008) σε μελέτη τους στα λιπίδια των καρποσωμάτων των μανιταριών *Morchella conica*, *P. djamor*, *P. sajor-caju*, *Russula brevipes*, *Sparassis crispa*, *Lentinus sajor-caju*, *Lentinus squarulosus*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Macrolepiota procera*, *Morchella angusticeps*, και *M. procera* βρήκαν σημαντικά ποσοστά λινελαϊκού οξέος που κυμαίνονταν από 31,3-68,6% των συνολικών λιπιδίων. Γενικά, τα είδη που ανήκουν στο φύλο των βασιδιομυκήτων παρουσιάζουν διαφορές στην λιπιδιακή σύσταση (Weete, 1974; Miric κ.α., 1985). Ακόμα, οι Pedneault κ.α. (2008) εξέτασαν το λιπιδιακό προφίλ του καρποσώματος δέκα ειδών που ανήκαν στους βασιδιομύκητες και η περιεκτικότητά τους σε λιπίδια κυμαινόταν από 3,1% έως 16%, κ.β. ξηρής βιομάζας. Η περιεκτικότητα σε πολικά λιπίδια ήταν υψηλή, π.χ. στον *A. bisporus* ήταν 79%, κ.β. των ολικών λιπιδίων, στον *A. campestris* 86,8% και στον *C. comatus* 63,6%. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα εμφανίστηκαν στο μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων με μέσο όρο 74,4% κ.β.. Όπως και στα ουδέτερα λιπίδια, έτσι και στα πολικά, το παλμιτικό, το $\Delta^9\text{C}18:1$ και το $\Delta^9,12\text{C}18:2$ ήταν αυτά που κυριάρχησαν μεταξύ των 35 διαφορετικών λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετούς μακρομύκητες, τόσο σε μυκηλιακή μορφή (Dimou κ.α., 2002), όσο και στο καρπόσωμα (Dembitsky κ.α., 1992; Pedneault κ.α., 2006, Kavishree κ.α., 2008) κυρίαρχο ΛΟ ήταν το $\Delta^9\text{C}18:1$.

Επιπλέον, εκτός από κύρια ΛΟ που απαντώνται στα καρποσώματα και στα μυκήλια των ανώτερων μυκήτων (παλμιτικό, ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ - Hadar και Cohen-Arazi, 1986; Bespalova κ.α., 2002; Dimou κ.α., 2002; Yilmaz κ.α., 2006; Pedneault κ.α., 2007; Kavishree κ.α., 2008; Kalac, 2009; André κ.α., 2010 κ.λ.π.), έχει αναφερθεί και η παρουσία μικρής ανθρακικής αλυσίδας ΛΟ στα μυκήλια εδώδιμων μυκήτων. Έτσι χαμηλομοριακά ΛΟ

(C6:0-C12:0) ταυτοποιήθηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις (<0,5%, κ.β.) στα λιπίδια μυκήτων που ανήκουν στην οικογένεια Boletaceae (Pedneault κ.α., 2006; Yilmaz κ.α., 2006) ή στο γένος *Pleurotus* (Nair κ.α., 1989; Yilmaz κ.α., 2006; Pedneault κ.α., 2007). Ακόμα, οι Bespalova κ.α. (2002) ανίχνευσαν C11:0 (~0, 5%) στα μυκήλια των μακρομυκήτων *P. ostreatus* και *F. velutipes*, επισημαίνοντας ότι η παρουσία μικρομοριακών ΛΟ εξαρτάται από τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, το λόγο C/N και το είδος καλλιέργειας. Τα ΛΟ C13:0 και C14:0 ανιχνεύτηκαν σε μη-αμελητέα ποσοστά (π.χ. >7,0% κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων) σε μανιτάρια των ειδών *D. quercina* και *P. lenta* (Dembitsky κ.α., 1992), ενώ το ΛΟ C8:0 βρέθηκε σε πράγματι υψηλά ποσοστά (~25% κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων) στους στίπους του μανιταριού *C. comatus* (Yilmaz κ.α., 2006). Επίσης, ανιχνεύτηκαν σε μη-αμελητέες συγκεντρώσεις (π.χ. >6,0% κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων) χαμηλομοριακά ΛΟ (<C14:0) στα εδώδια μανιτάρια *M. procera*, *R. brevipes*, *Termitomyces shimperi* και *Termitomyces tylerance* (Kavishree κ.α., 2008). Επομένως, αρκετά από τα αποτελέσματα που αφορούσαν την ανάλυση των λιπιδίων του μακρομυκήτα *V. volvacea* της παρούσας μελέτης σε λιπαρά οξέα έρχονται σε συμφωνία με την σύγχρονη βιβλιογραφία. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η σύνθεση των ΛΟ των λιπιδίων του *V. volvacea* δε μεταβλήθηκε στη διάρκεια της ζύμωσής του, δηλαδή με την ηλικία της καλλιέργειας. Ομοίως, οι καλλιέργειες του *L. edodes* σε υποστρώματα με βάση τη βιομηχανική γλυκερόλη έδειξαν ότι η σύσταση σε ΛΟ των συνολικών κυτταρικών λιπιδίων ήταν σχεδόν σταθερή σε συνάρτηση με το χρόνο ζύμωσης (André κ.α., 2010). Αντίθετα, εξέταση άλλων μικροοργανισμών π.χ. *P. sajor-caju* έδειξε ότι η σύσταση των λιπιδίων σε ΛΟ παρουσίαζε σημαντικές διαφορές ως προς το χρόνο ζύμωσης - αύξηση του βαθμού ακορεστότητας των λιπιδίων του μυκηλίου (Nair κ.α., 1989) και αύξηση της ακορεστότητας των ΛΟ κατά τη διάρκεια της καρποφόρησης.

Επίσης, στην παρούσα εργασία κατέστη φανερό ότι η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης (αυξανόμενοι λόγοι C/N 20-60) στις καλλιέργειες του *V. volvacea* είχε σημαντική επίδραση στην ακορεστότητα των παραγόμενων ΛΟ, αυξάνοντας σημαντικά την ακορεστότητα των ΛΟ. Πιο ακόρεστα ήταν τα ΛΟ σε λόγο C/N=60 και τα κλάσματα NL και G+S, ενώ αυτό των PL ήταν σημαντικά πιο κορεσμένο. Ακόμα, το προφίλ των λιπαρών οξέων δε φάνηκε να μεταβάλλεται από την αρχή προς το τέλος της καλλιέργειας. Αντίθετα, για τους Bespalova κ.α. (2002), η αύξηση της αρχική συγκέντρωσης γλυκόζης (C/N 8-40) μείωσε σημαντικά την ακορεστότητα των λιπιδίων του *P. ostreatus*, ενώ αύξησε του *F. velutipes*. Μάλιστα και για τα δύο είδη καταγράφηκε σημαντικά υψηλότερη ποσότητα $\Delta^9,12$ C18:2 και Δ^9 C18:1 οξέος σε C/N=15 (σε σχέση με τον 40). Αντίθετα, οι Nair κ.α. (1989) ανέφεραν πως αύξηση του λόγου C/N (από 5:1 από 70:1) δεν είχε επίδραση στην

περιεκτικότητα των λιπιδίων του *P. sajor-caju*, ενώ αυξήθηκε το ποσοστό των μη πολικών λιπιδίων. Σε ό,τι αφορά τη σύνθεση των λιπιδίων των διαφόρων κλασμάτων του *V. voluacea*, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αύξηση του λόγου C/N είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του $\Delta^9,12\text{C18:2}$ οξέος (έως 77,3% στην υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης 95,4 g/l -C/N=60) στο κλάσμα των NL, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξησή του και στο κλάσμα των PL. Ακόμα, το κλάσμα των G+S περιείχε σε σημαντικό ποσοστό C16:0 το οποίο επίσης αύξανε με αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Γενικά, οι βασιδιομύκητες που μελετήθηκαν από τους Dembitsky κ.α. (1992) περιείχαν στο κλάσμα των NL (όπως και των TL) κυρίως C16:0, $\Delta^9\text{C18:1}$ και $\Delta^9,12\text{C18:2}$ οξύ, όπως και του *V. voluacea* της παρούσας μελέτης. Χαρακτηριστικά υψηλό ήταν το άθροισμα των τριών αυτών ΛΟ στους μακρομύκητες *Clitocybe* sp. (98,9%, κ.β.), *S. aeruginosa* (98,5%, κ.β.) και *P. lenta* (98%, κ.β.). Ωστόσο, σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, το κλάσμα των PL παρουσιάστηκε σε πολύ υψηλά ποσοστά ακόρεστο, κυρίως λόγω μεγάλης συγκέντρωσης $\Delta^9,12\text{C18:2}$ οξέος (σε πέντε είδη το ποσοστό του κυμάνθηκε από 60,6 έως 99,5%, κ.β.).

Τέλος, ανάλυση των φωσφολιπιδίων του *V. voluacea* σε έδειξε την παρουσία των κλάσεων PE, PC, PI, PS και PA, ενώ σημαντική επίδραση στη συγκέντρωσή τους είχε η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο (γλυκόζη, φρουκτόζη, άμυλο, ξυλόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη), η εφαρμογή ή όχι ανάδευσης, ο λόγος C/N και η ηλικία της καλλιέργειας (αρχή-τέλος ζύμωσης). Γενικά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις καταγράφηκαν στις κλάσεις PE (8-48%, κ.β.), PC (7-68%, κ.β.) και PI (5-57%, κ.β.), ενώ σε πολύ μικρότερο ποσοστό ανιχνεύτηκε PA (1,5-5,5%, κ.β.). Η ανάδευση προκάλεσε αύξηση των ποσοστών της κλάσης PC στα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη, της PE στη ξυλόζη και της PI στη σακχαρόζη. Αντίθετα, στις στατικές καλλιέργειες αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των κλάσεων PC στα υποστρώματα της ξυλόζης και της σακχαρόζης, PE στις φρουκτόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη και PI σε φρουκτόζη και άμυλο. Επίσης, κατά την καλλιέργεια του *V. voluacea* σε υπόστρωμα γλυκόζης με αυξανόμενους λόγους C/N καταγράφηκε αύξηση στα ποσοστά της PI από την αρχή προς το τέλος της ζύμωσης, με αντίστοιχη μείωση της PC.

Πρόκειται για μία από τις πρώτες εργασίες που πραγματοποιούνται στον *V. voluacea*, γι' αυτό και υπάρχει έλλειψη βιβλιογραφικών στοιχείων που να αφορούν τον συγκεκριμένο μακρομύκητα, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αντίστοιχα άλλων μυκήτων. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα φωσφολιπίδια των μυκήτων αποτελούνται κυρίως από τις κλάσεις PC και PE (Wassef και Hendrix, 1977; Kemp κ.α., 1984), σε συγκεντρώσεις από 33 έως 50%, κ.β. και 13 και 37%, κ.β. αντίστοιχα, σε μικρότερο ποσοστό από την PI (8-35%, κ.β.), ενώ η PS αποτελεί ένα μικρό μέρος των PL (Paltauf κ.α., 1969; Goni κ.α., 1978). Εξαιρέση

αποτελεί το μυκήλιο (και το καρπόσωμα) του *A. bisporus*, τα PL του οποίου κατά τους Byrne και Brennan (1975) περιέχουν PE και PS, αλλά καθόλου PC. Οι Holtz και Schisler (1971) από την άλλη πλευρά, υποστήριξαν ότι στα PL του *A. bisporus* κυριαρχούν οι κλάσεις PE και PC και ότι μικρές ποσότητες PS και PI ανιχνεύτηκαν μόνο στο καρπόσωμα. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η σύνθεση των PL των ευκαριωτικών μικροοργανισμών παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ανάλογα τα γενετικά και διατροφικά χαρακτηριστικά τους (Margnall και Getz, 1973). Οι Dembitsky κ.α. (1992) ανέφεραν ότι οι κύριες κλάσεις των PL στους μακρομύκητες που εξέτασαν (π.χ. *Clitocybe* sp., *D. confragora*, *D. quercina*, *S. aeruginosa*) ήταν οι PE και PC, το ποσοστό των οποίων κυμαίνονταν από 18,6 (*Phellinus* sp.) έως 50,3%, κ.β. (*Clitocybe* sp.) και 8,2 (*Phellinus* sp.) έως 50,1%, κ.β. (*S. aeruginosa*) αντίστοιχα. PA εντοπίστηκε μόνο σε τρία είδη μακρομυκήτων: αποτέλεσε το 28,5%, κ.β. στον *D. quercina*, το 17,2% στον *Phellinus* sp. και το 3,4%, κ.β. στον *P. lenta*. Η κλάση PDME επίσης ανιχνεύτηκε μόνο στους μακρομύκητες *Coriolus zonatus*, *D. confragora* var. *tricolor* και *P. lenta*. Σημειώνεται ότι τα PL στη πλειοψηφία των μακρομυκήτων περιείχαν liso-PE και liso-PC. Συμπερασματικά, τα PL που περιείχαν αμίνη ήταν πολύ περισσότερα (36,7-76,5%, κ.β.) από αυτά που περιείχαν χολίνη. Ακόμα, μελέτη των Nair κ.α. (1990) στα PL του *P. sajor-caju* έδειξε διαφοροποίηση στις κλάσεις ανάμεσα με μυκήλιο και καρπόσωμα. Συγκεκριμένα, υπήρξε μείωση σε PE, PI και PG (στο μυκήλιο) και αντίστοιχη αύξηση PC, PI και PE (στο καρπόσωμα). Επιπλέον, ανάλυση των PL μακρομυκήτων του γένους *Boletus* (Hanus κ.α., 2008) έδειξε ότι αυτά αποτελούνταν κυρίως από DGTS (6-61%, κ.β.) και PC (33-83%, κ.β.), αλλά και από PE, PI και PS σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Τέλος, καταγραφή των μεταβολών της συγκέντρωσης των PL διαφόρων στελεχών ζυγομυκήτων (*M. ramanniana*, *Mucor* sp. και *C. echinulata*) με τον χρόνο καλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε από τους Bellou κ.α. (2012) έδειξε μείωση της PI και PE και αύξηση των PS, PA και PC, σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα βασικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης που αφορούσαν στη δυναμική παραγωγής μυκηλιακής μάζας, εξωπολυσακχαριτών και λιπιδίων μακρομυκήτων σε υγρά θρεπτικά μέσα μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

- Μεγαλύτερες τιμές βιομάζας καταγράφηκαν τη 16^η ημέρα της καλλιέργειας και σε συνθήκες ανάδευσης (~14-19 g/l), με καλύτερο υπόστρωμα το GPYS. Πιο παραγωγικοί σε βιομάζα αναδείχθηκαν οι μακρομύκητες *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *F. velutipes* και *V. voluacea*, ενώ διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση της εκμετάλλευσης της γλυκόζης προς σχηματισμό βιομάζας ($Y_{X/Glc}$) με την βιοσύνθεση ενδοκοιταρικών πολυσακχαριτών ($Y_{IPS/Glc}$) και λιπιδίων ($Y_{L/Glc}$). Οι καλύτερες επιδόσεις βιομάζας του μύκητα *V. voluacea* παρουσιάστηκαν στα σάκχαρα γλυκόζη, άμυλο, φρουκτόζη και δευτερευόντως στη ξυλόζη

και για τις πηγές αζώτου, πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, ενώ υψηλός $Y_{X/Glc}$ (~0,7 g/g) αναφέρθηκε για την ξυλόζη στις στατικές καλλιέργειες. Σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης, η βιομάζα του μακρομύκητα *V. voluacea* αυξήθηκε (~22 g/l), αλλά μειώθηκε στο μισό ο συντελεστή απόδοσης βιομάζας $Y_{X/Glc}$.

- Η παραγωγή των EPS σχετίστηκε αρνητικά με την παραγωγή βιομάζας. Οι μύκητες διαφοροποιούνταν ανάλογα με το χρόνο παραγωγής των EPS_{max} και την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης. Η συγκέντρωση των EPS παρουσίασε μείωση καθώς εξελισσόταν η καλλιέργεια και αυξανόταν η συγκέντρωση της παραγόμενης μυκηλιακής μάζας. Για παραγωγή EPS από το *V. voluacea*, καλύτερα υποστρώματα ήταν οι γλυκόζη και φρουκτόζη (υπό αναδεδυόμενες συνθήκες) και οι ξυλόζη, άμυλο και φρουκτόζη (υπό στατικές), αλλά και υποστρώματα που δεν ευνόησαν την παραγωγή βιομάζας (π.χ. μαλτόζη, σακχαρόζη).

- Η διεργασία παραγωγής IPS που γενικά δεν ευνοήθηκε από την ανάδευση, φαίνεται ότι ήταν συνδεδεμένη με τη μικροβιακή αύξηση. Η συσσώρευση IPS στο μυκήλιο (σε % κ.β.) έδειξε να σχετίζεται θετικά με την παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων (g/l). Η παραγωγή των EPS και IPS φάνηκε ότι σχετιζόνταν αρνητικά, γεγονός που εκδηλώθηκε με χρονική διαφοροποίηση της βιοσύνθεσής τους, για μεν τους EPS στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, για δε τους IPS προς το τέλος της ζύμωσης. Η συγκέντρωση των IPS επηρεάστηκε από την πηγή C του υποστρώματος, με τις γλυκόζη, φρουκτόζη και άμυλο να ευνοούν την παραγωγή τους, ενώ ο αυξανόμενος περιορισμός σε άζωτο είχε ως αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση IPS από τον *V. voluacea* σε πολύ μεγάλες και διαρκώς αυξανόμενες ποσότητες (IPS_{max} 12,2 g/l για $Glc \sim 95$ g/l). Κύριο συστατικό των IPS ήταν η γλυκόζη ενώ σε ορισμένους μύκητες ανιχνεύθηκαν σε μικρότερα ποσοστά φρουκτόζη, μαννιτόλη και ξυλιτόλη, η συγκέντρωσή τους όμως ήταν συνάρτηση της εφαρμογής ή όχι ανάδευσης και του χρόνου ζύμωσης.

- Η παραγωγή λιπιδίων (g/l) έδειξε να σχετίζεται θετικά με την αύξηση της μυκηλιακής μάζας, ενώ η συσσώρευσή τους στο μυκήλιο ($Y_{L/X}$, % κ.β.) σχετιζόνταν αρνητικά με τη συγκέντρωση των IPS. Ο συντελεστής $Y_{L/X}$ επηρεάστηκε από τη σύσταση του θρεπτικού μέσου και κυμάνθηκε μεταξύ 3-22,5%, κ.β., ωστόσο η ποσότητα των λιπιδίων μειωνόταν με τη πρόοδο της καλλιέργειας (πιθανή ανακατανάλωση των κυτταρικών λιπιδίων). Η αύξηση του αρχικού λόγου C/N είχε ως απόρροια αξιοσημείωτη αύξηση του ποσοστού των παραγόμενων λιπιδίων του *V. voluacea* (από ~14% σε ~31% κ.β. επί ξηράς μάζας). Παρατηρήθηκε αλληλοδιαδοχή στη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών προϊόντων, καθώς αρχικά συντέθηκαν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις λιπίδια και κατόπιν υπήρξε αύξηση της συσσώρευσης των IPS με ταυτόχρονη αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

- Τα ακόρεστα ΛΟ αποτέλεσαν το ~72-74%, κ.β. των ολικών λιπαρών οξέων, ενώ τα κορεσμένα μόνο το ~26-28%, κ.β. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι μακρομύκητες *V. voluacea*, *M. esculenta* και *F. velutipes*, τα λιπίδια των οποίων ήταν αρκετά πιο κορεσμένα (33-49%, κ.β.). Η ανάδευση ευνόησε τη σύνθεση πιο ακόρεστων ΛΟ, ενώ επίσης η σύσταση των ΛΟ διαφοροποιείτο ως συνάρτηση του χρόνου ζύμωσης. Κύριο λιπαρό οξύ αναδείχθηκε το λινελαϊκό και ακολούθησαν τα ελαϊκό και παλμιτικό. Μη-αμελητέα ύπαρξη χαμηλομοριακών και υψηλομοριακών κορεσμένων ΛΟ (π.χ. C8:0, C10:0, C12:0, C20:0) ανιχνεύτηκαν στον *V. voluacea*. Η αύξηση του *V. voluacea* σε υποστρώματα με διάφορες πηγές C και σε αυξανόμενους αρχικούς λόγους C/N έδειξε αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις στο επίπεδο της σύστασης των λιπιδίων σε ΛΟ.

- Ποσοτικοποίηση των κλασμάτων των λιπιδίων των στελεχών *V. voluacea* έδειξε σχετικά υψηλότερη περιεκτικότητα του ουδέτερου κλάσματος (NL) των λιπιδίων (47-65% κ.β.) από το κλάσμα των γλυκολιπιδίων και σφιγκολιπιδίων (G+S), ενώ σε πολύ μικρότερα ποσά ανιχνεύτηκαν τα φωσφολιπίδια (PL). Ανάλυση ΛΟ των κλασμάτων έδειξε ως πιο κορεσμένο αυτό των PL. Ακόμα, στα πρώιμα στάδια της καλλιέργειας του *V. voluacea* 190, το ποσοστό των NL ήταν υψηλότερο και προϊούσης της διεργασίας υπήρξε εκλεκτική κατανάλωση των NL με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των G+S και των PL.

- Ανάλυση της σύστασης των PL έδειξε διαφοροποιήσεις σχετιζόμενες με τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν και το λόγο C/N, ενώ τα κύρια PL που ανιχνεύτηκαν ήταν οι κλάσεις φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και φωσφατυδυλοσερίνη (PS).

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adejaye, O.D., Adebayo-Tayo, B.C., Ogunjobi, A.A., Olaoye, O.A. and Fadahunsi, F.I. (2006). Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom. *African Journal of Biotechnology* 5 (14), 1355-1359.
- AFNOR (1984). Recueil des normes francaises des corps gras, grains oleagineux et produits derives. *Association Francaise pour Normalisation*. p. 95, Paris.
- Aggelis, G., Komaitis, M., Papanikolaou, S. and Papadopoulos, G. (1995α). A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms: I. Lipid accumulation during growth of *Mucor circinelloides* CBS 172-27 on a vegetable oil. *Grasas y Aceites* 46, 169-173.
- Aggelis, G., Komaitis, M., Papanikolaou, S. and Papadopoulos, G. (1995β). A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms: II. Study of cellular lipids of *Mucor circinelloides* CBS 172-27 during growth on a vegetable oil. *Grasas y Aceites* 46, 245-250.
- Aggelis, G. and Sourdis, J. (1997). Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie van Leeuwenhoek* 72 (2), 159-165.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V. and Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* 37, 3897-3904.
- Ahlawat, O.P., Pardeep, G. and Dhar, B.L. (2008). Profile of the extracellular lignocellulolytic enzymes activities as a tool to select the promising strains of *Volvariella volvacea* (Bull.ex Fr.) Sing. *Indian Journal of Microbiology* 48, 389-396.
- Ahlawat, O.P., Pardeep, G., Shwet, K. and Dhar, B.L. (2010). Variability in intra-specific and monosporous isolates of *Volvariella volvacea* based on enzyme activity, ITS and RAPD. *Indian Journal of Microbiology* 50 (2), 192-198.
- Akinyele, B.J. and Adetuyi, F.C. (2005). Effect of agrowastes, pH and temperature variation on growth of *Volvariella volvacea*. *African Journal of Biotechnology* 4, 1390-1395.
- Alvarez, H., Kalscheuer, R., and Steinbüchel, A. (2000). Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 218-223.
- André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2009). Biotechnological conversions of bio-diesel derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences* 9 (6), 468-478.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crop and Products* 31, 407-416.
- Archer, D.B., Connerton, I.F. and MacKenzie, D.A. (2008). Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 111, 99-147.
- Ardon, O., Kerem, Z. and Hadar, Y. (1996). Enhancement of lactase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Journal of Biotechnology* 51, 201-207.
- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M. and Legge, R.L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19, 771-783.
- Augustyn, O.P.H., Kock, J.F.L. and Ferreira, D. (1990). Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. 3. *Saccharomyces sensu lato*, *Arxiozyma* and *Pachydictyospora*. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 44-55.
- Babitskaya, V.G., Shcherba V.V., Puchkova T.A. and Smirnov, D.A. (2005). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: Factors affecting their production. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2 (41), 169-173.
- Bano, Z. and Rajarathnam, S. (1988). *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 27, 87-158.
- Bellou, S., Moustogianni, A., Makri, A. and Aggelis, G. (2012). Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by zygomycetes grown on glycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166, 146-158.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Casal, S., Oliveira, B. and Ferreira, I.C.F.R. (2007). Fatty acid and sugar compositions and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry* 105, 140-145.
- Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B. and Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology* 103, 77-86.
- Bespalova, L.A., Makarov O.E., Antonyuk L.P. and Ignatov V.V. (2002). Lipogenesis in the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* cultivated on different media. *Applied Biochemistry and Microbiology* 4 (38), 349-354.

- Bobek, P., Galbavy, S. and Ozdin, L. (1998). Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *Oncology Reports* 5 (3), 727-730.
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J. and Zhi-Bin, L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review* 13, 265-301.
- Breene, W.M. (1990). Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection* 53 (10), 883-894.
- Brock, D.T. (1951). Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* Fries. *Mycologia* 43 (3), 402-422.
- Burns, P.J., Yeo, P., Keshavarz, T., Roller, S. and Evans, C.S. (1994). Physiological studies of exopolysaccharide production from the basidiomycete *Pleurotus* sp. *florida*. *Enzyme and Microbial Technology* 16 (7), 566-572.
- Busmann, D. and Berger, R.G. (1994). Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 37, 39-43.
- Buswell, J.A. and Chen, M. (2005). Cultivation, biochemical, molecular biological and medicinal aspects of the culinary-medicinal straw mushroom *Volvariella volvacea* (Bull. Fr.) Singer (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 7, 157-166.
- Buswell, J.A., Cai, Y.J., Chang, S.-T., Peberdy, J.F., Fu, S.Y. and Yu, H.S. (1996). Lignolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 537-542.
- Byrne, P.F.C. and Brennan, P.J. (1975). The lipids of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 89, 245-255.
- Cai, Y.J., Buswell, J.A. and Chang, S.-T. (1994). Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycological Research* 98 (9), 1019-1024.
- Cai, Y.J., Buswell, J.A. and Chang, S.-T. (1998). β -glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 122-129.
- Cai, Y.J., Chapman, S.J., Buswell, J.A. and Chang, S.-T. (1999). Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied and Environmental Microbiology*, 553-559.
- Cavallazzi, J.R.P., Kassuya, C.M. and Soares, M.A. (2005). Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 36 (4), 383-387.
- Čertík, M. and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acids production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, 1-14.
- Čertík, M. and Sajbidor, J. (1996). Variability of fatty acid composition in *Mucor* and *Rhizopus* strains and its dependence on submerged and surface growth. *Microbios* 85 (344), 151-60.
- Čertík, M., Baltészov, L. and Šajbidor, J. (1997). Lipid formation and γ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Letters in Applied Microbiology* 25, 101-105.
- Chakravarty, D.K. and Mallick, A.K. (1979). Studies on the physiology of mushroom fungi, *Volvariella diplasia* and *V. esculenta*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 9, 9-2.
- Chandra, A. and Purkayastha, R.P. (1977). Physiological studies on Indian mushrooms. *Transactions of the British Mycological Society* 69, 63-70.
- Chang, S.-T. (1972). The Chinese mushroom (*Volvariella volvacea*), morphology, cytology, genetics, nutrition and cultivation, pp 99. The Chinese University of Hong Kong.
- Chang, S.-T. (1974). Production of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) from cotton wastes. *Mushroom Journal* 21, 348-353.
- Chang, S.-T. (1978). *Volvariella volvacea*. In *The biology and cultivation of edible mushrooms* (S.-T. Chang and W.A. Hayes eds.), pp. 573-605. Academic Press: New York.
- Chang, S.-T. (2008). Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In *Mushrooms as functional foods* (P.C.K. Cheung ed.), John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Chang, S.-T. and Miles, P.G. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact* (S.-T. Chang and P.G. Miles eds., 2nd edition), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Chang, S.C. and Steinkraus, K.H. (1981). Lignocellulolytic enzymes produced by *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (2), 440-446.
- Chang, S.T. and Miles, P.G. (1989). *Edible mushrooms and their cultivation*. (S.-T. Chang and P.G. Miles eds.) pp 345. CRC Press, Inc., Florida.
- Chang, H.-L., Chao, G.-R., Chen, C.-C. and Mau, J.-L. (2001). Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chemistry* 27, 87-158.
- Chang, M.Y., Tsai, G.J. and Houng, J.Y. (2006). Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 407-414.
- Chang-Ho, Y. and Yee, N.T. (1977). Comparative study of the physiology of *Volvariella volvacea* and *Coprinus cinereus*. *Transactions of the British Mycological Society* 68 (2), 167-172.
- Chang-Ho, Y. (1980). Some factors affecting cellulose utilization by *Volvariella volvacea* Sing. Presented at the Mycological Workshop at the York University, Toronto, Ontario.
- Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. and Papanikolaou, S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 1048-1057.

- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mysteriotti, P., Onjaro, G., Aggelis, G. and Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36 (2), 1097-1108.
- Chen, A.W. (2002). Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst (Reishi) in North America. *MushWorld-Cultivation*, [online], <http://www.mushworld.com>.
- Chen, Y.Y. and Graham, K.M. (1973). Studies on the padi mushroom (*Volvariella volvacea*), 1. Use of oil palm pericarp waste as alternative substrate. *Malaysian Agriculture Journal* 2, 15-22.
- Chen, S.C., Ma, D., Ge, W. and Buswell, J.A. (2003). Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letters* 218, 143-148.
- Cheung, P.C. (1997). Chemical evaluation of some lesser known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soy milk waste. *Food Chemistry* 60 (1), 61-65.
- Cheung, P.C. (1998). Plasma and hepatic cholesterol levels and facial neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. *Journal of Nutrition* 128, 1512-1516.
- Cheung, P.C. (2008). *Mushrooms as functional food* (P.C. Cheung ed.), Wiley, New York.
- Cohen, R., Persky, L. and Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 582-594.
- Confortin, F.G., Marchetto, R., Bettin, F., Camassola, M., Salvador, M. and Pinheiro Dillon, A.J. (2008). Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35 (10), 1149-1155.
- Crisan, E.V. and Sands, A. (1978). Nutritional value. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (S.T. Chang and W.A. Hayes eds.), Academic Press, New York.
- Chua, S.E. and Ho, S.Y. (1973). Fruiting on sterile agar and cultivation of straw mushrooms (*Volvariella volvacea*) on padi straw, banana leaves and sawdust. *World Crops* 25, 90-91.
- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M. and Marabottini, R. (2004). *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater : impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 54, 887-894.
- Das, D., Mondal, S., Roy, S.K., Maiti, D., Bhunia, B., Maiti, T.K., Sikda, S.R. and Islam, S.S. (2010). A (1→6)-b-glucan from a somatic hybrid of *Pleurotus florida* and *Volvariella volvacea*: isolation, characterization, and study of immunoenhancing properties. *Carbohydrate Research* 345, 974-978.
- Davies, J. and Holdsworth, J. (1992). Synthesis of lipids in yeasts, biochemistry, physiology and production. *Advances in Lipid Research* 1, 119-159.
- Delmas, J. (1989). *Les champignons et leur culture*. La Maison Rustique, Flammarion, Paris.
- Dembitsky, V.M., Shubina, E.E. and Kashin, A.G. (1992). Phospholipid and fatty acid composition of some basidiomycetes. *Phytochemistry* 3 (3), 845-849.
- Diderich, J.A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttkik, M.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., et al. (1999). Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15350-15359.
- Dijkstra, F.I. (1976). Submerged cultures of mushroom mycelium as sources of protein and flavor compounds. PhD thesis. Technitse Hogeschool, The Netherlands.
- Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2002). Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus spp.* and its application in the intragenetic differentiation. *Mycological Research* 106, 925-929.
- Dimou, D.M., Zervakis, G. and Polemis, E. (2008). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: IV. Macrofungi from *Abies cephalonica* forests and other intermixed tree species (Oxya Mt., central Greece). *Mycotaxon* 104, 39-42.
- Donogue, J.D. and Denison W.C. (1995). Shiitake cultivation: Gas phase during incubation influences productivity. *Mycologia* 87 (2), 239-244.
- D' Souza, T.V., Merritt, C.S. and Reddy, C.A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 5307-5313.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Elbing, K, Larsson, C., Bill, R.M., Albers, E., Snoep, J.L., Boles, E., Hohmann, S. and Gustafsson, L. (2004). Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5323-5330.
- Elisashvili, V.I., Kachlishvili, E.T. and Wasser, S.P. (2009). Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45 (5), 531-535.
- Elissetche, J.P., Ferraz, A., Freer, J. and Rodríguez, J. (2007). Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 429-434.
- El-Dein, M.M.N., El-Fallal, A.A., El-Shahat, Toson, A. and Faten, E.H. (2004). Exopolysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius*: Factors affecting formation and their structures. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (6), 1078-1084.
- El-Wakeil, F., Alian, A. and Hossein, W. (1982). Subcultivation of mushroom: I. Growth of *Morchella deliciosa* on corn steep liquor. *Egyptian Journal of Food Science* 10 (1-2), 121-126.

- Evans, C.T. and Ratlege, C. (1985). The role of the mitochondrial NAD⁺-isocitrate dehydrogenase in lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Canadian Journal of Microbiology* 31, 479-484.
- Fakas, S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M. and Aggelis G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 676-683.
- Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2007). Compositional shifts in lipid fractions during turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1321-1327.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2008). Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1062-1070.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2009 α). Biochemistry and biotechnology of single cell oil. In *New horizons in Biotechnology* (A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol and C.G. Dussard eds.), pp. 52-75, AsiaTech Publishers Inc., New Delhi.
- Fakas, S., Bellou, S., Makri, A. and Aggelis, G. (2009 β). Single cell oil and gamma-linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol. In *Microbial conversions of raw glycerol* (G. Aggelis ed.), pp. 85-99, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Fang, Q-H. and Zhong, J-J. (2002 α). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10, 61-65.
- Fang, Q-H. and Zhong, J-J. (2002 β). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37, 769-774.
- Fang, Q-H., Tang, Y-J. and Zhong, J-J. (2002). Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37, 1375-1379.
- Fang, J., Qu, Y. and Gao, P. (1997). Wide distribution of cellobiose-oxidising enzymes in wood-rot fungus indicates a physiological importance in lignocellulosics degradation. *Biotechnology Techniques* 11 (3), 195-197.
- Fasidi, I.O. (1996). Studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer: Cultivation on agricultural wastes and proximate composition of stored mushrooms. *Food Chemistry* 55, 161-163.
- Fasidi, I.O. and Olorunmaiye, K.S. (1994). Studies on requirements for growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry* 50, 397-401.
- Fasidi, I.O. and Akwakwa, D.O. (1996). Growth requirements of *Volvariella speciosa* (Fr. Ex. Fr.) Sing., a Nigerian mushroom. *Food Chemistry* 55 (2), 165-168.
- Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B. and Harvey, L.M. (2008). Submerged culture fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology* 63, 33-103.
- Feng, X., DeXian, W. and DongMei, Y. (2000). Effects of temperature, pH value and light intensity on the growth of *Morchella esculenta* hyphae. *Edible Fungi of China* 19 (5), 13-15.
- Feng, Y-L., Li, W-Q., Wu, X-Q., Cheng, J-W. and Ma, S-Y. (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* 49, 104-112.
- Feofilova, E.P., Gornova, I.B., Memorskaya, A.S. and Garibova, L.V. (1998). Lipid composition of fruiting bodies and submerged mycelium from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. *Mikrobiologiya* 67, 655-659.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 199, 833-841.
- FAOstat (2011). Food and Agriculture Programme. Organization of the United Nations.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G. and Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36, 4735-4744.
- Gadd, G. (2001). *Fungi in bioremediation*. (G. Gadd ed.), Cambridge University Press, Cambridge.
- Galiotou-Panayotou, M., Kalantzi, O. and Aggelis, G. (1998). Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exo-polysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 155-162.
- Garcha, H.S., Kalra, K.L. and Beg, G.M. (1979). Physiology of weed mushrooms. *Mushroom Science* 10 (2), 645-652.
- Garraway, O.M. and Evans, C.R. (1984). *Fungal nutrition and physiology*. Wiley, New York.
- Gbolagade, J, Ajayi, A, Oku, I. and Wankasi, D. (2006). Nutritive value of common wild edible mushrooms from southern Nigeria. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 1 (1), 16-21.
- Gern, R.M.M., Wisbeck, E., Rampinelli, R.J., Ninow, J.L. and Furlan S.A. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology* 99 (1), 76-82.

- Ginterová, A. (1973). Nitrogen fixation by higher fungi. *Biologia* 28, 199-202.
- Goni, F.M., Dominguez, J.B. and Uruburu, F. (1978). Plasmalogens in the yeast *Pullularia pullulans*. *Chemistry and Physics of Lipids* 22 (1), 79-81.
- Gregori, A., Svagelj, M. and Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology* 45 (3), 238-249.
- Groombridge, B. and Jenkins, M. (2002). World Atlas of Biodiversity. *New Scientist* 2374- 74.
- Hadar, Y. and Cohen-Arazi, E. (1986). Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (6), 1352-1354.
- Hammond, J.B.W. and Nichols, R. (1976). Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: Changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology* 93, 309-320.
- Hammond, J.B.W. and Nichols, R. (1979). Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus*: Changes in non-structural carbohydrates during periodic fruiting (flushing). *New Phytologist* 83 (3), 723-730.
- Hanuš, L.O., Shkrob, I. and Dembitsky, V.M. (2008). Lipids and fatty acids of wild edible mushrooms of the genus *Boletus*. *Journal of Food Lipids* 15, 370-383.
- Hassegawa, R.H., Kasuya, M.C.M., and Vanetti, M.C.D. (2005). Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology* 8, 2.
- Hattaka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In *Biopolymers* (M. Hofrichter and A. Steinbüchel eds.), pp. 129-180 Wiley-VCH, Weinheim.
- Hatvani, N. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1 (17), 71-74.
- Hiroi, M. and Tsuyuki, H. (1988). Comparison of fatty acids in fruit body and spore mushrooms. *Bulletin of the College of Agricultural and Veterinary Medicine* 45, 100-109.
- Holtz, R.B. and Schisler, L.C. (1971). Lipid metabolism of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing: 1. Analysis of sporophore and mycelial lipids. *Lipids* 6, 176-180.
- Hong, S.G. and Jung, H.S. (2004). Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 96 (4), 742-55.
- Hong, J.S., Kim, Y.H., Lee, K.R., Kim, M.K., Cho, C. I., Part, K.K.H., et al. (1988). Composition of organic and fatty acid in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus*. *Korean Journal of Food Science and Technology* 20 (1), 100-105.
- Horrobin, D.F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research* 31, 163-194.
- Horwitz, W. (1975). Official method of analysis of the association of official analytical chemists. AOAC, Washington DC, pp. 46-47.
- Hsieh, C., Hsu, T.H. and Yang, F.C. (2005). Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochemistry* 40, 909-916.
- Hsieh, C., Tseng, M-H. and Liu, C-J. (2006). Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 109-117.
- Hsu, H.C., Hsu, C.I., Lin, R.H., Kao, C.L. and Lin, J.Y. (1997). Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochemical Journal* 323, 557-565.
- Huang, P. (1993). Mushroom cultivation hunan. *Hunan Science and Technology Publication*, 206-221.
- Huang, B.-H., Yung, K.-H. and Chang, S.T. (1985). The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. *Mycologia* 77 (6), 959-963.
- Huang, L.-C., Huang, S.-J., Chen, C.-C. and Mau, J.-L. (1999). Antioxidant properties of *Antrodia camphorata*. In *Proceeding of 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, pp. 275-283, Sydney, Australia.
- Imtiaj, A., Alam, S., Islam, A.K.M.R., Kim, S.B. and Lee, T.S. (2007). Screening of optimal culture conditions for the mycelial growth of edible and medicinal mushrooms. *Bangladesh Journal of Mushroom* 1 (1), 71-78.
- Imtiaj, A., Jayasinghe, C., Lee, G.W. and Lee, T.S. (2009). Comparative study of environmental and nutritional factors on the mycelial growth of edible mushrooms. *Journal of Culture Collections* 6, 97-105.
- Israilides, C. and Philippoussis, A. (2003). Bio-technologies of recycling agro-industrial wastes for the production of commercially important polysaccharides and mushrooms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 20, 247-259.
- Israilides, C., Kletsas, D., Arapoglou, D., Philippoussis, A., Pratsinis, H., Ebringerova, A., Hribalova, V. and Harding, S.E. (2008). In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine* 15, 512-519.
- Jabaji-Hare, S. (1988). Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* 80, 622-629.
- Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hyun, H., Lee, G.W., Lee, T.S. and Lee, U.Y. (2008). Favorable culture conditions for mycelia growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. *The Korean Society of Mycology* 36 (1), 28-33.
- Jeffery, J., Kock, J.L.F., Botha, A., Coetzee, D.J. and Botes P.J. (1997). The value of lipid composition in the taxonomy of the Schizosaccharomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek* 72, 327-335.

- Jeurink, P.V., Noguera, C.L., Savelkoul, H.F.J. and Wichers, H.J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* 8, 1124-1133.
- Jonathan, S.G., Fasidi, I.O. and Ajayi, E.J. (2004). Physico-chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. *Food Chemistry* 85, 339-342.
- Jong, S.-C. and Donovan, R. (1989). Antitumor and antiviral substances from fungi. *Advances in Applied Microbiology* 34, 183-262.
- Kalac, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113, 9-16
- Kalyoncu, F., Oskay, M. and Kalyoncu, M. (2009). The effects of some environmental parameters on mycelial growth of six *Morchella* species. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 3 (2), 467-472.
- Kaul, T.N. (1977). Physiological studies on *Morchella* spp. I. Nitrogen utilization. *Mushroom Journal* 58, 1-6.
- Kaul, T.N. (1978). Physiological studies on *Morchella* spp. II. Carbon utilization. *Bulletin of Botanic Society of Bengal* 31, 35-42.
- Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. and Aggelis, G. (2001). Lipid and gamma linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *Journal of the American Oil Chemists Society* 78, 341-346.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B.R., Shashirekha, M.N. and Rajarathan, S. (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry* 106, 597-602.
- Kemp, P., Landre, D.J. and Orpin, C.G. (1984). The lipids of the rumen fungus *Piromonas communis*. *Journal General Microbiology* 130, 27-37.
- Kim, D.H., Shim, S.B. and Jang, I.S. (1999). β -Glucuronidase inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 22, 162-164.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H. and Yun, J.W. (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters of Applied Microbiology* 34, 56-61.
- Kim, H.O., Lim, J.M., Joo, J.H., Hwang, H.J., Choi, J.W. and Yun, J.W. (2005). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology* 96, 1175-1182.
- Kim, H.M., Paik, S.-Y., Ra, K.S., Koo, K.B., Yun, J.W. and Choi, J.W. (2006). Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *The Journal of Microbiology* 233-242.
- Kim, S.S., Lee, J.S., Cho, J.Y., Kim, Y.E. and Hong, E.K. (2010). Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* liquid culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 4, 351-355.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*, pp. 272 10th ed. CABI, Wallingford.
- Kishida E., Sone Y. and Misaki A. (1989). Purification of an antitumor-active, branched (1-3)-beta-D-glucan from *Volvariella volvacea* and elucidation of its fine structure. *Carbohydrate Research* 93, 227-239.
- Kishida, E., Kinoshita, C., Sone, Y. and Misaki, A. (1992). Structures and antitumor activities of polysaccharides isolated from mycelium of *Volvariella volvacea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56 (8), 1308-1309.
- Kitzberger, C.S.G., Lomonaco, R.H., Michielin, E.M.Z., Danielski, L., Correia, J. and Ferreira, S.R.S. (2009). Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. *Journal of Food Engineering* 90, 35-43.
- Konova, I.V., Rudakova L.M., Pan'kina O.I. and Ovsyannikova M.A. (1987). Lipogenesis in *Cunninghamella japonica* on Physiologically Different Media. *Izvestiya Akademii Nauk.* 3, 346-352.
- Koutinas, A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A. and Bosnea, L.A. (2009). Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology* 100, 3734-3739.
- Krzyszczkowski, W., Malinowska, E., Suchocki, P., Kleps, J., Olejnik, M. and Herold, F. (2009). Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chemistry* 113 (1), 351-355.
- Kurtzman, R.H. Jr. and Chang-Ho, Y. (1982). Physiological considerations for cultivation of *Volvariella* mushrooms. In *Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods* (S.T. Chang and T.H. Quimio eds.), pp 139-166, Chinese University Press, Hong Kong.
- Lakhtar, H., Ismaili-Alaoui, M., Philippoussis, A., Perraud-Gaime, I. and Roussos, S. (2010). Screening of *Lentinula edodes* strains cultivated on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenols degradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64 (3), 167-172.
- Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y. and Schwartz, B. (2006). An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters* 244, 61-70.

- Leatham, G.F. and Griffin, T.J. (1984). Adapting liquid spawn *Lentinus edodes* to oak wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 20, 360-363.
- LeDuy, A., Kosaric N. and Zajic, J.E. (1974). Morel mushroom mycelium growth in waste sulfite liquors as a source of protein and flavoring. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 7 (1), 44-50.
- Lee, S.Y. and Kang, T.S. (1996). Production conditions and characterization of the exo-polymer produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 24, 111-118.
- Lee, K.M., Lee, S.Y. and Lee, H.Y. (1999). Bistage control of pH for improving exopolysaccharides production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (6), 646-650.
- Lee, B.C., Bae, J.T., Pyo, H.B., Choe, T.B., Kim, S.W., Hwang, H.J. and Yun, J.W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycetous *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 369-376.
- Lee, W.Y., Park, Y., Ahn, J.K., Ka, K.H. and Park, S.Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 249-254.
- Li, Y., Cho, K.Y., Wu, Y.Z. and Nair, N.G. (1992). The effect of lipids and temperature on the physiology and growth of *Volvariella volvacea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 621-626.
- Li, P.Z., Xu, R. and Zhang, K.C. (2000). Relationship between mycelia morphology and yield of extrapolymer in the culture of *Ganoderma lucidum*. *Industrial Microbiology* 30 (3), 20.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. and Blackburn, J.W. (2010) Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology* 101, 6745-6750.
- Lin, J.Y. and Chou, T.B. (1984). Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *Journal of Biochemistry* 96, 35-40.
- Lin, S.C., Lo, Y.C., Lin, J.Y. and Liaw, Y.C. (2004). Crystal structures and electron micrographs of fungal volvatoxin A2. *Journal of Molecular Biology* 343, 477-491.
- Liu, Q-N., Liu, R-S., Wang, Y-H., Mi, Z-Y., Li, D-S. and Tang, Y-J. (2009). Fed-batch fermentation of *Tuber melanosporum* for the hyperproduction of mycelia and bioactive *Tuber* polysaccharides. *Bioresource Technology* 100 (14), 3644-3649.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J. and Julich, W.D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2, 285-299.
- Litchfield, J.H. (1968). The production of fungi. In *Single Cell Protein* (R.I. Mateles and S.R. Tannebaum eds.), pp. 309, M.I.T. Press, Cambridge.
- Litchfield, J.H., Overbeck R.C. and Davinson, R.S. (1963). Factors affecting growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Agricultural and Food Chemistry* 11 (2), 158-162.
- Lomberh, M.L., Solomko, E.F., Buchalo, A.S. and Kirchoff, B. (2002). Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. In *Mushroom Biology and Mushroom Products* (J.E. Sánchez, G. Huerta and E. Montiel eds), pp. 279-287, UAEM, Cuernavaca.
- Losel, D.M. (1988). Fungal lipids. In *Microbial Lipids* (C. Ratledge, and S.G. Wilkinson eds), pp. 699-805, Academic Press, London.
- Lull, C., Wichers, H.J. and Savelkoul, H.F.J. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation* 2, 63-80.
- Maeda, Y.Y., Hamuro, J. and Chihara, G. (1974). The nature of immunopotentiality by the antitumor polysaccharide lentinan and the significance of biogenic amines in its action. *International Journal of Cancer* 12, 259-281.
- Maga, J.A. (1981). Mushroom flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29, 1-4.
- Maganhotto de Souza Silva, C.M., I. Soares de Melo. and P. Roberto de Oliveira, P. (2005). Lignolytic enzyme production by *Ganoderma* species. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 324-329.
- Makri, A., Fakas, S. and Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology* 101, 2351-2358.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Vivanti, V., Paci, M. and Pizzoferrato, L. (1999). In *Mushrooms as a source of functional ingredients*. Euro Food Chemistry X European Conference on Functional foods. A new challenge for the food chemistry, pp 86-93, Budapest, Hungary.
- Manzi, P., Aguzzi, A. and Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry* 3 (73), 321-325.
- Manu-Tawiah, W. and Martin, A.M. (1987). Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiology* 4, 303-310.
- Margnall, D. and Getz, G.S. (1973). Phospholipids. In *Lipids and Biomembranes of Eucaryotic Microorganisms* (J.A. Erwin ed.), pp.145-195, Academic press, New York and London.
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L. and Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 30 (8), 1914-1918.

- Masaphy, S., Zabari, L. and Goldberg, D. (2009). New long-season ecotype of *Morchella rufobrunnea* from North Israel. *Micologia Applicada International* 21(2), 45-55.
- Matilla, P., Vaananen, P.-S., Konko, K., Aro, H. and Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6419-6422.
- Mau, J.-L., Chyau, C.C., Li, J.-Y. and Tseng, Y.-H. (1997). Flavor compounds in straw mushrooms *Volvariella volvacea* harvested at different stages of maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4726-4729.
- Mau, J.-L., Chang C.-N., Huang S.-J. and Chen, C.-C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry* 87 (1), 111-118.
- Maziero, R., Cavazzoni, V. and Bononi, V.L.R. (1999). Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia* 30, 77-84.
- Meeuwse, P., Tramper, J. and Rinzema, A. (2011). Modeling lipid accumulation in oleaginous fungi in chemostat cultures. II : Validation of the chemostat model using yeast culture data from literature. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34, 951-961.
- Meeuwse, P., Akbari, P., Tramper, J. and Rinzema, A. (2012). Modeling growth, lipid accumulation and lipid turnover in submerged batch cultures of *Umbelopsis isabellina*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 591-603.
- Meng, F., Liu, X., Jia, L.L., Song, Z., Deng, P. and Fan, K. (2010). Optimization for the production of exopolysaccharides from *Morchella esculenta* SO-02 in submerged culture and its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers* 79, 700-704.
- Micales, J.A. (1995). In vitro oxalic acid production by the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Material und Organismen* 29, 159-176.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Minato, K.-i. (2010). Mushrooms: Immunomodulating activity and role in health promotion. In *Dietary Components and Immune Function* (R.R. Watson, ed.), pp. 529-539, Springer, New York.
- Minussi, R.C., Pastore, M.G. and Duran, N. (2007). Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology* 98, 158-164.
- Miric, O., Lalic, V.Z. and Miletic, D.I. (1985). The composition of some lipid fractions (phospholipids, triglycerides, free fatty acids, sterols) of wild growing edible mushrooms. *Hrana ishrana* (Yugoslavia) 26, 123-128.
- Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: food functions and medicinal effects of mushroom fungi. *Food Reviews International* 11, 7-21.
- Mizuno, T. (1999). The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 9-30.
- Moonmoon, M., Uddin, Md.N., Khan, A.S. and Ruhul Amin, S.M. (2008). Effect of culture media and environmental factors on the mycelial growth of *Volvariella volvacea*. *Bangladesh Journal of Mushroom* 2, 33-42.
- Moreton, R.S. (1988). Physiology of lipid accumulation. In *Single cell oil* (R.S. Moreton, ed.), Longmans, Harlow, UK.
- Nair, N.G., Song, C.H., Jiang, J.H., Vine, J.H., Tattum, B. and Cho, K.Y. (1989). Lipid profile of *Pleurotus sajor-caju*. *Annals of Applied Biology* 114, 167-176.
- Nair, N.G., Holley, M.P., Song, C.H. and Cho, K.Y. (1990). Lipid metabolism of *Pleurotus sajor-caju*. *Annual Appliance of Microbiology* 116, 455-462.
- Nichols, P., Stulp, B.K., Jones, J.G. and White, D.C. (1986). Comparison of fatty acid content and DNA homology of the filamentous gliding bacteria *Vitreoscilla*, *Flexibacter* and *Filibacter*. *Archives of Microbiology* 146, 1-6.
- Nithan, B. and Janardhanan, K.K. (2008). Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3193-3199.
- Novotný, C., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. and Šašek, V. (2004). Lignolytic fungi in bioremediation: Extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1545-1551.
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merthautová, V. and Zervakis, G. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88 (5), 620-626.
- Nwokoye, A.I., Kuforiji, O.O. and Oni, P.P. (2010). Studies on mycelial growth requirements of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Singer. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 10, 70-89.
- Ofosu-Asiedu, A., Schmidt, O. and Liese, W. (1984). Growth studies of *Volvariella volvacea* for cultivation on wood waste. *Material and Organism* 19, 241-251.
- Ohga, S. and Royse, D. J. (2001). Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters* 201, 111-115.

- Okhuoya, J.A., Isikhuemhen, O.S. and Tomo, H.A. (2000). Effect of soil factors on growth and yield during sporophore induction from sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Sing. *The International Journal of Mushroom Science* 3, 3-7.
- Oso, B.A. (1977). *Pleurotus tuber-regium* from Nigeria. *Mycologia* 69 (2), 271-279.
- Ouzouni, P., Petridis, D., Koller, W.D., Riganakos, K.A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115, 1575-1580.
- Paltauf, F. and Schats, G. (1969). Promitochondria of anaerobically grown yeast. II. Lipid composition. *Biochemistry* 8, 335.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2003). Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Current Microbiology* 46, 398-402.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 639-654
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2011α). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 1031-1051.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2011β). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 1052-1073.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G. and Marc, I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek* 80, 215-224.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. and Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology* 92, 737-744.
- Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology* 97, 867-875.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. (2006). Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology* 52, 134-142.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 1060-1070.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. (2008). Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl-esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy* 32, 60-71.
- Papanikolaou, S., Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Nicaud, J.M. and Aggelis, G. (2009). Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 1221-1232
- Papanikolaou, S., Diamantopoulou, P., Chatzifragkou, A., Philippoussis, A. and Aggelis, G. (2010). Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy and Fuels* 24, 4078-4086.
- Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M. and Aggelis, G. (2011). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1138-1150.
- Papaspyridi, L.M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E. and Christakopoulos, P. (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibre contents of *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal* 50, 131-138.
- Papaspyridi, L.M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E. and Christakopoulos, P. (2011). Growth and biomass production with enhanced β-glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences* 11 (1), 65-74.
- Papinutti, L. (2010) Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology* 101, 1941-1946.
- Papinutti, L. and Lechner, B. (2008). Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 1715-1721.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, M.D., Miller, J.I. et al. (2005). Diets and cardiovascular disease: An evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology* 45 (9), 1379-1387
- Park, J.P., Kim, Y.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Cho, Y.J., Lee, Y.S., Song, C.H. and Yun, J.W. (2002). Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelia morphology in *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 433-438.
- Paterson, R.R.M. (2006). *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory (Review). *Phytochemistry* 67, 1985-2001.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A. and Tweddell, R.J. (2006). Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycological Research* 110, 1179-1183.

- Pedneault, K., Angers, P., Avis, T.J., Gosselin, A. and Tweddell, R.J. (2007). Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures. *Mycological Research* 111, 1228-1234.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A. and Tweddell, R.J. (2008). Fatty acid profiles and neutral lipids of ten species of higher basidiomycetes indigenous to eastern Canada. *Mycological Research* 112, 1428-1434.
- Philippoussis, A. (2009). Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. In: *Biotechnology for Agro-industrial Residues Processing* (P. Sing Nigam and A. Pandey eds.), pp. 163-196, Springer, New York.
- Philippoussis, A. and Balis, C. (1995). Studies on the morphogenesis of sclerotia and subterranean mycelial network of ascocarps in *Morchella* species. In *Science and Cultivation of Edible Fungi* (T.J. Elliott ed.), pp. 847-855, Balkema, Rotterdam, Oxford.
- Philippoussis, A., Zervakis, G. and Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (2), 191-200.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P. and Zervakis G. (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6), 551-557.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G. and Papanikolaou, S. (2011). Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (2), 285-297.
- Pilz, D., McLain R., Alexander, S., Villareal-Ruiz, L., Berch, S., et al. (2007). *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-710. Portland, OR: US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, pp. 161.
- Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 20-33.
- Pokhrel, C.P. and Ohga, S. (2007). Submerged culture conditions for mycelia yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry* 105, 641-646.
- Prosser, J.I. (1994). Kinetics of filamentous growth and branching. In *The growing fungus* (N.A.R. Gow and G.M. Gadd eds.), pp. 301-317, Chapman and Hall, London.
- Przybyłowicz, P. and Donoghue, J. (1990). *Shiitake Growers Handbook, the art and science of mushrooms cultivation*, pp 1-100, Kendal/Hunt Publishing Company, San Francisco.
- Racz, L., Papp, L., Prokai, B. and Kovacz, Zs. (1996). Trace element determination in cultivated mushrooms. An investigation of manganese, nickel and cadmium intake in cultivated mushrooms using ICP atomic emission. *Microchemical Journal* 54, 444-451.
- Radzhabova, A.A, Allakhverdiev A.D. and Gumbatova R.I. (1990). Regulation of lipid synthesis and unsaturation in *Mortierella* fungi. *Mikrobiologiya* 59 (6), 982-987.
- Rai, R.D., Kamal, S. and Singh, S.K. (2004). Effect of wheat bran supplementation to the sawdust substrate on mycelial growth rate and production of extracellular degradative enzymes by the medicinal reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphylophoromycetidae). *International Journal for Medicinal Mushrooms* 6 (4), 116-124.
- Rast, D. (1965). Zur stoffwechselphysiologischen bedeutung von mannit und trehalose in *Agaricus bisporus*. *Planta* 64, 81-93.
- Ratledge, C. (1989). Microbial routes to lipids. *Biochemical Society Transactions* 17 (6), 1139-1141.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In *Technological advances in improved and alternative sources of lipids* (B.S. Kamel and Y. Kakuda eds.), pp. 235-291, Blackie Academic and Professional, London.
- Ratledge, C. (1997). Microbial lipids. In *Biotechnology, vol. 7, Products of secondary metabolism* (H. J. Rehm, R., Reed, A., Pulher, P., Stadler, H. Kleinkauf and H. von Dohren eds.), 2nd edition, pp. 135-197, VCH, Weinheim.
- Ratledge, C. and Gilbert, S.C. (1985). Carnitine acetyltransferase activity in oleaginous yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 27 (3), 273-275.
- Ratledge, C. and Wynn, J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 51, 1-51.
- Reusser, F., Spencer, F.T. and Sallans, H.R. (1957). Protein and fat content of some mushrooms growing in submerged culture. *Applied Microbiology* 6 (1), 1-4.
- Reshetnikov, S.V., Wasser, S.P. and Tan, K.K. (2001). Higher Basidiomycetes as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides, review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3, 361-394.
- Reverberi, M., Di Mario, F. and Tomati, U. (2004). β -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 217-225.
- Reyes, R.G., Eguchi, F., Iijima, T. and Higaki, M. (1998). Physiological considerations for efficient mycelia colonization of Philippine strains of *Volvariella volvacea*. *Journal of Wood Science* 44, 408-413.

- Řezanka, T., Rozentsvet, O.A., and Dembitsky, V.M. (1999). Characterization of the hydroxy fatty acid content in Basidiomycotina. *Folia Microbiologica* 44, 635-641.
- Ríos, S. and Eyzaguirre, J. (1992) Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 667-669.
- Rigas, F., Papadopoulou, K., Philippoussis, A., Papadopoulou, M. and Chatzipavlidis, J. (2009). Bioremediation of lindane contaminated soil by *Pleurotus ostreatus* in non sterile conditions using multilevel factorial design. *Water Air Soil Pollution* 197, 121-129.
- Rodriguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martinez, A.T. and Martinez, M.J. (2004), Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 212-217
- Samelis, J., Rementzis, J., Tsakalidou, E. and Metaxopoulos, J. (1998). Usefulness of rapid GC analysis of cellular fatty acids for distinguishing *Weissella viridicens*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* and some non-identifiable, arginine-negative *Weissella* strains of meat origin. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 260-265.
- Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A. and Ballero, M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 31, 223-235.
- Shannon, C.J. and Stevenson K.E. (1975). Growth of fungi and BOD reduction in selected brewery wastes. *Journal of Food Science* 40, 826-829.
- Shao, W., and Tang, M. (2002). Study on the fermentation condition of soymilk by *Ganoderma lucidum* and other fossils. *Edible Fungi* 6, 39-40 (in Chinese).
- She, Q.B., Ng, T.B. and Liu, W.K. (1998). A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from fruiting bodies and cultivated mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 106-111.
- Shen, J., Yao, J-f, Tanida, M., Horii, Y. and Nagai, K. (2011). An evidence-based perspective of *Lentinus edodes* (shiitake mushroom) for cancer patients. In *Evidence-based Anticancer Complementary and Alternative Medicine* (W.C.S. Cho ed.), pp. 303-317, Springer, The Netherlands.
- Shi, Y.-L., Benzieb, I.F.F. and Buswel, J.A. (2002). Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences* 70 (14), 1595-1608.
- Shim, S.M., Oh, Y.H., Lee, K.R., Kim, S.H., Im, K.H., Kim, J.W., Lee, U. Y., Shim, J.O., Shim, M.J., Lee, M.W., Ro, H.S., Lee, H.S. and Lee, T.S. (2005). The characteristics of cultural conditions for the mycelia growth of *Macrolepiota procera*. *The Korean Society of Mycology* 33 (1), 15-18.
- Shin, K.S., Yu, K.W., Lee, H.K., Lee, H., Cho, W.D. and Suh, H.J. (2007). Production of anti-complementary exopolysaccharides from submerged culture of *Flammulina velutipes*. *Food Technology and Biotechnology* 45 (3), 319-326.
- Silva, E.M., Machucab, A. and Milagres, A.M.F. (2005). Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry* 40, 161-164.
- Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Ruthes, A.C., Czelusniak, P.A., Santana-Filho, A.P., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers* 87 (1), 368-376.
- Smith, J.E., Rowan N.J. and Sullivan, R. (2002). Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kisida, E. and Misaki, A. (1985). Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 2641-2653.
- Song, C.H. and Nair, N.G. (1987). A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycology* 81, 514-522.
- Song, C.H. and Cho, K.Y. (1991). Effect of low temperature shock treatment on sporophore initiation, lipid profile and nutrient transport in *Lentinula edodes*. *Mycologia* 83 (1), 24-29.
- Song, C.H., Yiang, J.Y., Vine, J.H., Tattum, B. and Cho, K.Y. (1989). Lipid profile of *Pleurotus sajor caju*. *Annual Appliance of Microbiology* 114, 167-176.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E. and Hadar, Y. (2006). Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters* 28, 1425-1429.
- Stahl, P.D. and Klug, M.J. (1996). Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4136-4146.
- Stajić, M., Glamočlija, J., Maksimović, V., Vukojević, J., Simonić, J. and Zervakis, G. (2011). A comparative study of the potential of polysaccharide production and intracellular sugar composition within Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllorphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13 (2), 153-158.
- Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medical mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley.
- Stamets, P. (2005). Mycelium running: how mushrooms can save the world. pp. 343, Ten Speed Press, Berkeley.

- Steffen, K.T. (2003). *Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi*. PhD thesis. University of Helsinki.
- Sumner, J.L. (1973). The fatty acid composition of basidiomycetes. *New Zealand Journal of Botany* 11, 435-442.
- Szuecs, J. (1958). Method of growing mushroom mycelium and the resulting products. U.S. Patent 2, 850, 841.
- Tabata, K., Itoh, W., Kojima, T. and Misaki, K. (1981). Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *Carbohydrate Research* 89, 121-135.
- Tang, Y.-J. and Zhong, J.-J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 20-28.
- Tang, Y.-J. and Zhong, J.-J. (2003). Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 478-484.
- Tang, Y.-J. and Zhong, J.-J. (2004). Modeling the kinetics of cell growth and ganoderic acid production in liquid static cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* 21 (3), 259-264.
- Tang, Y.-J., Zhu, L.-W., Li, H.-M. and Li, D.-S. (2007) Submerged culture of mushrooms in bioreactors – Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology* 45, 221-229.
- Tang, Y.-J., Zhu, L.-L., Li, D.-S., Mi, Z.-Y. and Li, H.-M. (2008). Significance of inoculation density and carbon source on the mycelial growth and *Tuber* polysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Process Biochemistry* 43, 576-586.
- Tang, Y.-J., Zhang, W., Liu, R.-S., Zhu L.-W, and Zhong, J.-J. (2011) Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Process Biochemistry* 46, 404-408.
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P. and Tew, K.D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56 (5), 215-222.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- Tokimoto, K., and Komatsu, M. (1982). Influence of temperature on mycelial growth and primordium formation in *Lentinus edodes*. *Transactions of Mycological Society* 23, 385-390.
- Tomati, U., Berardinelli, M., Galli, E., Iori, V., Capitani, D., Mannina, L. Viel, S. and Serge, A. (2004). NMR characterization of the polysaccharide fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill wastes waters. *Carbohydrate Research* 339, 1129-1134.
- Tonial, T.M. Pandey, A, Chiarella, M.D. and Soccol, C.R. (2000). Cultivation of *Volvariella volvacea* to produce biomass from potato and cassava processing residues by submerged fermentation. *Indian Journal of Microbiology* 40 (1), 35-40.
- Torres-López, R.I. and Hepperly, P.R. (1988). Nutritional influences on *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing. growth in Puerto Rico. I. Carbon and nitrogen. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 72 (1), 19-29.
- Torres-Ramos, C.A., Yoder, B.L., Burgers, P.M.J., Prakash, S. and Prakash, L. (1996). Requirement of proliferating cell nuclear antigen in RAD6-dependent postreplicational DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9676-9681.
- Tsai, S.Y., Weng, C.C., Huang, S.J., Chen, C.C. and Mau, J.L. (2006). Nonvolatile taste components of *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *LWT-Food Science and Technology* 39, 1066-1071.
- Tseng, H.-Y., Lee, L.-Y., Li R.-C. and Mau, J.-L. (2005). Non-volatile flavour components of *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 90, 409-425.
- Tseng, D.S. (1974). Studies on nutritional requirements and improvement of techniques in cultivation of straw mushroom *Volvariella volvacea* (Bull. Ex. Fr.) Sing. M.Sc. thesis, National China Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Tsioulpas, A., Dimou D., Iconomou D. and Aggelis G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 84, 251-257.
- Vamvakaki, A.N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences* 10, 348-360.
- Van der Westhuizen, J.P.J., Kock, J.L.F., Smit, E.J. and Lategan, P.M. (1987). The value of long-chain fatty acid composition in the identification of species representing the basidiomycetous genus *Rhodospiridium*. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 31- 34.
- Vicini, G., Mitchell D.A. and Krieger, N. (2003). A model for converting solid state fermentation growth profiles between absolute and relative measurement bases. *Food Technology and Biotechnology* 41 (3), 191-201.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J. (1999). Principles of structural analysis and sequencing of glycans. In *Essentials of glycobiology* (A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, and J. Marth eds.), La Jolla, CA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Volk, T.J. and Leonard, T.J. (1990). Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94 (3), 399-406.

- Volz, P.A. (1966). In vitro studies on species and mutants of *Agaricus*, *Cantharellus*, *Lepista*, *Pleurotus* and *Volvariella*. Ph. D. Thesis, Michigan State University, East Lansing.
- Volz, P.A. (1972). Nutritional studies on species and mutants of *Lepista*, *Cantharellus*, *Pleurotus* and *Volvariella*. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 48 (2-3), 175-185.
- Volz, P.A. and Beneke, A.S. (1969). Nutritional regulation of basidiocarp formation and mycelia growth of Agaricales. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 37, 225-253.
- Vostrovský, V. and Jablonská, E. (2011). Geographical analysis of the mushroom growing possibilities in the developing countries. *Agricultura Tropica et Subtropica* 44 (4), 229-234.
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Sasaki, G.L. and Lopes, Amazonas, M.A.L.A. (2004). Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology* 114, 153-164.
- Wang, J., Hu, S., Liang, Z. and Yeh, C. (2005). Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 759-766.
- Wannet, W.J.B., van der Drift, C. and Op den Camp, H.J.M. and van Griensven, L.J.L.D. (2000). Trehalose and mannitol metabolism in *Agaricus bisporus*. In *Science and Cultivation of Edible Fungi* (L.J.L.D. Van Griensven ed.), pp. 63-70, Balkema, Rotterdam.
- Weber N.S. and Weber, J.A. (1988). *A morel hunter's companion* (N.S. Weber and J.A. Weber eds.), Two Peninsula Press, East Lansing, Michigan.
- Wassef, M.K. and Hendrix, J.W. (1977). Ceramide aminoethylphosphonate in the fungus *Pythium prolatum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 486 (1), 172-178.
- Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 31-62.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 258-274.
- Wasser, S.P. (2010). Shiitake. In *Encyclopedia of dietary supplements*, 2nd edn., pp. 719-726, Informa Healthcare, New York.
- Weete, D.J. (1974). Fungal lipid biochemistry: distribution and metabolism. In *Monographs in Lipid Research*. (D. Kritchevsky ed.), vol.1, pp. 134-139, Plenum Press, New York.
- Weete, J.D. (1980). *Lipid biochemistry of fungi and other microorganisms*, pp. 388, Plenum Press, New York.
- Wei, Y., Tianyou, Z. and Yoichiro, I. (2001). Counter-current chromatographic separation of glycoprotein components from *Morchella esculenta* (L.) with a polymer phase system by a cross-axis coil planet centrifuge. *Journal of Chromatography* 917, 347-351.
- Weng, Y.P., Lin, Y. P., Hsu C. I., and Lin, J.Y. (2004). Functional domains of a pore-forming cardiotoxic protein, volvatoxin A2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6805-6814.
- Willam, A., Trzcinski, T. and Willam-Engels, L. (1956). La croissance du mycelium de la morille. *Mushroom Science* 3, 283-308.
- Winder, R.S. (2006). Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycological Research* 110, 612-623.
- Wolff, R.L., Lavielle, O., Pedrono, F., Pasquier, E., Destaillets, F., Marpeau, A.M., Angers, P. and Aitzetmuller, K. (2002). Abietoid seed fatty acid composition -a review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of Pinaceae. *Lipids* 37, 17-26.
- Wu, J.-Z., Cheung, P.C.K., Wong, K.-H. and Huang, N.-I. (2004). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: Effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry* 85 (1), 101-105.
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X. and Zhao, Z.B. (2010). Phosphate limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* 101, 6124-6129.
- Wynn, J. P., Hamid, A.A., Midgley, M. and Ratledge, C. (1998). Widespread occurrence of ATP: citrate lyase and carnitine acetyltransferase in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 145-147.
- Wynn, J.P., Hamid, A.A., Li, Y. and Ratledge, C. (2001). Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology* 147, 2857-2864.
- Xiao, J.H., Chen, D.X., Xiao, Y., Liu, Z.L., Wan, W.H., Fang, N., Tan, B.B., Liang, Z.Q. and Liu, A.I. (2004). Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. *Process Biochemistry* 39, 2241-2247.
- Xu, C-P. and Yun, J.W. (2004). Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 33-39.
- Xu, H., Sun, L-P., Shi, Y-Z., Wu, Y-H., Zhang, B. and Zhao, D-Q. (2008α). Optimization of cultivation conditions for extracellular polysaccharide and mycelium biomass by *Morchella esculenta* As51620. *Biochemical Engineering Journal* 39, 66-73.

- Xu, P., Ding Z.Y., Qian Z., Zhao C.X. and Zhang, K.C. (2008β). Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 325-331.
- Xu, K., Liang, X., Gao, F., Zhong, J. and Liu, J. (2010). Antimetastatic effect of ganoderic acid T in vitro through inhibition of cancer cell invasion. *Process Biochemistry* 45, 1261-1267.
- Yang, F.-C. and Liao, C.-B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry* 33 (5), 547-553.
- Yang, H. and Zhang, L. (2009). Changes in some components of soymilk during fermentation with the basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry* 112, 1-5.
- Yang, F.C., Ke, Y.F. and Kuo, S.S. (2000). Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures *Enzyme and Microbial Technology* 27, 295-301.
- Yang, J.H., Lin, H.C. and Mau, J.L. (2001). Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 72, 465-471.
- Yao, Q.Z., Yu, M.M., Ooi, L.S., Ng, T.B., Chang, S.T., Sun, S.S. and Ooi, V.E. (1998). Isolation and characterization of a type 1 ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the edible mushroom (*Volvariella volvacea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 788-792.
- Yilmaz, N., Solmaz, M., Turkecul, I. and Elmastas, M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 99, 168-174.
- Yokokawa, H. (1980). Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of 10 species of Polyporaceae. *Phytochemistry* 19 (12), 2615-2618.
- Zadrasil, F. (1975). Influence of CO₂ concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *European Journal of Applied Mycology* 1, 327-335.
- Zadrazil, F. (1978). Cultivation of *Pleurotus*. In *Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (S.T. Chang and W.A. Hayes eds.) pp. 521-557. New York: Academic Press.
- Zervakis, G. and Balis K. (1996). A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research* 100 (6), 717-731.
- Zervakis, G., Yiakas, P. and Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38, 237-243.
- Zervakis, G.I., Philippoussis, A., Ioannidou, S. and Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* 46, 231-234.
- Zervakis, G.I., Dimou, D., Polemis, E. and Karadelev, M. (2002α). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: II. Macrofungi associated with conifers in Taygetos Mountain (Peloponnese). *Mycotaxon* 83, 97-126.
- Zervakis, G.I., Polemis, E. and Dimou, D. (2002β). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: III. Macrofungi recorded in Quercus forests in southern Peloponnese. *Mycotaxon* 84, 141-162.
- Zhao, F.-Y., Lin, J.-F., Zeng, X.-L., Guo, L.-Q., Wang, Y.-H. and You, L.-R. (2010). Improvement in fruiting body yield by introduction of the *Ampullaria crosseana* multi-functional cellulase gene into *Volvariella volvacea*. *Bioresource Technology* 101, 6482-6486.
- Zhang, J.-G., Chen, X.-M. and Xin-Sheng, H.E. (2007). A Study on the synthetic characteristics of the extracellular polysaccharide (EPS) of *Ganoderma lucidum* cultured in batch fermentation using a kinetic model. *Chinese Journal of Biotechnology* 23 (6), 1065-1070.
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K. and Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology* 18, 4-19.
- Zhang, G.P., Zhang, F., Ru, W.M., Han, J.R. (2009). Solid state fermentation of cornmeal with the ascomycete *Morchella esculenta* for degrading starch and upgrading nutritional value. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 15-20.
- Zhong, J.J., Tang, Y.-J. and Fang, Q.H. (2003). Submerged fermentation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* for production of polysaccharide and ganoderic acid. In *Fermentation Biotechnology ACS symposium series*, 862 (B.C. Saha ed.), pp. 108-23. American Chemical Society, Washington DC.
- Zhong, J.J. and Tang, Y.-J. (2004). Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Advanced Biochemical Engineering/Biotechnology* 87, 25-59.
- Zhou, Y., Hong-bo, S. and Chen, D. (2009). Effects of organic nitrogen and carbon sources on mycelial growth and polysaccharides production and their optimization in the submerged culture of *Grifola umbellata*, a Chinese medicinal herb. *African Journal of Biotechnology* 8 (20), 5202-5214.
- Zou, X. (2006). Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry* 41 (4), 970-974.
- Αγγελής, Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 691.
- Διαμαντίδης, Γ. (2007). Εισαγωγή στη Βιοχημεία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 416.
- Ιωραηλίδης, Κ. και Φιλίππουσης, Α. (2005). *Lentinus edodes*. Ένα παραδοσιακό φάρμακο φυτικής προέλευσης από το Βασίλειο των μυκήτων. *BIO* 15, 62-65.

- Φιλιπούσης, Α. (1999). Βιολογία και καλλιέργεια των μανιταριών *Pleurotus* sp. Έκδοση ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε - Ινστιτούτο Γεωργικών Μηχανών και Κατασκευών, Αθήνα, σελίδες 30.
- Φιλιπούσης, Α. (2003α). Βιοτεχνολογία παραγωγής εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών. Έκδοση ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε - Ινστιτούτο Γεωργικών Μηχανών και Κατασκευών, Αθήνα, σελίδες 60.
- Φιλιπούσης, Α. (2003β). Μελέτη της μορφογένεσης μυκήτων του γένους *Morchella*. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, σελίδες 220.
- Φιλιπούσης, Α. (2010). Διατρο-φαρμακευτική αξία, βιολογία και καλλιέργεια του μανιταριού *Lentinula edodes*. Έκδοση ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε - Ινστιτούτο Γεωργικών Μηχανών και Κατασκευών, Αθήνα, σελίδες 35.
- Φιλιπούσης, Α. και Διαμαντοπούλου, Π. (2001). Δυνατότητες οικολογικής διαχείρισης λιγνοκυτταρινούχων γεωργικών υπολειμμάτων και αποβλήτων με την καλλιέργεια μανιταριών. Πρακτικά της διημερίδας 'Όλοκληρωμένη διαχείριση οργανικών αποβλήτων και υπολειμμάτων'. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα, σελ. 159-170.

