



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ  
ΣΕ ΑΠΟΤΟΞΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΚΑΙ  
ΕΔΩΔΙΜΗ ΒΙΟΜΑΖΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΓΙΩΡΓΟΥ Κ. ΚΟΥΤΡΩΤΣΙΟΥ  
ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΕΡΒΑΚΗΣ  
ΑΘΗΝΑ 2019**





AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF AGRICULTURAL PRODUCTION, INFRASTRUCTURE AND ENVIRONMENT

DEPARTMENT OF CROP SCIENCE

LABORATORY OF GENERAL AND AGRICULTURAL MICROBIOLOGY

**BIOCONVERSION OF AGRICULTURAL BY-  
PRODUCTS INTO DETOXIFIED DERIVATIVES AND  
EDIBLE BIOMASS THROUGH THE USE OF  
SELECTED STRAINS OF BASIDIOMYCETES**



PhD Thesis

GEORGIOS KOUTROTSIOS

ATHENS 2019



# ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

## **Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής**

Γεώργιος Ι. Ζερβάκης (επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πέτρος Ταραντίλης

Καθηγητής, Εργαστήριο Γενικής Χημείας  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## **Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής**

Νικόλαος Καλογερόπουλος

Καθηγητής, Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυτικοχημείας Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής  
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Παναγιώτης Κατινάκης

Καθηγητής, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κωνσταντίνος Μουντζούρης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Θρέψεως και Διατροφής  
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευάγγελος Τόπακας

Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας  
Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο



Γεώργιος Κουτρώτσιος

**Βιομετατροπές γεωργικών παραπροϊόντων σε αποτοξικοποιημένα παράγωγα και  
εδώδιμη βιομάζα με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, αρ. 202, παρ. 2)*

*Η πνευματική ιδιοκτησία αποκτάται χωρίς καμία διατύπωση και χωρίς την ανάγκη ρήτρας απαγόρευσης των προσβολών της. Πάντως κατά το ν. 2121/1993, όπως μεταγενέστερα τροποποιήθηκε ιδίως με το αρ. 81, ν. 3057/2002 καθώς και με τα αρ. 1, 2 και 4, ω. 3524/2007 και τη διεθνή σύμβαση της Βέρνης (που έχει κυρωθεί με το ν. 100/1975), απαγορεύεται η αναδημοσίευση και γενικά η αναπαραγωγή του παρόντος έργου, με οποιονδήποτε τρόπο, (ηλεκτρονικό, μηχανικό, φωτοτυπικό, ηχογράφησης ή άλλο) τμηματικά ή περιληπτικά, στο πρωτότυπο ή σε μετάφραση ή άλλη διασκευή, χωρίς γραπτή άδεια του συγγραφέα.*

*Το μη αποκλειστικό δικαίωμα αναπαραγωγής αντιγραφής (για λόγους ασφαλείας και συντήρησης) και διάθεσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπό ηλεκτρονική μορφή, για εκπαίδευση, ερευνητική και ιδιωτική χρήση και όχι για χρήση που αποσκοπεί σε εμπορική εκμετάλλευση, παραχωρείται στη Βιβλιοθήκη και Κέντρο Πληροφόρησης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.*





## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιου Ζερβάκη. Με την ευκαιρία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου για την συνεχή καθοδήγηση, την ενθάρρυνση και τη βοήθεια του σε πάσης φύσεως δυσκολίες. Χωρίς αυτόν η παρούσα διατριβή δεν θα είχε την παρούσα μορφή. Εκτός αυτών, το ήθος που μου δίδαξε με κάνει να νιώθω ότι βελτιώθηκα ως άνθρωπος και γι' αυτό τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη, ο οποίος ως μέλος της τριμελούς επιτροπής και του εργαστηρίου που εργάστηκα, βοήθησε σημαντικά σε όλα τα επιστημονικά και τεχνικά θέματα που προέκυψαν όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και την άμεση βοήθεια του όποτε χρειάστηκε.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Νίκο Καλογερόπουλο για την άψογη συνεργασία μας, τη συνεχή επικοινωνία και τις συμβουλές του. Με τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κώστα Μουντζούρη συνεργαστήκαμε για μεγάλο χρονικό διάστημα σε σειρά χημικών αναλύσεων και στην συγγραφή εργασιών. Η βοήθεια και οι συμβουλές του ήταν καθοριστικές και τον ευχαριστώ από καρδιάς. Επιπλέον, ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς επιτροπής Καθηγητή Παναγιώτη Κατινάκη και Επίκουρο Καθηγητή Ευάγγελο Τόπακα, οι οποίοι δέχθηκαν να με βοηθήσουν στην υλοποίηση της διατριβής. Αν και δεν συνεργαστήκαμε στενά, οι παρουσιά τους ήταν καταλυτική όποτε απαιτήθηκε.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας και συγκεκριμένα τους Δημήτρη Γεωργακόπουλο, Αναστασία Ταμπακάκη, Ηώ Κεφαλογιάννη, Πόπη Παπαμελετίου και Χρήστο Φωτιάδη για τη συνεργασία τους και το ευχάριστο κλίμα εργασίας του Εργαστηρίου.

Σημαντική συμβολή για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής μέσω της παροχής εξοπλισμού, της βοήθειας τους σε χημικές αναλύσεις και τις επιστημονικές τους συμβουλές είχαν επίσης η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αδαμαντίνη Κυριακού, η Επίκουρος Καθηγήτρια Ανδριάννα Καλιώρα και η υποψήφια διδάκτορας Εύη Μήτσου από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, ο Καθηγητής Κωνσταντίνος Γεωργίου και ο διδάκτορας Γιώργος Δανέζης από το Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ο ΕΤΕΠ Στέλιος Δάλλας από το Εργαστήριο Εδαφολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και η ΕΤΕΠ Μαρία Γεωργιάδου από το Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Ευχαριστώ επίσης την εταιρία "Δίρφυς" και συγκεκριμένα τους Λευτέρη Λαχουβάρη και Θανάση Μαστρογιάννη, οι οποίοι συνέβαλαν ουσιαστικά μέσω της προμήθειας εμπορικών υποστρωμάτων, σπόρου μανιταριών και αναλωσίμων αλλά και της διάθεσης χώρων της εταιρίας για την υλοποίηση πειραμάτων σε συνθήκες εμπορικής καλλιέργειας όποτε τους ζητήθηκε. Οι ατελείωτες συζητήσεις μας και η εμπειρία τους με βοήθησαν ουσιαστικά στην κατανόηση των αναγκών της σύγχρονης καλλιέργειας μανιταριών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον φίλο και συνεργάτη Ηλία Πολέμη για τις συμβουλές του και τη συνεργασία μας αλλά και για την παρότρυνση του να ξεκινήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας Βασιλική Φρυσούλη, Βασίλη Δασκαλόπουλο, Γιώργο Μπεκιάρη και τους δεκάδες προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου Κώστα και Γιώτα, την αδερφή μου Πέλα και την σύντροφό μου Ιωάννα, χωρίς την αδιάλειπτη αγάπη και υποστήριξη των οποίων, η πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήταν ανέφικτη. Ευχαριστώ επίσης από καρδιάς τους φίλους μου που στάθηκαν στο πλευρό μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Δυστυχώς με δύο από αυτούς δεν θα μπορέσουμε να τα ξαναπούμε από κοντά και τους αφιερώνω την παρούσα διατριβή.

*Στους δύο Γιώργηδες*



## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
1.1 Φυτική βιομάζα – Λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα .....	8
1.1.1 Γενικά.....	8
1.1.2 Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων .....	8
1.1.3 Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.....	9
1.1.3.1 Κυτταρίνη .....	10
1.1.3.2 Χημική δομή της κυτταρίνης .....	10
1.1.3.3 Χημικές ιδιότητες της κυτταρίνης .....	12
1.1.3.4 Φυσικές ιδιότητες της κυτταρίνης .....	13
1.1.3.5 Ημικυτταρίνη.....	15
1.1.3.6 Χημική δομή της ημικυτταρίνης.....	16
1.1.3.7 Χημική δομή της ξυλογλουκάνης.....	17
1.1.3.8 Χημική δομή της μαννάνης .....	18
1.1.3.9 Χημική δομή γαλακτάνης και αραβιογαλακτάνης.....	18
1.1.3.10 Χημική δομή της αραβινάνης.....	18
1.1.3.11 Φυσικοχημικές ιδιότητες της ημικυτταρίνης.....	19
1.1.3.12 Λιγνίνη .....	19
1.1.3.13 Χημική δομή της λιγνίνης.....	20
1.1.3.14 Φυσικοχημικές ιδιότητες της λιγνίνης .....	22
1.1.4 Προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.....	23
1.1.5 Βιοαποδόμηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων .....	25
1.1.6 Λιγνολυτικά ένζυμα.....	27
1.1.6.1 Λακκάσες .....	28
1.1.6.2 Υπεροξειδάσες.....	31
1.1.6.3 Υπεροξειδάσες της λιγνίνης .....	32
1.1.6.4 Υπεροξειδάσες του μαγγανίου.....	32
1.1.7 Βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας.....	35
1.2 Παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας.....	40
1.2.1 Γενικά.....	40
1.2.2 Συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου και παραγόμενα απόβλητα .....	41
1.2.3 Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων – Προτεινόμενοι μέθοδοι αξιοποίησης.....	42

1.2.3.1	Εξάτμιση .....	43
1.2.3.2	Απευθείας εφαρμογή στο έδαφος.....	44
1.2.3.3	Φυσικοχημική επεξεργασία .....	44
1.2.4	Βιοτεχνολογικές μετατροπές υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου .....	45
1.2.4.1	Αποτοξικοποίηση με τη χρήση μικροοργανισμών .....	45
1.2.4.2	Συγκομποστοποίηση .....	45
1.2.4.3	Αναερόβια χώνευση .....	46
1.2.4.4	Εξαγωγή αξιοποιήσιμων χημικών ενώσεων .....	46
1.2.5	Ημίρρευστο απόβλητο ελαιοτριβείων δύο φάσεων –Προτεινόμενοι μέθοδοι αξιοποίησης.....	47
1.2.6	Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας ημίρρευστου ελαιοτριβείου δύο φάσεων .....	48
1.2.6.1	Ξήρανση και εκχύλιση του εναπομείναντος ελαίου .....	49
1.2.6.2	Δυνατότητες αξιοποίησης για την παραγωγή ενέργειας .....	49
1.2.6.3	Απευθείας διάθεση στο έδαφος .....	49
1.2.7	Βιοτεχνολογικές μετατροπές ημίρρευστου αποβλήτου ελαιοτριβείων 2 φάσεων .....	50
1.2.7.1	Αναερόβια χώνευση .....	50
1.2.7.2	Ζύμωση στερεάς φάσης.....	50
1.2.7.3	Κομποστοποίηση .....	51
1.2.7.4	Εκχύλιση αξιοποιήσιμων προϊόντων .....	52
1.2.7.5	Άλλες προτεινόμενες εφαρμογές αξιοποίησης .....	53
1.2.8	Άλλα στερεά υπολείμματα.....	53
1.3	Στέμφυλα οινοποιίας .....	54
1.3.1	Γενικά.....	54
1.3.2	Χημική σύσταση .....	54
1.3.3	Δυνατότητες αξιοποίησης των στέμφυλων .....	55
1.4.	Μύκητες .....	58
1.4.1.	Γενικά.....	58
1.4.2.	Ταξινομική κατάταξη μυκήτων.....	59
1.4.3.	Μορφολογία και κυτταρική δομή των μυκήτων.....	59
1.4.4.	Αναπαραγωγή μυκήτων .....	61
1.4.5.	Βασιδιομύκητες.....	63
1.4.6.	Βιολογικός κύκλος βασιδιομυκήτων .....	64
1.4.7.	Μύκητες λευκής σήψης .....	67

1.4.8.	Επίδραση της βιολογικής επεξεργασίας στα χαρακτηριστικά της φυτικής βιομάζας .....	68
1.4.9.	Παράγοντες που επηρεάζουν την επεξεργασία της λιγνοκυτταρίνης με μύκητες λευκής σήψης.....	70
1.4.9.1	Στέλεχος του μύκητα .....	70
1.4.9.2	Πηγή και συγκέντρωση αζώτου .....	71
1.4.9.3	Προσθήκη Mn <sup>2+</sup> και Cu <sup>2+</sup> .....	73
1.4.9.4	Αερισμός.....	74
1.4.9.5	Περιεχόμενη υγρασία .....	74
1.4.9.6	Συγκέντρωση ιόντων Η (pH) .....	75
1.4.9.7	Θερμοκρασία.....	76
1.5	Καλλιέργεια μανιταριών σε λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα και αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα .....	77
1.5.1.	Γενικά.....	77
1.5.2	Διατροφική αξία των μανιταριών .....	81
1.5.3	Είδη του γένους <i>Pleurotus</i> .....	85
1.5.3.1	<i>Pleurotus ostreatus</i> .....	86
1.5.3.2	<i>Pleurotus eryngii</i> .....	86
1.5.3.3	<i>Pleurotus nebrodensis</i> .....	87
1.5.3.4	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> .....	87
1.5.4	<i>Cyclocybe cylindracea</i> .....	89
1.5.5	<i>Hericium erinaceus</i> .....	91
1.5.6	<i>Ganoderma lucidum</i> .....	92
1.6	Εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών – Δυνατότητες αξιοποίησης ....	95
1.5.2	Ανάκτηση ενζύμων και χρήση τους σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης .....	96
1.6.2	Παρασκευή ζωοτροφών .....	98
1.6.3	Φυτική παραγωγή .....	100
1.6.4	Επαναχρησιμοποίηση στην καλλιέργεια μανιταριών.....	101
1.6.5	Εφαρμογές φυτοπροστασίας .....	101
1.6.6	Παραγωγή ενέργειας και άλλες εφαρμογές .....	102
1.7	Οργάνωση των πεπραγμένων της παρούσας διατριβής .....	104
	Κεφάλαιο 2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	107
	Κεφάλαιο 2.1 Διερεύνηση της ενδοειδικής ποικιλοότητας των καλλιεργητικών παραμέτρων και της συγκέντρωσης επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών σε μανιτάρια του είδους <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	109

2.1.1	Εισαγωγή .....	110
2.1.2	Υλικά και μέθοδοι.....	110
2.1.2.1	Μυκηλιακά στελέχη .....	110
2.1.2.2	Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού ("σπόρου") μανιταριών .....	111
2.1.2.3	Προσδιορισμός των καλλιεργητικών παραμέτρων .....	111
2.1.2.4	Προετοιμασία δειγμάτων μανιταριών .....	112
2.1.2.5	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών .....	112
2.1.2.6	Εκχύλιση φαινολικών και προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών .....	113
2.1.2.7	Προσδιορισμός επιμέρους φαινολικών συστατικών και τερπενικών οξέων ...	114
2.1.2.8	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων μανιταριών..	115
2.1.2.9	Προσδιορισμός β- γλουκανών .....	115
2.1.2.10	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	116
2.1.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	116
2.1.3.1	Αξιολόγηση των καλλιεργητικών παραμέτρων.....	116
	<i>Brachychiton porulneus</i> .....	119
2.1.3.2	Λιπαρά οξέα και στερόλες στα μανιτάρια .....	120
2.1.3.3	Ολικά και επιμέρους φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα στα μανιτάρια .....	123
2.1.3.4	Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων μανιταριών.....	125
2.1.3.5	Γλουκάνες.....	127
2.1.3.6	Διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των κύριων ποιοτικών παραμέτρων που μελετήθηκαν στα μανιτάρια .....	127
2.1.4	Συμπεράσματα .....	130
	Κεφάλαιο 2.2 Βιομετατροπή γεωργικών παραπροϊόντων από στελέχη των μυκήτων <i>Pleurotus ostreatus</i> και <i>Cyclocybe cylindracea</i> . Αξιολόγηση της επίδρασης τους στο τελικό προϊόν και το εξαντλημένο υπόστρωμα .....	133
2.2.1	Εισαγωγή .....	134
2.2.2	Υλικά και μέθοδοι.....	134
2.2.2.1	Βιολογικό υλικό .....	134
2.2.2.2	Προετοιμασία υποστρωμάτων και διαδικασία καλλιέργειας μανιταριών .....	135
2.2.2.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	135
2.2.2.4	Προσδιορισμός της βασικής σύστασης ("proximate composition") των μανιταριών .....	135
2.2.2.5	Προσδιορισμός καλίου (K), φωσφόρου (P) και νατρίου (Na) σε μανιτάρια.....	136



2.2.2.6	Προσδιορισμός της βασικής σύστασης (“proximate composition”) των υποστρωμάτων καλλιέργειας .....	136
2.2.2.7	Προσδιορισμός pH των υποστρωμάτων καλλιέργειας.....	136
2.2.2.8	Προσδιορισμός της μυκηλιακής βιομάζας στα υποστρώματα καλλιέργειας...	137
2.2.2.9	Προσδιορισμός μετάλλων, λανθανίδων και ακτινίδων σε δείγματα υποστρωμάτων καλλιέργειας και μανιταριών με χρήση ICP-MS.....	137
2.2.2.9.1	Χημικά αντιδραστήρια και πρότυπα διαλύματα .....	137
2.2.2.9.2	Προετοιμασία δειγμάτων.....	140
2.2.2.9.3	Εκτίμηση επικινδυνότητας από την πρόσληψη μετάλλων μέσω της κατανάλωσης μανιταριών.....	141
2.2.2.10	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	141
2.2.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	142
2.2.3.1	Σύσταση των αρχικών υποστρωμάτων .....	142
2.2.3.2	Συγκέντρωση ιχνοστοιχείων και σπάνιων γαιών στα υποστρώματα ανάπτυξης .....	142
2.2.3.3	Αξιολόγηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή μανιταριών <i>P. ostreatus</i> .....	148
2.2.3.4	Αξιολόγηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή μανιταριών <i>C. cylindracea</i> .....	153
2.2.3.5	Αξιολόγηση των εξαντλημένων υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών .....	158
2.2.3.6	Βασική σύσταση μανιταριών <i>P. ostreatus</i> .....	160
2.2.3.7	Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων στα μανιτάρια <i>P. ostreatus</i> .....	163
2.2.3.8	Συγκεντρώσεις σπάνιων γαιών στα μανιτάρια <i>P. ostreatus</i> .....	165
2.2.3.9	Βασική σύσταση των μανιταριών <i>C. cylindracea</i> .....	168
2.2.3.10	Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων στα μανιτάρια <i>C. cylindracea</i> .....	171
2.2.3.11	Συγκεντρώσεις σπάνιων γαιών στα μανιτάρια <i>C. cylindracea</i> .....	173
2.2.3.12	Επίδραση των ιχνοστοιχείων στις καλλιεργητικές παραμέτρους και την σύσταση των μανιταριών <i>P. ostreatus</i> και <i>C. cylindracea</i> .....	175
2.2.3.13	Επίδραση των σπάνιων γαιών στις καλλιεργητικές παραμέτρους και την σύσταση των μανιταριών <i>P. ostreatus</i> και <i>C. cylindracea</i> .....	177
2.2.3.14	Συσχετίσεις μεταξύ συγκέντρωσης σπάνιων γαιών και βασικής σύστασης στα μανιτάρια <i>P. ostreatus</i> και <i>C. cylindracea</i> .....	179
2.2.3.15	Δείκτης βιοσυσώρευσης ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια <i>P. ostreatus</i> και <i>C. cylindracea</i> και εκτίμηση κινδύνου για ανθρώπινη κατανάλωση .....	181
2.2.3.16	Δείκτης βιοσυσώρευσης σπάνιων γαιών από μανιτάρια <i>P. ostreatus</i> και <i>C. cylindracea</i> και εκτίμηση κινδύνου για την κατανάλωση τους από τον άνθρωπο .....	186

2.2.3.17	Αξιοποίηση των σπάνιων γαιών για πρόβλεψη της προέλευσης των μανιταριών .....	189
2.2.4	Συμπεράσματα .....	190
Κεφάλαιο 2.3 Αύξηση της περιεκτικότητας μανιταριών <i>Pleurotus</i> σε βιοδραστικά συστατικά μέσω της αξιοποίησης παραπροϊόντων ελαιουργίας και οινοποιίας ως υποστρώματων καλλιέργειας.....		
2.3.1	Εισαγωγή.....	196
2.3.2	Υλικά και μέθοδοι.....	196
2.3.2.1	Βιολογικό υλικό .....	196
2.3.2.2	Πειραματικός σχεδιασμός.....	196
2.3.2.3	Προσδιορισμός σκουαλενίου στα υποστρώματα ανάπτυξης .....	197
2.3.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	198
2.3.3.1	Αξιολόγηση καλλιεργητικών παραμέτρων ειδών <i>Pleurotus</i> ανεπτυγμένων σε παραπροϊόντα ελαιουργίας και οινοποιίας.....	198
2.3.3.2	Εκτίμηση της συγκέντρωσης επιλεγμένων οργανικών συστατικών στα υποστρώματα καλλιέργειας.....	202
2.3.3.3	Εκτίμηση της συγκέντρωσης επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών στα παραγόμενα μανιτάρια.....	204
2.3.3.4	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών σε μανιτάρια <i>Pleurotus</i> καλλιεργημένα σε υποστρώματα που προέρχονται από παραπροϊόντα ελαιουργίας και οινοποιίας.....	207
2.3.3.5	Συσχετίσεις μεταξύ της σύστασης του υποστρώματος και των ιδιοτήτων των μανιταριών .....	213
2.3.4	Συμπεράσματα .....	215
Κεφάλαιο 2.4 Βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων παραπροϊόντων από τον μύκητα <i>Cyclocybe cylindracea</i> - Αξιολόγηση της επίδρασης στο τελικό προϊόν και στο εξαντλημένο υπόστρωμα.....		
2.4.1	Εισαγωγή.....	218
2.4.2	Υλικά και μέθοδοι.....	218
2.4.2.1	Βιολογικό υλικό .....	218
2.4.2.2	Πειραματικός σχεδιασμός.....	219
2.4.2.3	Θρεπτικά υλικά.....	219
2.4.2.4	Προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης.....	221
2.4.2.5	Προετοιμασία υποστρώματων και διαδικασία καλλιέργειας μανιταριών .....	221
2.4.2.6	Χημικές αναλύσεις στα μανιτάρια και τα υποστρώματα ανάπτυξης.....	222
2.4.2.7	Εκχύλιση των ενζύμων και υπολογισμός της ενζυμικής ενεργότητας.....	222
2.4.2.8	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR).....	224

2.4.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	224
2.4.3.1	Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης και βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης αποικιών σε στερεά υποστρώματα .....	224
2.4.3.2	Προσδιορισμός της ταχύτητας αποικισμού υποστρωμάτων που περιέχουν απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων από τον μύκητα <i>C. cylindracea</i> .....	226
2.4.3.3	Αλλαγές στη σύσταση του υποστρώματος κατά τη διάρκεια του αποικισμού του από τον μύκητα <i>C. cylindracea</i> .....	228
2.4.3.4	Χρήση της φασματοσκοπίας μέσου υπέρυθρου φωτός για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ των αρχικών υποστρωμάτων. ....	234
2.4.3.5	Συγκριτική αξιολόγηση των FTIR φασμάτων πριν και μετά την καλλιέργεια των μανιταριών .....	239
2.4.3.6	Παραγωγή λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής διαδικασίας του <i>C. cylindracea</i> .....	240
2.4.3.7	Προσδιορισμός καλλιεργητικών παραμέτρων επιλεγμένων στελεχών του μύκητα <i>C. cylindracea</i> ανεπτυγμένων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιουργίας και ελαιοκομίας.....	250
2.4.3.8	Υπολογισμός της βιομετατρεψιμότητας του υποστρώματος σε μυκητιακή βιομάζα .....	255
2.4.3.9	Σύσταση των μανιταριών .....	256
2.4.4	Συμπεράσματα .....	259
Κεφάλαιο 2.5 Αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου και βιομετατροπή ελαιουργικών υπολειμμάτων σε βιομάζα υψηλής διατροφικής αξίας με τη χρήση του μύκητα <i>Hericium erinaceus</i> . ....		
2.5.1	Εισαγωγή.....	262
2.5.2	Υλικά και μέθοδοι.....	262
2.5.2.1	Βιολογικό υλικό .....	262
2.5.2.2	Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ.....	262
2.5.2.3	Επιλογή των υποστρωμάτων ανάπτυξης – Προσδιορισμός του μυκηλιακού ρυθμού ανάπτυξης.....	263
2.5.2.4	Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών .....	264
2.5.2.5	Χημικές αναλύσεις μανιταριών.....	264
2.5.2.6	Στατιστική ανάλυση.....	265
2.5.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	265
2.5.3.1	Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ.....	265
2.5.3.2	Επιλογή υποστρωμάτων καλλιέργειας – Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης .....	270
2.5.3.3	Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών .....	271

2.5.3.4	Αξιολόγηση ποιοτικών παραμέτρων σε μανιτάρια <i>H. erinaceus</i> που παρήχθησαν σε παραπροϊόντα ελαιοκομίας .....	273
2.5.4	Συμπεράσματα .....	275
Κεφάλαιο 2.6 Βιοαποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και καλλιέργεια μανιταριών γένους <i>Ganoderma</i> σε ελαιουργικά και ελαιοκομικά παραπροϊόντα – Αξιολόγηση διαδικασίας και τελικού προϊόντος.....		
2.6.1	Εισαγωγή.....	278
2.6.2	Υλικά και μέθοδοι.....	278
2.6.2.1	Βιολογικό υλικό .....	278
2.6.2.2	Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ.....	278
2.6.2.3	Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου.....	279
2.6.2.4	Επιλογή των υποστρωμάτων ανάπτυξης – Προσδιορισμός του μυκηλιακού ρυθμού ανάπτυξης.....	279
2.6.2.5	Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών .....	280
2.6.2.6	Χημικές αναλύσεις μανιταριών.....	280
2.6.2.7	Προσδιορισμός της πρεβιοτικής δράσης .....	281
2.6.2.8	Στατιστική ανάλυση.....	282
2.6.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	282
2.6.3.1	Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ.....	282
2.6.3.2	Επιλογή υποστρωμάτων καλλιέργειας – Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης .....	285
2.6.3.3	Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών .....	287
2.6.3.4	Αξιολόγηση της σύστασης των μανιταριών .....	290
2.6.3.5	Προσδιορισμός πρεβιοτικών ιδιοτήτων μυκητιακής βιομάζας.....	292
2.6.3.5.1	Ανάπτυξη του <i>Lactobacillus acidophilus</i> σε θρεπτικό υλικό με προσθήκη λυοφιλιωμένου μυκηλίου .....	293
2.6.3.5.2	Αξιολόγηση πρεβιοτικών ιδιοτήτων καρποφοριών εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών .....	294
2.6.4	Συμπεράσματα .....	301
Κεφάλαιο 2.7 Αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου με τη χρήση βασιδιομυκήτων .....		
2.7.1	Εισαγωγή.....	304
2.7.2	Υλικά και μέθοδοι.....	304
2.7.2.1	Βιολογικό υλικό .....	304
2.7.2.2	Εκτίμηση της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης 60 στελεχών ξυλοσηπτικών μυκήτων και του ρυθμού ανάπτυξης σε ΥΑΕ.....	306

2.7.2.3	Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ με επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων.....	306
2.7.2.4	Επίδραση του βαθμού αραίωσης, της θερμικής προεπεξεργασίας του υποστρώματος και της προσθήκης ανόργανου αζώτου, χαλκού και μαγγανίου στη διαδικασία αποτοξικοποίησης ΥΑΕ με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων .....	307
2.7.2.5	Χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας του μύκητα <i>Abortiporus biennis</i> στην επεξεργασία ακατέργαστων ΥΑΕ .....	309
2.7.2.6	Στατιστική ανάλυση.....	310
2.7.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	310
2.7.3.1	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης των 60 ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων.....	310
2.7.3.2	Αξιολόγηση της ανάπτυξης 60 στελεχών ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων σε ΥΑΕ .....	312
2.7.3.3	Αξιολόγηση της μείωσης του ρυπαντικού φορτίου ΥΑΕ από επιλεγμένα στελέχη ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων.....	314
2.7.3.4	Βελτιστοποίηση διαδικασίας διαχείρισης ΥΑΕ με επιλεγμένα στελέχη ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων.....	323
2.7.3.5	Χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας του μύκητα <i>Abortiporus biennis</i> στην επεξεργασία ακατέργαστων ΥΑΕ .....	351
Κεφάλαιο 2.8 Διαχείριση παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων.....		355
2.8.1	Εισαγωγή.....	356
2.8.2	Υλικά και Μέθοδοι .....	356
2.8.2.1	Βιολογικό υλικό.....	356
2.8.2.2	Αξιολόγηση της ικανότητας ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας.....	356
2.8.2.3	Διαχείριση μη αποστειρωμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων .....	357
2.8.2.4	Επίδραση της προσθήκης βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στη βλάστηση σπόρων μαρουλιού και τομάτας.....	357
2.8.2.5	Διερεύνηση της καταλληλότητας εφαρμογής βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στο έδαφος για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού.....	358
2.8.3	Αποτελέσματα και συζήτηση .....	358
2.8.3.1	Αξιολόγηση της ικανότητας ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας.....	359
2.8.3.2	Διαχείριση μη αποστειρωμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων.....	360

2.8.3.3	Επίδραση της προσθήκης βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στη βλάστηση σπόρων μαρουλιού και τομάτας.....	362
2.8.3.4	Διερεύνηση της καταλληλότητας εφαρμογής βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στο έδαφος για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού .....	366
Κεφάλαιο 3	.....	371
ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	.....	371
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	.....	375
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΠΡΟΚΥΨΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	.....	405
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	.....	411

## Περίληψη

Η αξιοποίηση αγροβιομηχανικών αποβλήτων και υπολειμμάτων αποτελεί σημαντική πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα, ιδιαίτερα αν ληφθούν υπόψιν η αφθονία και η εποχικότητα της παραγωγής καθώς και οι φυσικοχημικές ιδιότητες (και ως εκ τούτου η δυσκολία στην επεξεργασία) τους. Η χρήση μακρομυκήτων, οι οποίοι αναπτύσσονται στη φύση σαπροτροφικά εκκρίνοντας συγκεκριμένα οξειδωτικά ένζυμα για την αποδόμηση της λιγνίνης, των ημικυτταρινών και της κυτταρίνης, μπορεί να προσφέρει λύσεις για την ολοκληρωμένη διαχείριση τέτοιων υλικών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί αποδεικνύονται ιδιαίτερα αποδοτικοί στη βιομετατροπή διαφόρων γεωργικών, αγροβιομηχανικών και δασικών παραπροϊόντων σε εδώδιμη βιομάζα. Η συγκεκριμένη διαδικασία συνιστά μια ελεγχόμενη ζύμωση στερεάς φάσης που οδηγεί στην παραγωγή εδώδιμων ή/και φαρμακευτικών μανιταριών, παρέχοντας κατ' αυτό τον τρόπο, τρόφιμα υψηλής οργανοληπτικής και διαιτητικής αξίας. Επιπροσθέτως, τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχουν έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, ανοσορυθμιστικές και άλλες ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία ιδιότητες.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκαν εργασίες οι οποίες συνδέονται ευθέως με τους στόχους που προαναφέρθηκαν και μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο επιμέρους ενότητες. Η πρώτη, αναφέρεται στη βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων για την παραγωγή εδώδιμων – φαρμακευτικών μανιταριών. Αρχικά μελετήθηκε η ενδοειδική ποικιλότητα που εμφανίζει το *Pleurotus ostreatus*, δηλαδή ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα είδη μανιταριών, όσον αφορά στις καλλιεργητικές παραμέτρους και επιλεγμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των μανιταριών που παράγονται υπό όμοιες συνθήκες (υπόστρωμα, περιβαλλοντικές παράμετροι ανάπτυξης). Ανάμεσα στα 16 στελέχη που εξετάστηκαν διαπιστώθηκε μεγάλο εύρος στις τιμές παραμέτρων που σχετίζονται με την αποδοτικότητα της καλλιέργειας αλλά και την περιεκτικότητα των βιοδραστικών συστατικών. Τα εν λόγω αποτελέσματα συνέβαλαν και στην επιλογή συγκεκριμένων στελεχών *P. ostreatus* προς αξιολόγηση σε επόμενα πειράματα. Ακολούθως, διερευνήθηκε η παραγωγή μανιταριών σε μεγάλο εύρος διαφορετικών λιγνοκυτταρινούχων παραπροϊόντων χρησιμοποιώντας δύο είδη βασιδιομυκήτων (*P. ostreatus* και *Cyclocybe cylindracea*) όπως και η επίδραση που τα συγκεκριμένα υποστρώματα παρουσιάζουν στη σύσταση των καρποφοριών. Σχετικά με τη βιολογική αποδοτικότητα της καλλιεργητικής διαδικασίας, ξεχώρισαν τα υποστρώματα που

περιείχαν παραπροϊόντα οινοποιίας και ελαιοκομίας και για τα δύο είδη βασιδιομυκήτων, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη βασική σύσταση των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υλικά. Συν τοις άλλοις, η χρήση μεγάλου εύρους υποστρωμάτων έδωσε τη δυνατότητα για τη μελέτη της επίδρασης των επιμέρους συστατικών του υποστρώματος τόσο στις καλλιεργητικές παραμέτρους όσο και στη σύσταση των μανιταριών.

Στη συνέχεια, η παρούσα μελέτη εστίασε στην αξιολόγηση υπολειμμάτων οινοποιίας και αποβλήτων-παραπροϊόντων ελαιουργίας και ελαιοκομίας ως προς την καταλληλότητα τους να υποστηρίξουν την καλλιέργεια διαφορετικών ειδών βασιδιομυκήτων (οκτώ είδη από τα γένη *Pleurotus*, *Cyclocybe*, *Hericium* και *Ganoderma*). Σε όλες τις περιπτώσεις, αποδείχθηκε ότι τα παραπάνω υπολείμματα μπορούν (σε κατάλληλες αναλογίες με υλικά που χρησιμοποιούνται στη συμβατική καλλιέργεια) όχι μόνο να βελτιώσουν την απόδοση σε παραγόμενα μανιτάρια, αλλά να αυξήσουν σημαντικά τη συγκέντρωση συγκεκριμένων βιοδραστικών συστατικών, σημαντικών για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, η μείωση των δύσκολα αποδομήσιμων συστατικών στα εξαντλημένα υποστρώματα της καλλιέργειας, επιτρέπει την εύκολη διαχείριση τους χωρίς να απαιτείται επιπλέον επεξεργασία τους.

Η δεύτερη ενότητα περιλαμβάνει τη διαχείριση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης. Αρχικά, εξετάστηκε μεγάλο πλήθος διαφορετικών ειδών βασιδιομυκήτων όσον αφορά στην αποτοξικοποίηση ΥΑΕ και στη συνέχεια τα αποδοτικότερα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των ενζύμων που εκκρίνουν στη διαδικασία βιοαποδόμησης. Εκτός από την υψηλή μείωση των ρυπαντικών παραμέτρων των ΥΑΕ μετά την ανάπτυξη των αποδοτικότερων μυκητιακών στελεχών, πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα σημειώθηκαν και με την χρήση εκχυλισμάτων ενζύμων που προήλθαν από την καλλιέργεια του μύκητα *Abortiporus biennis* υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές αξιοποίησης βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου ελαιοτριβείου στην παραγωγή οργανικών εδαφοβελτιωτικών και αξιολογήθηκε η εφαρμογή του σε καλλιέργεια κηπευτικών, αποδεικνύοντας ότι το τελικό προϊόν θα μπορούσε να εφαρμοστεί τόσο ως υπόστρωμα για τη βλάστηση σπόρων ντομάτας και μαρουλιού όσο και ανάπτυξης φυτών μαρουλιού, μειώνοντας τη χρήση χημικών λιπασμάτων και συμβάλλοντας στην περαιτέρω αξιοποίηση των ελαιουργικών παραπροϊόντων.

**Επιστημονική περιοχή:** Μικροβιολογία / Μυκητολογία



**Λέξεις κλειδιά:** Καλλιέργεια μανιταριών, μύκητες λευκής σήψης, γεωργικά υπολείμματα, διατροφική αξία μανιταριών, απόβλητα ελαιοτριβείων, *Pleurotus ostreatus*, *Cyclocybe cylindracea*, *Abortiporus biennis*,

## Abstract

The agricultural industry produces every year a huge amount of by-products generated from the processing of primary products and raw materials. The effective management of the resulting residues constitutes a great environmental challenge for both the industry and scientific community.

The use of saprotrophic fungi, which are able to decompose lignin, cellulose and hemicellulose through the production of oxidative enzymes, offers a potent solution in the management of lignocellulosic waste. Furthermore, the presence of carbon sources and nutrients in these materials provide suitable conditions for the development of microorganisms, and therefore permit the bio-transformation of agro-industrial and forest residues into edible biomass under solid-state fermentation (SSF) conditions. In particular, the SSF process is suitable for the production of edible or/and medicinal mushrooms of high organoleptic and nutritional characteristics. Additionally, mushrooms contain bioactive ingredients that have been associated with anticancer, antidiabetic, anti-inflammatory, immunomodulatory and other health-beneficial properties.

In the frame of this Thesis, the cultivation process of several edible and medicinal mushrooms was evaluated, in terms of growth performance and yield, through the biotransformation of lignocellulosic residues. The intraspecific variability of *Pleurotus ostreatus*, one of the most-widely cultivated mushrooms, was initially assessed in respect to cultivation parameters and mushroom quality aspects by using 16 different strains under identical conditions (substrate, environmental conditions). *P. ostreatus* strains demonstrated a significant intra-variability/heterogeneity both in cultivation parameters (yield, biological efficiency, productivity etc.) and in bioactive compounds content (e.g. sterols, glucans, antioxidants etc.) by showing a strong dependence on intrinsic/genetic factors. Results also contributed at selecting *P. ostreatus* strains for use in subsequent experiments. Production of *P. ostreatus* and *Cyclocybe cylindracea* mushrooms on nine different lignocellulosic by-products was then investigated while the effect of substrates on mushrooms composition was also assessed. The highest biological efficiency was noted with substrates containing olive oil mill or winery by-products for both species examined. Furthermore, significant differences were observed in crude composition of mushrooms produced in different media.

Consequently, this study focused on the evaluation of winery residues (grape marc) and olive oil by-products as substrates for the cultivation of eight species of the genera

*Pleurotus*, *Cyclocybe*, *Hericium* and *Ganoderma*. Results demonstrated that the use of these substrates (in mixtures with materials ordinarily used in conventional cultivation, e.g. wheat straw) not only improves mushroom productivity, but it also highly increase mushrooms content in bioactive components. Furthermore, the reduction of fibrous components in spent cultivation substrates facilitates their subsequent management without requiring additional processing.

At a further stage, a large number of basidiomycetes (white-rot fungi) were comparatively examined as regards the detoxification of olive mill wastewater (OMW), and the most efficient were selected to study OMW's degradation and the role of ligninolytic enzymes produced in the respective process. In addition to the high reduction of OMW phenolics content, colour and toxicity, encouraging results were also obtained when crude enzyme extracts were used from the cultivation of *Abortiporus biennis* under optimized conditions.

Finally, preliminary studies were performed aiming at examining the effect of biotreated two-phase olive mill waste on vegetable crops; results demonstrated that the final product could be used both as substrate for the germination of tomato and lettuce seeds, and the growth of lettuce plants, contributing thus to the reduction in applications of chemical fertilizers and to the valorization of olive oil by-products.

Scientific area: Microbiology / Mycology

**Key words:** Mushroom cultivation, white rot fungi, agricultural residues, nutritional value of mushrooms, olive mill wastes, *Pleurotus ostreatus*, *Cyclocybe cylindracea*, *Abortiporus biennis*.



---

# Κεφάλαιο 1

---

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Φυτική βιομάζα – Λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα

### 1.1.1 Γενικά

Τεράστιες ποσότητες δασικών και αγροβιομηχανικών υπολειμμάτων παράγονται κάθε χρόνο στη φύση. Υπολογίζεται ότι η χερσαία ετήσια παραγωγή βιομάζας ξεπερνά τα  $200 \times 10^{12}$  kg (Foust et al., 2008). Η λιγνοκυτταρίνη αποτελεί το κύριο συστατικό της βιομάζας, καταλαμβάνοντας περίπου το ήμισυ της φυτικής ύλης που παράγεται μέσω της φωτοσύνθεσης και αντιπροσωπεύει την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή άνθρακα στο έδαφος. Αποτελείται από τρία βασικά πολυμερή, την ημικυτταρίνη, την κυτταρίνη και τη λιγνίνη, που αλληλεπιδρούν έντονα και είναι χημικά συνδεδεμένες μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς (Pérez et al., 2002). Μόνο ένα μικρό ποσοστό των εν λόγω παραπροϊόντων αξιοποιείται, ενώ το μεγαλύτερο χαρακτηρίζεται ως απόβλητο.

Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα και οδηγεί σε απώλεια σημαντικών πόρων που θα μπορούσαν να βιομετατραπούν σε διάφορα προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Howard et al., 2003). Η λιγνίνη, μπορεί να αφαιρεθεί μέσω χημικής ή φυσικής προεπεξεργασίας, που στη συνέχεια επιτρέπει την αποτελεσματική βιομετατροπή της. Η προεπεξεργασία, δύναται επίσης να επιτευχθεί με τη χρήση μικροοργανισμών. Η τελευταία πλεονεκτεί των μη βιολογικών διεργασιών διότι παράγονται ταυτόχρονα χρήσιμα-αξιοποιήσιμα παραπροϊόντα και ελάχιστα απόβλητα (Hatakka and Hammel, 2010). Τα επόμενα κεφάλαια, εστιάζονται στα χαρακτηριστικά των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων με ιδιαίτερη έμφαση στα υπολείμματα της ελαιουργίας και της οινοποιίας και συνοψίζουν τις δυνατότητες βιομετατροπής τους για την αποτοξικοποίηση ή/και την παραγωγή εδώδιμης ή φαρμακευτικής βιομάζας με τη βοήθεια μυκήτων.

### 1.1.2 Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Η συνεχής αύξηση της γεωργικής, δασοπονικής και αγρο-βιομηχανικής δραστηριότητας έχει οδηγήσει στην παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων φυτικών υπολειμμάτων (π.χ. ξύλου λεύκας, πριονιδιών από επεξεργασία κωνοφόρων δένδρων, σπάδικες καλαμποκιού, άχυρο σιτηρών), παραπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων και αστικών στερεών αποβλήτων (ανακυκλώσιμο χαρτί). Στον Πίνακα 1.1.1. συνοψίζονται τα κύρια λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα και η ετήσια παραγόμενη ποσότητα αυτών.

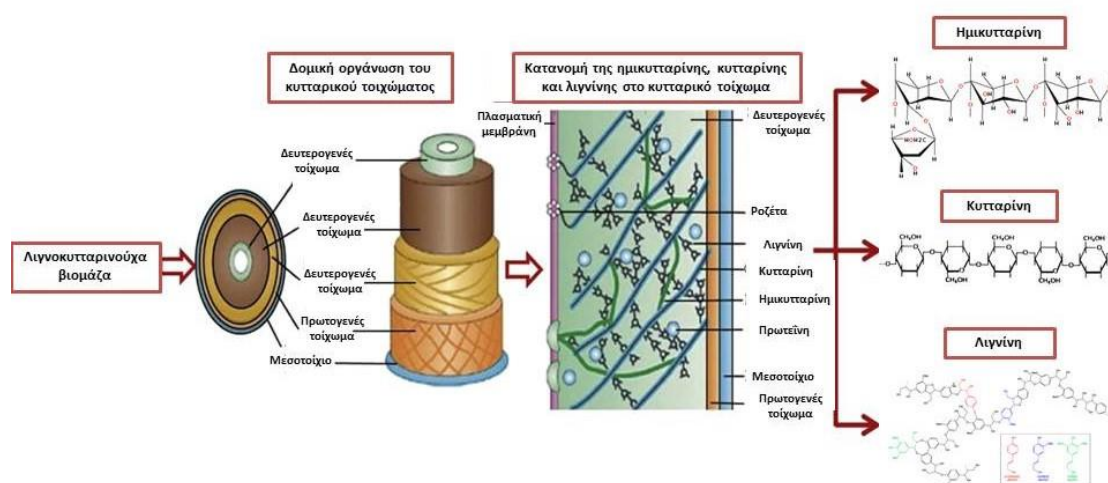
**Πίνακας 1.1.1. Παγκόσμια παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.**

Λιγνοκυτταρινούχο υπόλειμμα	10 <sup>6</sup> τόνοι ετησίως	Πηγή
Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου	317 – 380	Portal Agrario (2005)
Άχυρο καλαμποκιού	159 – 191	Portal Agrario (2005)
Κέλυφος ρυζιού	157 – 188	Portal Agrario (2005)
Άχυρο σίτου	154 – 185	FAO-docrep (2006)
Άχυρο σόγιας	54 – 65	FRA (2006)
Άχυρο γιούκας	40 – 48	FAO (2005)
Άχυρο κριθαριού	35 – 42	SAGPyA-FAO (2004)
Ίνες βαμβακιού	17 – 20	SICA (2005)
Άχυρο σόργου	15 – 18	SAGPyA-FAO (2004)
Υπολείμματα μπανάνας	13 – 15	Elnuevodiario (2007)
Κέλυφος φιστικιού	9,2 – 11,1	Lorenzati, Ruetsch y Cia, S. A. (2007)
Στέμφυλα οινοποιίας	12,6	FAOSTAT (2013)
Άχυρο ηλίανθου	7,5 – 9,0	Horizontea (2008)
Άχυρο φασολιού	4,9 – 5,9	COFEMERMIR (2006)
Άχυρο σίκαλης	4,3 – 5,2	BCR (2008)
Υπολείμματα κωνοφόρων	3,8 – 4,6	CEDOPEX-FAOSTAT (2004)
Άχυρο καφέ	1,6 – 1,9	FIMARC (2005)
Κελύφη αμυγδάλου	0,4 – 0,49	Agroalternativo-Argentina (2005)
Κελύφη φουντουκιού	0,2 – 0,24	FIA (2005)
Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων	10 – 30 *	Galanakis (2016)

Εκφράζονται σε m<sup>3</sup>

### 1.1.3 Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Τα κύρια συστατικά των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων αποτελούν κατά φθίνουσα σειρά η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη (Εικόνα 1.1.1). Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη είναι μακρομόρια αποτελούμενα από διαφορετικά σάκχαρα, ενώ η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό πολυμερές που συντίθεται από πρόδρομες φαινυλοπροπανοειδείς ενώ-



**Εικόνα 1.1.1. Διαγραμματική απεικόνιση του σκελετού της λιγνοκυτταρίνης (ΠΗΓΗ: Anwar et al., 2014).**

σεις. Η σύσταση και η αναλογία των παραπάνω μακρομορίων, διαφέρει σημαντικά μεταξύ των φυτικών ειδών αλλά και ανάμεσα στα διάφορα τμήματα αυτών.

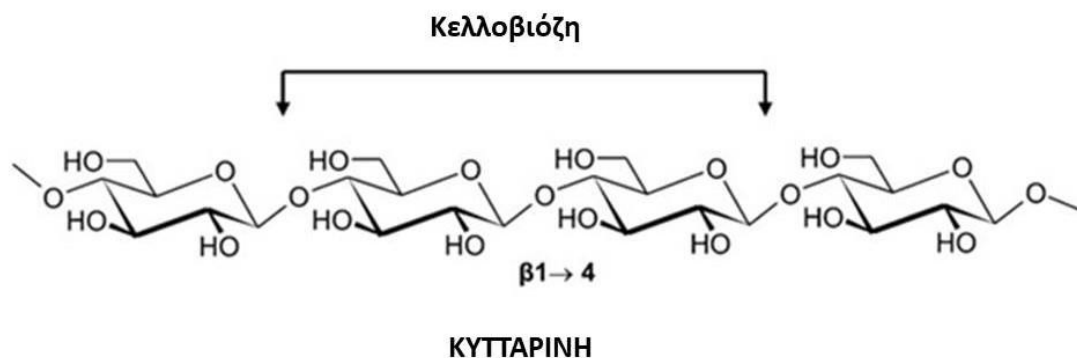
### 1.1.3.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή άνθρακα στη φύση και είναι ευρέως διαδεδομένη σε ανώτερα φυτά, βακτήρια, θαλάσσια άλγη αλλά και σε άλλου είδους οργανισμούς. Η συνολική παραγωγή της κυτταρίνης φτάνει σε αρκετά δισεκατομμύρια τόνους ετησίως, αποκαλύπτοντας την τεράστια οικονομική της αξία. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Anselme Payen (1839), από ξυλεία που υπέστη επεξεργασία με νιτρικό οξύ και διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Πρόκειται για ένα γραμμικό πολυμερές, αδιάλυτο στο νερό, όπως και σε αραιά όξινα ή αλκαλικά διαλύματα σε κανονικές θερμοκρασίες. Αν και η δομή και η σύσταση των φυτικών κυττάρων ποικίλει σημαντικά, η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη κυμαίνεται συνήθως από 30-50% (ξ.β.), ενώ ιδιαίτερα στο βαμβάκι αγγίζει το 100%. Η μελέτη της υπερμοριακής δομής της φυσικής κυτταρίνης απέδειξε την ύπαρξη τόσο κρυσταλλικής μορφής όσο και άμορφης (μη κρυσταλλικής). Το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρίνης απαντάται σε κρυσταλλική μορφή και μια μικρή μόνο ποσότητα μη οργανωμένων αλυσίδων της κυτταρίνης απαρτίζουν την άμορφη κυτταρίνη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κυτταρίνη καλύπτεται από ημικυτταρίνη και λιγνίνη, το ποσοστό των οποίων κυμαίνεται από 20-35% και 5-30% αντίστοιχα. Η κυτταρίνη αποτελεί σημαντική πρώτη ύλη για την παραγωγή χαρτοπολτού, την υφαντική και την βιομηχανία παραγωγής χημικών ινωδών.

### 1.1.3.2 Χημική δομή της κυτταρίνης

Όσον αφορά τη χημική της δομή, η κυτταρίνη αποτελεί ένα γραμμικό πολυμερές, αποτελούμενο από υπομονάδες D-γλυκόζης συνδεδεμένες με β-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Περιέχει κυρίως άνθρακα (44,44%), υδρογόνο (6,17%) και οξυγόνο (49,39%). Ο χημικός της τύπος είναι  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , (όπου n ο βαθμός πολυμερισμού, [B.Π], ο οποίος αντιπροσωπεύει τις ομάδες γλυκόζης που κυμαίνονται από μερικές εκατοντάδες μέχρι και δεκάδες χιλιάδες). Στις αρχές του προηγούμενου αιώνα, αποδείχθηκε ότι η κυτταρίνη αποτελείται από καθαρές αφυδατωμένες ομάδες D-γλυκόζης, ενώ οι συνδεδεμένες με β-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς μονάδες σχηματίζουν το διμερές κελλοβιόζη (Εικόνα 1.1.2.).





Εικόνα 1.1.2. Απεικόνιση της μοριακής δομής της κυτταρινικής αλυσίδας (ΠΗΓΗ: Zugenmaier, 2001)

Διαλύματα καυστικού νατρίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικές θερμοκρασίες μπορούν να διαλύσουν την κυτταρίνη ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού. Με βάση τη διαφορετική διαλυτότητα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, η κυτταρίνη μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις τύπους: i) α-κυτταρίνη, η οποία διαλύεται σε 16,5% NaOH στους 20 °C, ii) β-κυτταρίνη η οποία εκχυλίζεται μετά την εξουδετέρωση του όξινου και του εναπομείναντος αλκαλικού διαλύματος και iii) γ-κυτταρίνη η οποία περιλαμβάνει το διαλυτό υπόλοιπο στο εξουδετερωμένο διάλυμα. Για τον υπολογισμό του βαθμού πολυμερισμού των τριών ανωτέρω κλασμάτων χρησιμοποιείται συνήθως μια μέθοδος μέτρησης του ιξώδους. Με βάση αυτή, έχει υπολογιστεί ότι ο Β.Π. της α-κυτταρίνης, β-κυτταρίνης και γ-κυτταρίνης είναι περισσότερο από 200, μεταξύ 10 και 200 και μικρότερος του 10 αντίστοιχα. Στην βιομηχανία η α-κυτταρίνη χρησιμοποιείται συνήθως για τη μέτρηση της καθαρότητας της κυτταρίνης. Παραδοσιακά, οι β- και γ-κυτταρίνες καλούνται “βιομηχανική ημικυτταρίνη”, ενώ “ολοκυτταρίνη” καλείται το σύνολο των υδατανθράκων των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, το οποίο περιλαμβάνει τόσο την κυτταρίνη όσο και την ημικυτταρίνη (Yang, 2008).

Η φυσική δομή της κυτταρίνης αναφέρεται στη χωρική διάταξη των δομικών μονάδων, συμπεριλαμβανομένης της δομής της αλυσίδας και του βαθμού συσσωμάτωσης του πολυμερούς. Η δομή της αλυσίδας, γνωστή ως πρωταρχική δομή, καθορίζει την γεωμετρική διάταξη των ατόμων ή των ομάδων στη μοριακή αλυσίδα. Η δομή μικρού εύρους (short-chain structure) είναι η δομή πρώτου επιπέδου και αναφέρεται στη χημική ή τη στερεοχημική δομή ενός ή περισσότερων δομικών μονάδων σε ένα μόριο του πολυμερούς. Η απομακρυσμένη δομή (remote structure) είναι η δομή δευτέρου επιπέδου και αναφέρεται στο μέγεθος ενός μορίου πολυμερούς, ενώ η δομή συσσωμάτωσης (aggregation structure) αναφέρεται επίσης στη δευτερογενή δομή και αφορά την εσωτερική δομή όλου του πολυμερούς συμπεριλαμβανομένης της κρυσταλλικής και της μη κρυσταλλικής δομής, τον προσανατολισμό και τη δομή των υγρών κρυστάλλων. Τέλος, ο όρος “δομή τρίτου επιπέδου”

χρησιμοποιείται για να περιγράψει πως τα μόρια σε ένα πολυμερές συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακρές αλυσίδες. Η δομή της αλυσίδας είναι αυτή που αντανακλά τα κύρια χαρακτηριστικά του πολυμερούς, όπως το σημείο τήξης, την πυκνότητα, την διαλυτότητα και το ιξώδες (Zhan, 2005).

### 1.1.3.3 Χημικές ιδιότητες της κυτταρίνης

Κάθε γλυκοζυλικός δακτύλιος της κυτταρίνης διαθέτει τρία ενεργά υδροξύλια, ένα κύριο και δύο δευτερεύοντα. Έτσι η κυτταρίνη μπορεί να συμμετέχει σε μια σειρά χημικών αντιδράσεων που σχετίζονται με τα υδροξύλια. Ωστόσο, οι παραπάνω ομάδες υδροξυλίων μπορούν επίσης να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων, οι οποίοι επηρεάζουν τη μορφολογία και τον βαθμό αντίδρασης των αλυσίδων της κυτταρίνης και ιδιαίτερα ο διαμοριακός δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του υδροξυλίου του C3 και του οξυγόνου ενός γειτονικού μοριακού δακτυλίου. Οι δεσμοί υδρογόνου μπορούν όχι μόνο να ενισχύσουν την γραμμική ακεραιότητα και την ακαμψία του μορίου, αλλά και να μειώσουν την απόσταση των μοριακών αλυσίδων σχηματίζοντας μια εξαιρετικά διατεταγμένη κρυσταλλική περιοχή. Η προσβασιμότητα της κυτταρίνης αναφέρεται στη δυσκολία των αντιδραστηρίων να φτάσουν στα υδροξύλια της κυτταρίνης. Σε ετερογενείς αντιδράσεις, η προσβασιμότητα επηρεάζεται κυρίως από την αναλογία των κρυσταλλικών περιοχών στις άμορφες περιοχές. Η δυνατότητα αντίδρασης της κυτταρίνης, αναφέρεται στην ικανότητα να αντιδράσει το πρωτοταγές και δευτεροταγές υδροξύλιο στο δακτύλιο της κυτταρίνης. Γενικά, λόγω της μικρότερης χωρικής παρεμπόδισης, η αντιδραστικότητα του πρωτοταγούς υδροξυλίου είναι υψηλότερη συγκριτικά με τις ομάδες των δευτεροταγών υδροξυλίων. Για παράδειγμα, εστεροποίηση του χλωριούχου τολουολιοσουλφονυλίου εμφανίζεται κυρίως στο πρωτοταγές υδροξύλιο. Η αναστρέψιμη αντίδραση συμβαίνει κυρίως στο υδροξύλιο του C6, ενώ μια μη αναστρέψιμη αντίδραση λαμβάνει χώρα πάντα στην υδροξυλομάδα του C2. Έτσι στην εστεροποίηση της κυτταρίνης, ο βαθμός αντίδρασης του υδροξυλίου στο C6 είναι χαμηλότερος, ενώ στην αιθεροποίηση το C2 εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό (Chen, 2014).

Η αποδόμηση της κυτταρίνης αποτελεί μια σημαντική αντίδραση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα παραπροϊόντα. Η όξινη, η μικροβιακή αλλά και η αλκαλική αποδόμηση, αφορούν κυρίως τη διάσπαση των γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ δύο γειτονικών μορίων γλυκόζης. Η αλκαλική αντίδραση αλλά και η αντίδραση οξειδαναγωγής, συνήθως δρουν στην μείωση των ακραίων τμημάτων της κυτταρίνης, ενώ η οξειδωτική αντίδραση εμφανίζεται

κυρίως στην αποσύνθεση των C2, C3 και C6 υδροξυλίων του γλυκοζυλικού δακτυλίου. Οι μοριακές αλυσίδες της κυτταρίνης σχηματίζουν καρβονύλια στον C2 όταν οξειδωθούν σε κάποιο βαθμό, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί αλκαλική διαδικασία και αποδομούνται μέσω της αντίδρασης απομάκρυνσης του β-αλκαλοξέος. Μετά την αποσύνδεση του γλυκοσιδικού δεσμού, το προϊόν που σχηματίζεται αποδομείται σε μια σειρά οργανικών οξέων (Zhan, 2005).

Οι αντιδράσεις εστεροποίησης και αιθεροποίησης της κυτταρίνης δρουν σε τρία αλκοολικά υδροξύλια του μονομερούς μορίου της κυτταρίνης. Μπορούν να επιδράσουν σημαντικά, αλλάζοντας τις ιδιότητες του μακρομορίου και παράγοντας πολλά χρήσιμα προϊόντα όπως ο σουλφονικός εστέρας, η οξική κυτταρίνη, η νιτρική κυτταρίνη και ο κυτταρινικός αιθέρας. Μερικά από τα παράγωγα της κυτταρίνης με χαμηλό βαθμό υποκατάστασης εμφανίζουν μεγαλύτερη απορροφητικότητα νερού, όπως το μεθύλιο, το αιθύλιο, το υδροξυαιθύλιο και ο υδροξυμεθυλεστέρας της κυτταρίνης. Η ύπαρξη των παραπάνω ομάδων οδηγεί στη συσσωμάτωση της κυτταρινικής δομής και τη μειωμένη δυνατότητα δέσμευσης μακρομορίων. Επιπλέον αυξάνουν την απορροφητικότητα του νερού, το βαθμό υδρόλυσης και την αντίσταση στο ρυτίδωμα. Η εν λόγω βελτίωση της ανθεκτικότητας στο ρυτίδωμα, μπορεί να αξιοποιηθεί για την ενίσχυση της ακαμψίας και την αντοχή στην υγρασία προϊόντων χάρτου όπως το χαρτόνι (Chen, 2014).

#### 1.1.3.4 Φυσικές ιδιότητες της κυτταρίνης

Τα ελεύθερα υδροξύλια κυτταρίνης εμφανίζουν ισχυρή έλξη για πολλούς διαλύτες και διαλύματα, αλλά το προσροφημένο νερό υπάρχει μόνο στην άμορφη και όχι στην κρυσταλλική περιοχή. Κατά τη διαδικασία προσρόφησης νερού, οι δεσμοί υδρογόνου της άμορφης περιοχής της ξηρής κυτταρίνης μπορούν να σπάσουν. Οι δεσμοί υδρογόνου εντός των μορίων της κυτταρίνης αντικαθίστανται από τους αντίστοιχους δεσμούς μεταξύ των μορίων, ενώ τα μόρια του νερού σχηματίζουν νέους δεσμούς υδρογόνου. Αντίθετα, η διαδικασία της εκρόφησης νερού υστερεί σημαντικά, διότι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των μορίων κυτταρίνης και νερού δεν δύναται να σπάσουν πλήρως και αντιστρεπτά. Κάποια ποσότητα ύδατος που απορροφάται από την κυτταρίνη, εισέρχεται στην άμορφη περιοχή και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα να αποκαλείται “δεσμευμένο νερό”. Τα μόρια του δεσμευμένου νερού που προσελκύνονται από το μόριο του υδροξυλίου της κυτταρίνης, είναι διατεταγμένα σε μια ορισμένη κατεύθυνση και έχουν υψηλή πυκνότητα, οδηγώντας στη διόγκωση της κυτταρίνης και δημιουργώντας ένα θερμικό αποτέλεσμα. Όταν

η κυτταρίνη απορροφά νερό που φθάνει έως το σημείο κορεσμού των ινών, τα μόρια του νερού συνεχίζουν να εισέρχονται εντός των πόρων της κυτταρίνης σχηματίζοντας ένα βασικό στρώμα τριχοειδούς νερού το οποίο ονομάζεται ελεύθερο νερό (Zhan, 2005).

Όταν τα στερεά απορροφούν νερό, η ομοιογένεια τους δεν αλλάζει, αλλά καθίστανται πιο μαλακά λόγω της μείωσης της συνεκτικής εσωτερικής δύναμης, ενώ παράλληλα αυξάνεται και ο όγκος τους. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως “διογκωτικότητα”. Η διογκωτικότητα της κυτταρίνης διαφοροποιείται σε διογκωτικότητα εντός της κρυσταλλικής περιοχής και στη διογκωτικότητα μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών. Η πρώτη, αναφέρεται στο γεγονός ότι ο παράγοντας διόγκωση, μπορεί να επηρεάσει μόνο την επιφάνεια της κρυσταλλικής και άμορφης περιοχής, ενώ η δεύτερη αναφέρεται στη διεύρυνση του διογκωτικού παράγοντα που προκαλεί διόγκωση των κρυσταλλικών περιοχών και στη συνέχεια την παραγωγή νέου κρυσταλλικού πλέγματος με διαφορετική δομή. Η απεριόριστη όμως διόγκωση μπορεί να οδηγήσει στη διάλυση του μακρομορίου. Οι ομάδες υδροξυλίου της κυτταρίνης εμφανίζουν πολικότητα, με αποτέλεσμα η αύξηση της πολικότητας του υγρού διογκωτικού παράγοντα να σχετίζεται θετικά με τον βαθμό διόγκωσης. Τα μεταλλικά ιόντα των βασικών διαλυμάτων βρίσκονται συνήθως υπό μορφή υδατικών ιόντων, κάτι που καθιστά ευνοϊκότερη την είσοδο τους στην περιοχή κρυσταλλοποίησης. Συνήθως, συγκέντρωση 15-20% NaOH, δύναται να προκαλέσει διόγκωση εντός των κρυσταλλικών περιοχών. Αν η συγκέντρωση της βάσης αυξηθεί, η ακτίνα των υδατικών ιόντων μειώνεται λόγω της υψηλής πυκνότητας, με αποτέλεσμα την μείωση της διόγκωσης. Η κυτταρίνη μπορεί να κορεστεί σε ένα συμπυκνωμένο διάλυμα NaOH για την παραγωγή αλκαλικής κυτταρίνης. Η αλκαλική κυτταρίνη μπορεί να έχει την κρυσταλλική μορφή της ένυδρης κυτταρίνης, η οποία είναι πιο σταθερή από την φυσική κυτταρίνη και να διαθέτει μεγαλύτερη απορροφητικότητα και ικανότητα αντίδρασης με διάφορα αντιδραστήρια. Επιπλέον, αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν για την παραγωγή ινών βισκόζης και αιθέρα κυτταρίνης (Chen, 2014).

Χαρακτηριστικό των πολυμερών ενώσεων είναι το μεγάλο μοριακό βάρος και η ισχυρή δύναμη συνοχής. Χαρακτηρίζονται από δυσκολία στην κίνηση και χαμηλή διάχυση, κάτι που εμποδίζει την εύκολη διάλυση τους. Ένα διάλυμα που περιέχει διαλυμένες κυτταρίνες, δεν είναι ένα καθαρό διάλυμα κυτταρίνης, αλλά ένα μείγμα, αποτελούμενο από κυτταρίνη και διάφορα άλλα συστατικά. Οι διαλύτες της κυτταρίνης μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, τους υδατικούς και τους μη υδατικούς. Στους πρώτους συγκαταλέγονται ανόργανα οξέα όπως τα  $H_2SO_4$  (65-80%),  $HCl$  (40-42%),  $H_3PO_4$  (73-83%) και  $HNO_3$  (84%), τα

οποία μπορούν να οδηγήσουν στην ομοιόμορφη διάλυση της κυτταρίνης. Το συμπυκνωμένο  $\text{HNO}_3$  (66%) δεν διαλύει την κυτταρίνη, αλλά σχηματίζει μία επιπρόσθετη ένωση με την κυτταρίνη. Τα οξέα κατά Lewis όπως τα  $\text{LiCl}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Be}(\text{ClO}_4)_2$ , το ιωδιούχο, το βρωμιούχο κ.α. μπορούν να διαλύσουν κυτταρίνες με χαμηλό Β.Π. Ως οργανικοί διαλύτες της κυτταρίνης αναφέρονται οι μη υδατικοί ή οι μερικώς υδατικοί διαλύτες, οι οποίοι βασίζονται σε οργανικές ενώσεις και αποτελούνται από ενεργοποιητές και οργανικά υγρά. Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικό του δραστικού παράγοντα και ως διαλύτης του ενεργοποιητή, αυξάνοντας την πολικότητα του διαλύτη και τελικά τη διάλυση της κυτταρίνης.

Όσον αφορά τη θερμική αποδόμηση της κυτταρίνης μπορεί να επιτευχθεί στο στενό θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 300 και 375 °C. Ανάλογα με τη θερμοκρασία προκύπτουν και τα αντίστοιχα προϊόντα. Η θέρμανση σε χαμηλότερη θερμοκρασία (200 – 280 °C) έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση του νερού και τον σχηματισμό κάρβουνου και αέριων προϊόντων. Η εφαρμογή υψηλότερης θερμοκρασίας οδηγεί στον διαχωρισμό της κυτταρίνης σε εύφλεκτα πτητικά προϊόντα. Το πιο σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν της αποδόμησης της κυτταρίνης σε υψηλή θερμοκρασία αποτελεί η λεβογλουκόζη, η οποία μπορεί να αποδομηθεί περαιτέρω σε χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις και προϊόντα παρόμοια με την πίσσα. Τέλος, η μηχανική αποδόμηση της κυτταρίνης συμβαίνει διότι κατά τη μηχανική διαδικασία η κυτταρίνη μπορεί να απορροφήσει αποτελεσματικά μηχανική ενέργεια, προκαλώντας αλλαγές στη μορφολογία και τη δομή της. Οι εν λόγω αλλαγές αφορούν κυρίως τη μειωμένη κρυσταλλικότητα και την αυξημένη προσβασιμότητα.

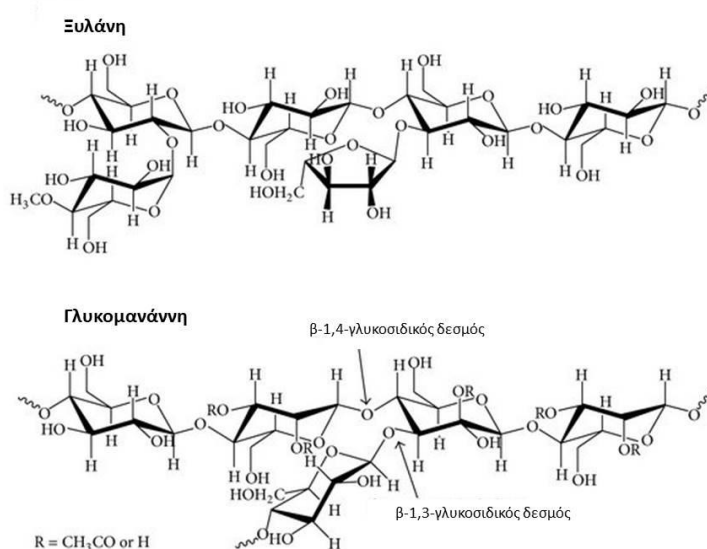
#### 1.1.3.5 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη αποτελεί το δεύτερο σε περιεκτικότητα συστατικό των φυτικών ιστών. Ο Schulz (1891) θεώρησε ότι οι πολυσακχαρίτες που διαχωρίστηκαν εύκολα από τους φυτικούς ιστούς ήταν ημιτελή προϊόντα κυτταρίνης ή πρόδρομες ενώσεις αυτής και ως εκ τούτου ονομάστηκαν ημικυτταρίνες. Ανακάλυψε επίσης ότι το παραπάνω συστατικό υδρολύεται εύκολα σε μονοσακχαρίτες σε θερμό νερό, αραιό ανόργανο οξύ ή σε κρύο διάλυμα  $\text{NaOH}$  5%. Πρόσφατα, με την εξέλιξη του καθαρισμού των πολυσακχαριτών και την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων χρωματογραφίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, αναδείχθηκαν περισσότερα χαρακτηριστικά της ημικυτταρίνης. Ο Aspinal (1962) όρισε ότι η ημικυτταρίνη προέρχεται από φυτικούς πολυσακχαρίτες και περιλαμβάνει τη βασική αλυσίδα που περιέχει υπολείμματα D-ξυλόζης, D-μαννόζης, D-γλυκόζης, ή D-γαλακτόζης και

άλλους γλυκοζίτες όπως και διακλαδισμένες αλυσίδες συνδεδεμένες με τη βασική αλυσίδα. Ο καθαρισμός των ημικυτταρινών διεξήχθη σύμφωνα με τις διαφορετικές αλκαλικές διαλυτότητες σε σχέση με την κυτταρίνη. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη η ημικυτταρίνη είναι ένα πολυμερές αποτελούμενο από διαφορετικές ποσότητες διαφορετικών μορίων σακχάρων (Chen, 2014).

### 1.1.3.6 Χημική δομή της ημικυτταρίνης

Η περιεκτικότητα και η δομή της ημικυτταρίνης διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα στα διαφορετικά φυτά. Η έρευνα για τη χημική δομή της ημικυτταρίνης αφορά κυρίως τη σύσταση της κύριας αλυσίδας και των διακλαδισμένων αλυσίδων των γλουκανών. Η κύρια αλυσίδα μπορεί να αποτελείται από έναν ή περισσότερους τύπους γλυκοζιτών, ενώ και οι δεσμοί μεταξύ των γλυκοζιτών διαφοροποιούνται σημαντικά. Πρώτες ύλες από διαφορετικές περιοχές παραγωγής και διαφορετικά τμήματα των φυτών διαθέτουν διαφορετική σύσταση γλουκανών. Επομένως για να απεικονιστεί η χημική δομή των ημικυτταρινών θα πρέπει πρώτα να ταξινομηθούν οι γλουκάνες. Πιστεύεται γενικά ότι η ημικυτταρίνη αποτελεί την γλουκάνη στη μήτρα του κυττάρου και τα κύρια συστατικά της είναι η ξυλάνη, η ξυλογλουκάνη, η γλυκομαννάνη, η γαλκτομαννάνη κ.α. (Zhang et al., 2006). Όλα τα ανώτερα φυτά περιέχουν ξυλάνη. Οι D-ξυλοζίτες, συνδέονται μεταξύ τους προς σχηματισμό γραμμικών μορίων όπως της κύριας αλυσίδας. Η ξυλάνη είναι η γλουκάνη με σκελετό 1,4-β-D-ξυλοπυρανόζη και με διακλαδισμένες αλυσίδες 4-οξυμεθυλ-γλουκορονικού οξέως.



Εικόνα 1.1.3. Χημική δομή των κύριων συστατικών της ημικυτταρίνης (ξυλάνης και γλυκομαννάνης)

Η ημικυτταρίνη των πλατύφυλλων δέντρων αποτελείται κυρίως από αυτού του τύπου τους πολυσακχαρίτες. Η ημικυτταρίνη των αγρωστωδών περιέχει επίσης L-αραβινοφουρανόση συνδεδεμένη με τη μορφή διακλαδισμένων αλυσίδων στην κύρια αλυσίδα. Ο αριθμός των διακλαδισμένων αλυσίδων εξαρτάται από το είδος του φυτού. Η τυπική μοριακή δομή της ημικυτταρίνης των αγρωστωδών συντίθεται κυρίως από β-D-ξυλοπυρανοζύλιο το οποίο συνδέεται με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Ο βαθμός πολυμερισμού της ημικυτταρίνης στα αγρωστώδη είναι μικρότερος του 100. Η ξυλάνη των ξυλωδών ιστών αποτελείται από γραμμικές ξυλάνες συνδεδεμένες με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς, με κάποιες διαφορετικές μικρές διακλαδισμένες αλυσίδες πάνω στην κύρια αλυσίδα. Επιπροσθέτως, η ημικυτταρίνη των κωνοφόρων περιέχει κυρίως όξινες ξυλάνες που έχουν μερικώς ακετυλιωθεί.

Τα κωνοφόρα περιέχουν το υψηλότερο ποσοστό μαννάνης, η οποία απαντάται επίσης και σε πλατύφυλλα δέντρα, ενώ πολύ μικρότερο ποσοστό βρίσκεται στα ποώδη φυτά. Η μαννόζη και η γλυκόζη συνδέονται με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν ανομοιόμορφα πολυμερή ως κύρια αλυσίδα. Η κύρια αλυσίδα της μαννάνης στα πλατύφυλλα αποτελείται από γλυκόζη και μαννόζη και το ποσοστό των δύο είναι 1,5-2 : 1, ενώ ο Β.Π. μεταξύ 60 και 70. Αντίθετα στα κωνοφόρα η παραπάνω αναλογία είναι περίπου 3 : 1, και ο Β.Π μεταξύ 60 και 100 (Yang, 2008).

#### 1.1.3.7 Χημική δομή της ξυλογλουκάνης

Οι κύριες αλυσίδες της ξυλογλουκάνης και της κυτταρίνης αποτελούνται από μονάδες D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι το 75% της γλυκοζάλης αντικαθίσταται από α-D-ξυλοπυρανόζη στο Ο-6 της κύριας αλυσίδας. Η ξυλογλουκάνη περιέχει κυρίως γλυκόζη, ξυλόζη και γαλακτόζη σε αναλογία περίπου 4:3:1. Ανάλογα με την οικογένεια στην οποία ανήκουν, η ξυλογλουκάνη στα φυτά μπορεί επίσης να περιέχει φουκόζη και αραβινόζη. Η κύρια αλυσίδα της ξυλογλουκάνης στα δικοτυλήδονα είναι αυτή των β-(1,4) γλουκανών. Στα μονοκοτυλήδονα φυτά, η περιεκτικότητα σε ξυλογλουκάνη διαφέρει σημαντικά. Γενικά η τερματική γαλακτόζη απουσιάζει και το περιεχόμενο της ξυλόζης και της γαλακτόζης είναι χαμηλότερα από αυτά των δικοτυλήδονων (Yang, 2008).

#### 1.1.3.8 Χημική δομή της μαννάνης

Στα συστατικά της μαννάνης συγκαταλέγονται η γαλακτομαννάνη, η γλυκομαννάνη, η μαννάνη του γλουκουρονικού οξέως κ.α. Τα υπολείμματα της μαννόζης είναι συνδεδεμένα με  $\beta$ -1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας τη μαννάνη, ή τη γαλακτομαννάνη όταν τα υπολείμματα της γαλακτόζης συνδεθούν με  $\alpha$ -1,6-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Ο σκελετός της γαλακτομαννάνης αποτελείται από γλυκόζη και μαννόζη σε ποσοστό περίπου 1:3. Η γλυκομαννάνη περιέχει επίσης μία γαλακτόζη ως διακλαδισμένη αλυσίδα και για το λόγο αυτό αναφέρεται και ως γαλακτογλουκομαννάνη. Επιπροσθέτως, η ομάδα υδροξυλίου των υπολειμμάτων της μαννόζης μπορεί να ακετυλιωθεί. Το γλουκουρονικό οξύ επικρατεί στο κυτταρικό τοίχωμα, αλλά η περιεκτικότητά του είναι χαμηλή. Τα υπολείμματα της μαννόζης συνδέονται με  $\alpha$ (1-4) δεσμούς και τα υπολείμματα του γλουκουρονικού οξέως δεν φέρουν μόνο  $\beta$ -(1-6) δεσμούς ξυλόζης ή γαλακτόζης, αλλά και δεσμούς 1-3 αραβινόζης (Yang, 2008).

#### 1.1.3.9 Χημική δομή γαλακτάνης και αραβιογαλακτάνης

Τα υπολείμματα γαλακτόζης συνδέονται με  $\beta$ (1-4) δεσμούς σχηματίζοντας το σκελετό της γαλακτάνης και βρίσκονται ως πλευρική αλυσίδα προσκολλημένη στο O-6. Υπάρχουν δύο τύποι αραβιογαλακτάνης. Ο κοινός φέρει τερματικά υπολείμματα γαλακτόζης συνδεδεμένα στο O-3 ή στο O-5. Ο εναλλακτικός τύπος έχει υπολείμματα γαλακτόζης συνδεδεμένα στο O-4 ή το O-3 και O-4 δεσμούς και τα υπολείμματα της αραβινοφουρανόζης συνδέονται τερματικά ή με O-5 δεσμό. Η αραβιογαλακτάνη μπορεί επίσης να είναι ολιγοσακχαρίτης αποτελούμενος από υπολείμματα αραβινόζης. Τέλος, η αραβιογαλακτάνη στο κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να είναι ανεξάρτητο μόριο ή ως πλευρική αλυσίδα στα μόρια πολυσακχαριτών της πηκτίνης (Yang, 2008).

#### 1.1.3.10 Χημική δομή της αραβινάνης

Η αραβινάνη κυρίως δομείται από αραβινόζη και  $\alpha$ -L-αραμινοφουρανοζυλικά υπολείμματα συνδεδεμένα μεταξύ τους στον C-5 σχηματίζοντας έτσι την κύρια αλυσίδα η οποία φέρει πολλές διακλαδισμένες αλυσίδες. Μερικές πλευρικές αλυσίδες της αραβινοφουρανοζύλης συνδέονται στο O-2 ή στο O-3 ή ταυτόχρονα στο O-2 και στο O-3. Τέλος κάποιες από τις πλευρικές αλυσίδες αποτελούνται από αραβινόζη.



#### 1.1.3.11 Φυσικοχημικές ιδιότητες της ημικυτταρίνης

Λόγω του χαμηλού βαθμού πολυμερισμού και των ελάχιστων κρυσταλλικών δομών, η ημικυτταρίνη είναι πιο ευάλωτη στην αποδόμηση σε όξινο περιβάλλον συγκριτικά με την κυτταρίνη. Ωστόσο, οι κατηγορίες των γλυκοσιδικών δεσμών στην ημικυτταρίνη ποικίλουν περιλαμβάνοντας τύπους πυράνης, φουράνης, α- και β-γλυκοσιδικών δεσμών κ.α. Οι τρόποι σύνδεσης των γλυκοζιτών είναι επίσης διάφοροι όπως οι 1-2, 1-3, 1-4 και 1-6 (Yang, 2008). Οι περισσότερες έρευνες έχουν δείξει ότι η υδρόλυση της μεθυλ-ραβοπυρανόζης είναι η γρηγορότερη, ενώ οι υπόλοιπες εμφανίζουν μικρότερο ρυθμό υδρόλυσης. Ο τύπος β-D- των γλυκοσιδίων είναι δεκτικότερος στην αποδόμηση από τον τύπο α-D.

Η ημικυτταρίνη αποτελεί μία ανομοιογενή γλουκάνη αποτελούμενη από ποικιλία γλυκοζιτών, έτσι ώστε τα αναγωγικά άκρα να φέρουν διάφορα είδη γλυκοζιτών και μερικές διακλαδισμένες αλυσίδες. Όμοια με την κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη μπορεί να αντιδράσει υπό αλκαλικές συνθήκες. Σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγείται σε αλκαλική υδρόλυση. Η ταχύτητα της αλκαλικής υδρόλυσης των φουρανικών γλυκοσιδίων είναι πολλές φορές ταχύτερη από εκείνη των γλυκοσιδίων πυράνης. Η ημικυτταρίνη μπορεί να διαλυθεί τόσο σε αλκαλικά διαλύματα (5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) όσο και σε όξινα (2%  $\text{HCl}$ ). Η σχετική συγγένεια που έχει με το νερό δύναται να οδηγήσει σε αύξηση του ιξώδους του διαλύτη ή και το σχηματισμό πηκτώματος. Για παράδειγμα, όταν η συγκέντρωση της ημικυτταρίνης στο νερό αγγίζει το 0,5%, το υδατικό διάλυμα έχει μια ορισμένη συνοχή που μοιάζει με του ανθρώπινου σάλιου, ενώ όταν φτάσει το 2% το διάλυμα δεν μπορεί να ρέει λόγω του αυξημένου ιξώδους. Τέλος όταν ξεπεράσει το 4% το διάλυμα χαρακτηρίζεται ως πήκτωμα. Η συγγένεια της ημικυτταρίνης με το νερό είναι στενά συνδεδεμένη με την πεντόζη που φέρει στο μόριο της. Ως εκ τούτου, η αραβινόζη και η ξυλόζη είναι υπεύθυνες για τη στερέωση της μάζας του νερού σε διάφορες δομές της ημικυτταρίνης. Για τον παραπάνω λόγο, η πεντόζη αυτή βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων.

#### 1.1.3.12 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα από τα πιο άφθονα πολυμερή στους φυτικούς ιστούς μαζί με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Το ποσοστό της στο ξύλο και τα αγρωστώδη φυτά κυμαίνεται από 20 έως 40% και από 15 έως 20% αντίστοιχα. Κάτω από το όνομα “λιγνίνη” περιλαμβάνεται μια σειρά συστατικών τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ανομοιογένεια μεταξύ των διαφορετικών ειδών των φυτών, της εποχής ανάπτυξης και των τμημάτων του

φυτού. Ακόμη και μεταξύ κυττάρων με διαφορετική μορφολογία ή διαφορετικών κυτταρικών τοιχωμάτων, η δομή της λιγνίνης δεν είναι η ίδια (Chen, 2014).

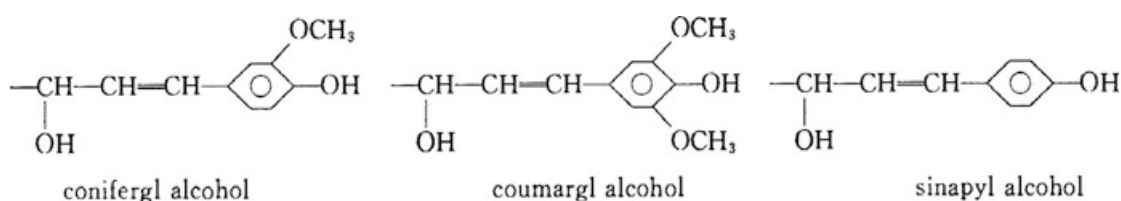
Η λιγνίνη αποτελεί ένα σύμπλεγμα αποτελούμενο από σύνθετες μονάδες φαινυλοπροπανίου συνδεδεμένες τυχαία με μη γραμμικό τρόπο. Τα κύρια μονομερή της αποτελούν τρεις φαινυλοπροπιονικές αλκοόλες [coniferyl alcohol (guaiacyl propanol), coumaryl alcohol (p-hydroxyphenyl propanol), και sinapyl alcohol (syringyl propanol), Εικόνα 1.1.4].

Συνήθως τα γυμνόσπερμα φυτά περιέχουν κυρίως guaiacyl (G) lignin, τα δικοτυλήδονα κυρίως guaiacyl-syringyl (GS) lignin και τα μονοκοτυλήδονα κυρίως guaiacyl-syringyl-hydroxy-phenyl (GSH) lignin (Wei and Song, 2001). Στο παρελθόν ο διαχωρισμός της λιγνίνης γινόταν με βάση το είδος των φυτών (λιγνίνη των πλατύφυλλων, των κωνοφόρων και των αγροστωδών). Βασιζόμενοι στη δομή της, η λιγνίνη χωρίστηκε τελικά σε G και GS λιγνίνη. Η G λιγνίνη δομείται κυρίως μέσω του αφυδατωμένου ολιγομερισμού της conifer alcohol και η δομή της είναι ομοιογενής. Αυτού του είδους η λιγνίνη εμφανίζει αρνητική αντίδραση Maule, διότι λιγότερο από το 1,5% της συριγκαλδεΐδης και περίπου 5% της p-υδροξυβενζαλδεΐδης δημιουργήθηκαν μέσω της οξείδωσης του νιτροβενζολίου. Το μεγαλύτερο ποσοστό της λιγνίνης των κωνοφόρων ανήκει στη G λιγνίνη, η οποία συνπολυμερίζεται από γουαϊακύλιο και έχει θετική αντίδραση Maule. Η GSH λιγνίνη είναι το αποτέλεσμα του αφυδατωμένου ολιγομερισμού της conifer alcohol και της sinapyl alcohol. Ο λόγος του syringyl propane προς το guaiacyl propane είναι περίπου 0,5 – 0,1 ενώ περιέχονται επίσης και ομάδες εστέρων. Η p-coumaryl alcohol συνδέεται με τη λιγνίνη με τη μορφή εστέρων (Chen, 2014).

#### 1.1.3.13 Χημική δομή της λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι ένα πολυφαινολικό πολυμερές με τρισδιάστατη δομή. Επειδή όλη η διαδικασία απολιγνινοποίησης περιλαμβάνει διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών της φυσικής λιγνίνης, με διάφορες συνθήκες και μεθόδους διαχωρισμού, η δομή της λιγνίνης παρουσιάζει μεγάλες διαφορές. Επομένως, χρησιμοποιείται ένα υποθετικό δομικό μοντέλο για να περιγράψει τη δομή της λιγνίνης. Επιπλέον, διαφορετικά φυτά όπως επίσης και διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης από το ίδιο φυτό εμφανίζουν διαφορετικούς δεσμούς και σύσταση των λειτουργικών ομάδων, οδηγώντας στην αδυναμία περιγραφής της ακριβούς δομής του μορίου. Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί διάφορα δομικά μοντέλα (Εικόνα 1.1.5). Τα

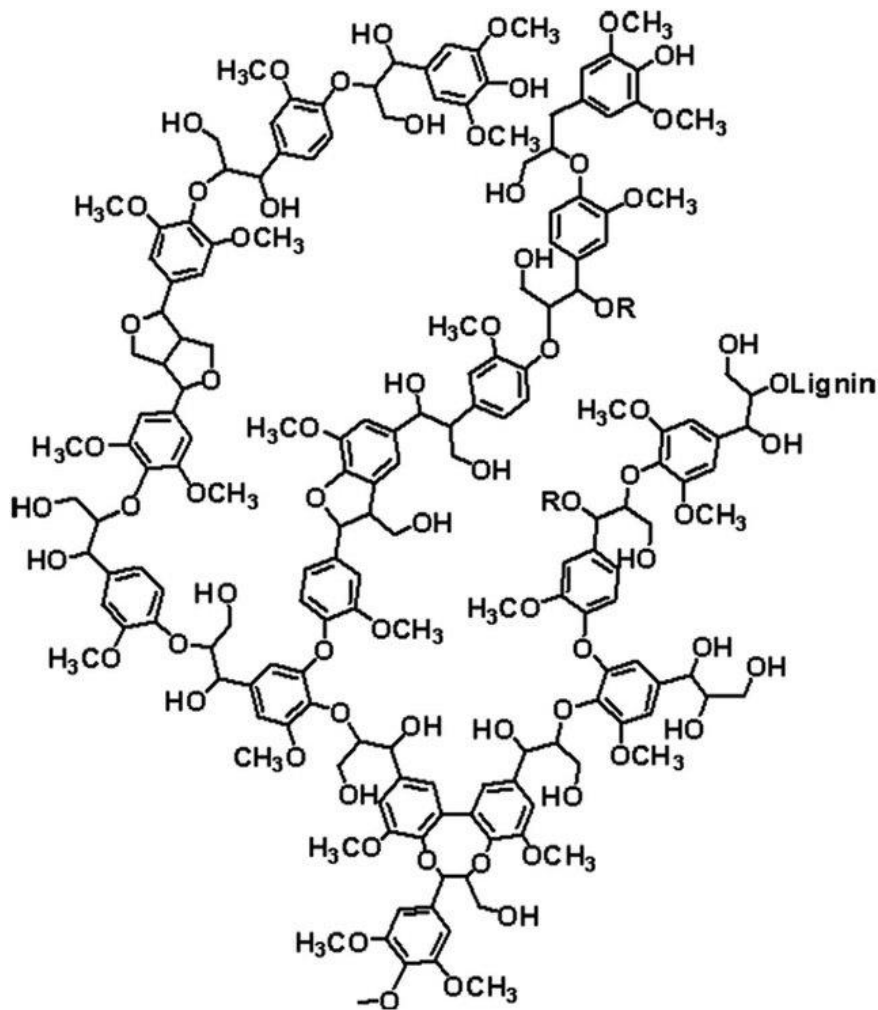
δομικά στοιχεία της λιγνίνης (μονάδες φαινυλοπροπιίου) συνδέονται μεταξύ τους με ακανόνιστες συζεύξεις C-C και C-O. Παρόλο που η λιγνίνη αποτελείται από 3 βασικά μονομερή, η ποσοτική αναλογία τους διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών φυτικών ειδών. Επιπλέον οι δεσμοί αιθέρα στη λιγνίνη περιλαμβάνουν φαινολ-αιθερικούς δεσμούς, αλκυλ-αιθερικούς δεσμούς, διαλκυλ-αιθερικούς δεσμούς και ούτω καθεξής. Περίπου τα δύο τρίτα με τρία τέταρτα των phenyl-propane μονάδων της λιγνίνης συνδέονται με τις γειτονικές δομικές μονάδες με δεσμούς αιθέρα και μόνο ένα μικρό ποσοστό απαντάται ως ελεύθερα φαινυλ-υδροξύλια.



**Εικόνα1.1.4. Βασικές δομικές μονάδες της λιγνίνης**

Οι κύριοι δεσμοί που εμφανίζονται στη λιγνίνη των αγροστωδών είναι όμοιοι με αυτούς των πλατύφυλλων δέντρων. Ο κύριος τύπος δεσμού των δομικών μονάδων είναι οι αρωματικοί γλυκερολ-β-αρυλ-αιθερικοί δεσμοί. Αυτοί είναι λιγότεροι από τους αντίστοιχους στα πλατύφυλλα δέντρα και παρόμοιοι με αυτούς των κωνοφόρων. Ο λόγος των δεσμών C-C όπως οι β-5 και β-β στις δομικές μονάδες είναι υψηλότερος από αυτόν των πλατύφυλλων. Στη δομή της λιγνίνης των αγροστωδών, ένα αξιοσημείωτο ποσοστό των p-υδροξυφαινυλοπροπανικών μονάδων συνδέονται με φαινυλοπροπανικές μονάδες σε μορφή εστέρα. Για παράδειγμα στο άχυρο, το 60% των p-υδροξυφαινυλοπροπανικών μονάδων συνδέονται με τη μορφή εστέρων. Επιπλέον, η λιγνίνη των αγροστωδών περιέχει μικρή ποσότητα εστέρων φερουλικού οξέος συγκριτικά με άλλα φυτά.

Λόγω των τύπων και της θέσης των λειτουργικών ομάδων στους διαφορετικούς τύπους λιγνίνης, η λιγνίνη των γυμνόσπερμων έχει διαφορετικά χημικά χαρακτηριστικά. Περιέχει κυρίως G λιγνίνη, η G- δομή της οποίας περιέχει μια μεθόξυ-ομάδα και είναι δύσκολο να αφαιρεθεί κατά την διαδικασία παραγωγής χαρτοπολτού λόγω της σταθερότητας των C-C δεσμών που σχηματίζονται με άλλα μονομερή. Από την άλλη τα μονοκοτυλήδονα περιέχουν κυρίως GSH λιγνίνη.



Εικόνα 1.1.5. Προτεινόμενη χημική δομή της λιγνίνης από τους Prieur et al., 2017.

#### 1.1.3.14 Φυσικοχημικές ιδιότητες της λιγνίνης

Στις χημικές ιδιότητες της λιγνίνης περιλαμβάνονται αντιδράσεις αλογόνωσης, νιτροποίησης και οξειδωσης του φαινολικού δακτυλίου, αντιδράσεις επί της βενζολικής αλκοόλης, του αρυλαιθέρα, του δεσμού αλκυλ-αιθέρα στην πλευρική αλυσίδα κ.α. Οι χημικές αντιδράσεις των δομικών μονάδων της λιγνίνης μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, τις πυρηνόφιλες και τις ηλεκτρόφιλες αντιδράσεις.

Το μοριακό βάρος της λιγνίνης δεν μπορεί με ακρίβεια να προσδιοριστεί λόγω των παραλλαγών που υπάρχουν στο μόριο της λιγνίνης. Υπό την επίδραση μηχανικών πιέσεων, ενζύμων ή χημικών αντιδραστηρίων η τρισδιάστατη δομή του μορίου αποδομείται σε θραύσματα διαφορετικού μεγέθους, γεγονός που οδηγεί στην πολυδιασπορά του μοριακού βάρους της λιγνίνης (Chen, 2014).

Η ύπαρξη υδροξυλίων και πολλών ακόμη πολικών ομάδων στη δομή της λιγνίνης, έχουν σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη ισχυρών ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου καθιστώντας τη λιγνίνη αδιάλυτη στο νερό. Όμως η συμπύκνωση ή η αποδόμηση της λιγνίνης επιφέρει το διαχωρισμό σε διαλυτή και αδιάλυτη λιγνίνη. Όμως, η παρουσία φαινολικών υδροξυλίων και καρβοξυλίων καθιστά τη λιγνίνη διαλυτή σε αλκαλικά διαλύματα.

Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο πολυμερές. Έχει μικρή ευθρυπτότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και δεν σχηματίζει φιλμ σε διαλύτες. Επιπλέον, εμφανίζει υαλώδεις ιδιότητες. Κάτω από θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, η λιγνίνη βρίσκεται στη στερεά φάση και αρχίζει να κινείται όταν αυτή ξεπεραστεί. Η παραπάνω θερμοκρασία μεταφοράς της απομονωμένης λιγνίνης διαφοροποιείται ανάλογα με την πρώτη ύλη, τη μέθοδο διαχωρισμού, το μοριακό βάρος και την περιεκτικότητα σε νερό. Η θερμοκρασία στην οποία το μόριο της απολύτως αποξηραμένης λιγνίνης αρχίζει να μαλακώνει κυμαίνεται από 127 έως 129 °C και μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό, υποδεικνύοντας ότι το νερό δρα ως πλαστικοποιητής της λιγνίνης. Επιπλέον, όσο υψηλότερο είναι το μοριακό βάρος του μορίου, τόσο υψηλότερη και η θερμοκρασία μαλάκυνσης αυτού.

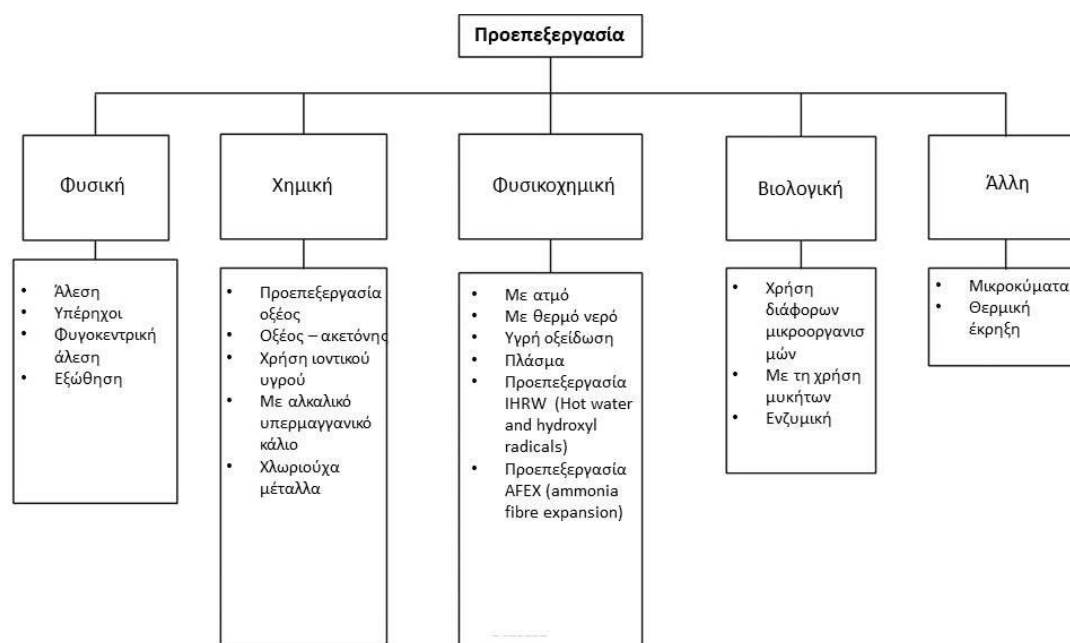
Η σχετική πυκνότητα της λιγνίνης κυμαίνεται από 1,35 έως 1,50 και οι τιμές διαφοροποιούνται ανάλογα με το μέσο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση. Όσον αφορά το χρώμα, η ενδογενής λιγνίνη αποτελεί μία άχρωμη ή λευκή ουσία.

#### 1.1.4 Προεπεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Η προ-επεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα για την απελευθέρωση της κυτταρίνης από τη λιγνίνη της φυτικής βιομάζας και την περαιτέρω υδρόλυση της για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων. Όμως, η χρησιμοποίηση της κυτταρίνης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών ως πηγή άνθρακα μέσω ενζυμικής υδρόλυσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Περιλαμβάνει την προσρόφηση των ενζύμων στην επιφάνεια του υποστρώματος, τη συνεργατική επίδραση άλλων πρωτεϊνικών συστατικών στην υδρόλυση και τέλος την απελευθέρωση του υδρολυμένου προϊόντος στον διαλύτη. Πολλοί παράγοντες εμπλέκονται στην παραπάνω διαδικασία και αφορούν τόσο τα δομικά χαρακτηριστικά της λιγνοκυτταρίνης όσο και τους μηχανισμούς και τις αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με την κινητική των ενζύμων.

Παρόλα αυτά, η αντιμετώπιση των παραγόντων που σχετίζονται με τη δομή του εκάστοτε λιγνοκυτταρινούχου υλικού αποτελεί το “κλειδί” για την αποτελεσματική

υδρόλυση του υποστρώματος. Οι παραπάνω παράγοντες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα σε λιγνίνη, τον λόγο της άμορφης προς την κρυσταλλική κυτταρίνη, τον βαθμό πολυμερισμού, την ύπαρξη ακέτυλο- ομάδων, την αλληλεπίδραση των ενζύμων με τις φυτικές πρωτεΐνες, τον τρόπο σύνδεσης της κυτταρίνης με την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη, την προσπελάσιμη επιφάνεια για την ενζυμική αποδόμηση, το πορώδες και την ειδική επιφάνεια της βιομάζας (Singh et al., 2015).



**Εικόνα 1.1.6. Κατηγοριοποίηση των μεθόδων προεπεξεργασίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας**

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται κατά την προεπεξεργασία αποτελούν απαραίτητες πρακτικές για την αντιμετώπιση των παραπάνω ζητημάτων και έχουν ως στόχο τις δομικές αλλαγές στη λιγνοκυτταρίνη. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την άσκηση υψηλής πίεσης ή θερμοκρασίας ή και τον συνδυασμό τους, την επεξεργασία με διαβρωτικές χημικές ουσίες όπως τα οξέα και οι βάσεις, ή τη χρήση τεχνικών μοριακής διαταραχής όπως η εφαρμογή υπερήχων.

Με τη χρήση των παραπάνω διαδικασιών προ-επεξεργασίας μπορεί να αφαιρεθεί μερικώς η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη και να αυξηθεί το πορώδες και η συγκέντρωση της άμορφης κυτταρίνης. Πολλές ακόμη εφαρμογές έχουν προταθεί τα τελευταία χρόνια, οι σημαντικότερες των οποίων συνοψίζονται στην Εικόνα 1.1.6.

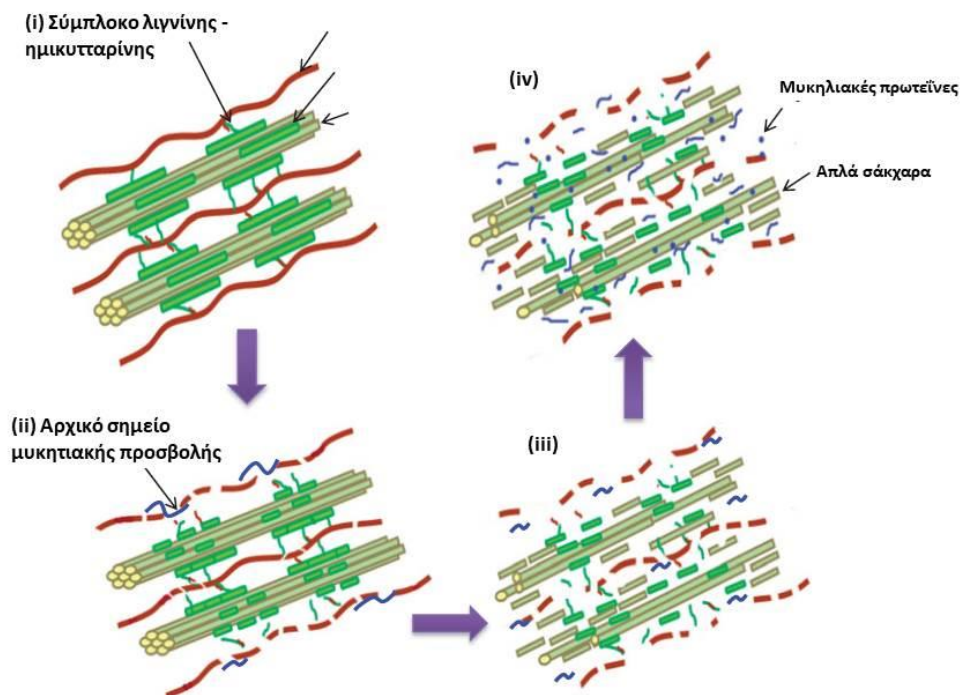
Σε κάθε περίπτωση, μια σειρά παραγόντων πρέπει να εξετάζονται πριν την υιοθέτηση κάποιας-ων από τις παραπάνω μεθόδους προεπεξεργασίας. Σε αυτές περιλαμβάνονται το κόστος και η ενέργεια που απαιτείται καθώς και η αποτελεσματικότητα

σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Επιπλέον η υποβολή της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας στην προεπεξεργασία δεν πρέπει να καθιστά το προϊόν ακατάλληλο για περαιτέρω χρήση. Είναι επίσης επιθυμητό, η διαδικασία που επιλέγεται, να οδηγεί σε παράλληλα πλεονεκτήματα όπως η ανάκτηση της ημικυτταρίνης στο υδατικό διάλυμα. Από οικονομικής άποψης, η προεπεξεργασία θα πρέπει να απαιτεί χαμηλό κόστος εγκατάστασης, λειτουργίας και προμήθειας της βιομάζας. Εκτός αυτών θα πρέπει να συνυπολογίζονται και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της εκάστοτε βιομάζας που επιτρέπουν ή δυσχεραίνουν την ενζυμική υδρόλυση (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Μεταξύ των μεθόδων που έχουν προταθεί, οι βιολογικές μέθοδοι βασίζονται σε βιολογικούς παράγοντες απολιγνινοποίησης και καθιστούν τη διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης πιο αποδοτική. Σε αντίθεση με τις φυσικές και χημικές μεθόδους, δεν απαιτούν την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας ή/και πίεσης και οποιουδήποτε οξέος, βάσης ή άλλων χημικών ουσιών. Επιπλέον, κατά τη διαδικασία δεν παράγεται κανένα ανεπιθύμητο προϊόν. Ωστόσο οι βιολογικές μέθοδοι μειονεκτούν έναντι των υπολοίπων στο γεγονός ότι υπάρχει μειωμένος έλεγχος ολόκληρης της διαδικασίας και απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα για την επίτευξη του τελικού στόχου. Παρόλα αυτά, φαίνεται να βρίσκουν ευρεία εφαρμογή κυρίως λόγω του περιβαλλοντικού οφέλους και του χαμηλού κεφαλαίου που απαιτείται για την εγκατάστασή τους.

### 1.1.5 Βιοαποδόμηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Πολλοί μικροοργανισμοί είναι ικανοί στην αποδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό των μυκηλιακών μυκήτων, γνωστοί ως μύκητες λευκής σήψης (white-rot fungi), έχουν εξελιχθεί ώστε να διασπούν τη λιγνίνη, η οποία αποτελεί το πιο ανθεκτικό μόριο του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον, οι μύκητες φαιάς σήψης (brown-rot fungi) μπορούν μόνο να τροποποιήσουν την λιγνίνη, αλλά αποπολυμερίζουν γρήγορα τα κυτταρινούχα υλικά. Οι πιο αποδοτικοί από αυτούς ανήκουν στο φύλο Basidiomycota (Βασιδιομύκητες) (Bennett et al., 2002, Rabinovich et al., 2004). Η αποδοτικότητα της αποδόμησης φαίνεται να συνδέεται με τη μυκηλιακή ανάπτυξη, η οποία επιτρέπει τη μεταφορά θρεπτικών όπως το άζωτο και ο σίδηρος εντός των "φτωχών" λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων τα οποία αποτελούν την πηγή άνθρακα (Hammel, 1997). Καθοριστικό ρόλο στην όλη διαδικασία, διαδραματίζει η παραγωγή κυτταρινολυτικών και λιγνολυτικών ενζύμων.



**Εικόνα 1.1.7. (i) Δομή ενός τυπικού λιγνοκυτταρινούχου υλικού, (ii) αρχική μυκητιακή προσβολή στη μήτρα ημικυτταρίνης – λιγνίνης, (iii) αποδόμηση των τριών πολυμερών και αύξηση του μυκηλίου και (iv) εξαντλημένο λιγνοκυτταρινούχο υπόστρωμα εμπλουτισμένο με μυκητιακές πρωτεΐνες και απλά σάκχαρα (ΠΗΓΗ: Sharma and Arora, 2013).**

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ενδογλουκανάσες και εξωγλουκανάσες, δηλαδή ένζυμα που μετατρέπουν την κυτταρίνη σε κελλοβιόζη ή κυτταρινο-ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι αποδομούνται περαιτέρω μέσω της δράσης της β-γλυκοσιδάσης ή της αφυδρογονάσης της κελλοβιόζης. Η ένδο-1,4-β-γλουκανάση ή ενδογλουκανάση (EC 3.2.1.4 κυτταρινάση) είναι κοινή μεταξύ των βασιδιομυκήτων και απαντάται κυρίως στους μύκητες λευκής και φαιάς σήψης (Martinez et al. 2009, Steffen et al. 2007). Οι μύκητες παράγουν πολλαπλές ενδογλουκανάσες, οι οποίες είναι μονομερείς δομές, εμφανίζουν βέλτιστη ικανότητα κατάλυσης σε pH 4,0 - 5,0 και η δράση τους είναι κυρίως προσανατολισμένη προς τις άμορφες περιοχές στο μόριο της κυτταρίνης (Baldrian and Valášková 2008). Οι κελλοβιοϋδρολάση (CBH, EC 3.2.1.91, εξωκυτταρινάση), απαντάται κυρίως στους μύκητες λευκής και μαλακής σήψης και δρα στην κρυσταλλική μορφή της κυτταρίνης (Baldrian and Valášková 2008, Rytioja et al. 2014). Η β-γλυκοσιδάση (EC 3.2.1.21) επάγεται από μεγάλο αριθμό μακρομυκήτων, επιδεικνύει υψηλή δομική μεταβλητότητα, είναι σχετικά μη εκλεκτική (αποσυνθέτει και άλλους απλούς υδατάνθρακες) και παρόλο που συνήθως προσβάλλει κυτταρινο-ολιγοσακχαρίτες, είναι ανενεργή στην κρυσταλλική κυτταρίνη και



επιδεικνύει χαμηλή δραστικότητα έναντι της άμορφης κυτταρίνης (Baldrian and Valášková 2008).

Τέλος, η αφυδρογονάση της κελλοβιόζης (CDH, EC 1.1.99.18) είναι μια τυπική οξυδοοδουκτάση, η οποία οξειδώνει την κελλοβιόζη και ανώτερες κυτταρινοδεξτρίνες μέσω της χρήσης ευρέως φάσματος δεκτών ηλεκτρονίων συμπεριλαμβανομένων των κινονών, φαινοξυ-ριζών, κυτοχρώματος c κ.α. (Zamoocky et al. 2006). Η τελευταία παράγεται κυρίως από μύκητες λευκής σήψης κάτω από κυτταρινολυτικές συνθήκες ταυτόχρονα με κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες. Αν και δρα κυρίως κατά την αποδόμηση της κυτταρίνης, δύναται να αποδομήσει επίσης την ημικυτταρίνη αλλά και τη λιγνίνη παρουσία σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Henriksson et al. 1997).

### 1.1.6 Λιγνολυτικά ένζυμα

Τα λιγνολυτικά ένζυμα επάγονται από ξυλοσηπτικούς (κυρίως λευκής σήψης) μύκητες και κάποια σχετίζονται με μύκητες μαλακής σήψης οι οποίοι επιδεικνύουν υψηλή αποδοτικότητα στην αποδόμηση της λιγνίνης (Gao et al. 2010). Τα παραπάνω ένζυμα εμφανίζουν πολύ χαμηλή εκλεκτικότητα και περιλαμβάνουν φαινολο-οξειδάσες (λακάση), υπεροξειδάσες (λιγνίνη υπεροξειδάση, υπεροξειδάση εξαρτημένη του Mn, πολυλειτουργική (versatile) υπεροξειδάση), καθώς επίσης και συμπληρωματικά ένζυμα όπως η οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης και η οξειδάση της γλυοξάλης.

Γενικά στις λακκάσες, ως δέκτης ηλεκτρονίων δρα το μοριακό οξυγόνο, ενώ στις υπεροξειδάσες το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι μύκητες που έχουν την ικανότητα αποδόμησης της λιγνίνης, εκκρίνουν ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω ένζυμα, σε συνδυασμό με την παραγωγή άλλων ενώσεων που είναι απαραίτητες. Για παράδειγμα ένας από τους καλύτερα μελετημένους μύκητες, ο *Phanerochaete chrysosporium*, δεν παράγει λακκάσες, αλλά επάγει αρκετές υπεροξειδάσες σε συνδυασμό με μια οξειδάση του γλυοξυλικού οξέος μέσω τις οποίας εξασφαλίζεται το απαραίτητο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για τη δράση των υπεροξειδασών (Singh and Chen, 2008). Όσον αφορά την υπεροξειδάση της λιγνίνης που διαθέτει την ικανότητα οξείδωσης του μη φαινολικού τμήματος της λιγνίνης (αποτελεί το 80-90% αυτής) δεν επάγεται από πολλούς μύκητες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αποδόμηση της λιγνίνης μπορεί να επιτευχθεί με πολλές διαφορετικές στρατηγικές. Μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, έχει αποδειχθεί ότι το μέγεθος των ενζύμων είναι αρκετά μεγάλο ώστε να εισέρχονται εντός των πόρων του ξύλου στα αρχικά στάδια της αποδόμησης

(Srebotnik et al., 1988). Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ότι η αρχική αποδόμηση οφείλεται σε οξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία διαχέονται δημιουργώντας οπές στο κυτταρικό τοίχωμα της φυτικής βιομάζας.

Εκτός της λιγνίνης, τα λιγνολυτικά ένζυμα είναι ικανά να αποδομήσουν πληθώρα επίμονων περιβαλλοντικών ρύπων, όπως οι χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις, οι κυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι χρωστικές και πολλά ακόμη συνθετικά πολυμερή (Bennett et al., 2002). Η ικανότητα αυτή οφείλεται εν πολλοίς στο ισχυρό οξειδωτικό δυναμικό που διαθέτουν σε συνδυασμό με την χαμηλή εκλεκτικότητα όσον αφορά το υπόστρωμα δράσης τους. Οι ιδιότητες των λιγνολυτικών ενζύμων έχουν προκαλέσει το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια και έχουν αξιοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών όπως η λεύκανση του χαρτοπολτού, η αποδόμηση βιομηχανικών βαφών, η επεξεργασία υγρών αποβλήτων και φυτοφαρμάκων κ.α. (Bilal et al., 2017, Kamal and Khodaparast, 2015).

#### 1.1.6.1 Λακκάσες

Οι λακκάσες (Lac, EC 1.10.3.2) ανήκουν στις πολυφαινολοξειδάσες και περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο. Στην ύπαρξη του χαλκού οφείλεται το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα των λακκασών. Οι λακκάσες καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό, συνοδευόμενη από την οξείδωση του υποστρώματος, συνήθως μιας π-διυδροξυφαινόλης ή κάποιου άλλου φαινολικού μορίου. Γενικά, οι λακκάσες είναι επιφορτισμένες με την οξείδωση πολυφαινολών, μεθοξυ- υποκατεστημένων φαινολών, αρωματικών διαμινών και πολλών άλλων μορίων, αλλά όχι της τυροσίνης, η οποία θεωρείται αποκλειστικό υπόστρωμα των τυροσινασών.

Οι λακκάσες σχηματίζονται από φυτά και μύκητες. Στα βακτήρια, ένζυμα που έχουν χαρακτηριστεί ως λακκάσες βρίσκονται συνήθως εντός των κυττάρων ή στον περιπλασματικό χώρο (Claus, 2003). Οι φυτικές λακκάσες συμμετέχουν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών που πολυμερίζονται για να σχηματίσουν τη λιγνίνη του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Boudet, 2000). Όσον αφορά τους μύκητες, οι λακκάσες έχουν εντοπιστεί σε είδη ασκομυκήτων όπως αυτά των γενών *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Botryosphaeria* και *Penicillium* (Rodriguez et al., 1996), σε φυτοπαθογόνα είδη όπως τα *Gaeumannomyces graminis* (Edens et al., 1999), *Magnaporthe grisea* (Iyer and Chato, 2003), *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen et al., 2002) και τέλος σε σαπροτροφικούς μύκητες και μύκητες λευκής σήψης που ανήκουν στο Φύλο των Βασιδιομυκήτων.

Αν και η αποικοδόμηση της λιγνίνης και ο μεταβολισμός των χουμικών οξέων είναι ο βασικότερος βιολογικός ρόλος των λακκασών στο οικοσύστημα, υπάρχουν και άλλες βιολογικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται. Μια από αυτές είναι η αλληλεπίδραση των μυκήτων με άλλους μικροοργανισμούς, μεταξύ άλλων με εδαφικούς μύκητες, όπως εκείνοι που ανήκουν στο γένος *Trichoderma*, αλλά και βακτήρια. Οι διαδικασίες αυτές συνήθως συνοδεύονται από μια έντονη επαγωγή της έκφρασης λακκασών, η οποία μάλλον είναι γενικευμένη στους βασιδιομύκητες (Baldrian, 2004) αλλά έχει παρατηρηθεί επίσης και στο μύκητα *R. solani* όταν έρθει σε επαφή με βακτήρια του γένους *Pseudomonas* τα οποία παράγουν αντιμυκητιακές ουσίες (Crowe and Olsson, 2001). Η αλληλεπίδραση αυτή πιθανώς περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση ουσιών όπως οι μελανίνες ή άλλες ουσίες, που συμμετέχουν στην παθητική άμυνα ενάντια σε εδαφικά βακτήρια και μύκητες (Baldrian et al., 2004). Οι λακκάσες επίσης μπορεί να είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση φαινολικών αντιβιοτικών που παρεμποδίζουν τη μυκητιακή ανάπτυξη.

Η συντριπτική πλειοψηφία των λακκασών είναι μονομερείς πρωτεΐνες. Κάποιες λακκάσες έχουν δομή ομοδιμερούς, το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες, όπως στην περίπτωση των λακκασών των *Phellinus ribis* (Min et al., 2001), *Pleurotus pulmonarius* (Souza and Peralta, 2003), *Trametes villosa* (Yaver et al., 1996) και του ασκομύκητα *Rhizoctonia solani* (Wahleithner et al., 1996). Ειδικά για την περίπτωση του *P. ostreatus*, όλες οι λακκάσες που έχουν εντοπιστεί, είναι μονομερείς πρωτεΐνες, εκτός από τις ΡΟΧ3α και ΡΟΧ3β, οι οποίες, όπως αναφέρθηκε, αποτελούνται από δύο υπομονάδες.

Όπως τα περισσότερα εξωκυτταρικά ένζυμα των μυκήτων, οι λακκάσες είναι γλυκοπρωτεΐνες. Ο βαθμός γλυκοζυλίωσης τους συνήθως ποικίλλει μεταξύ 10% και 25%, αν και έχουν βρεθεί και ένζυμα που παρεκκλίνουν από το παραπάνω εύρος. Η γλυκοζυλίωση των μυκητιακών λακκασών είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που δημιουργούνται κατά την ετερόλογη έκφραση των εν λόγω ενζύμων. Η γλυκοζυλίωση, εκτός από την προστασία που προσφέρει στα εξωκυτταρικά ένζυμα έναντι των πρωτεασών, σταθεροποιεί επιπλέον και τη δομή των ενζύμων (Yoshitake et al., 1993).

Οι λακκάσες καταλύουν την αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O$  οξειδώνοντας ταυτόχρονα ένα μεγάλο εύρος φαινολικών υποστρωμάτων, εκτός της τυροσίνης, χρησιμοποιώντας τα σαν δότες ηλεκτρονίων (Thurston 1994). Ωστόσο, οι λακκάσες μοιράζονται κοινούς δότες ηλεκτρονίων με τις τυροσινάσες, καθιστώντας τη διάκριση μεταξύ των δύο ενζύμων πολύ δύσκολη. Επιπλέον, η αλληλεπικάλυψη της δραστηριότητας των λακκασών με τις μονοφαινολ-μονοξυγενάσες και την οξειδάση της κατεχόλης (1,2-benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC

1.10.3.1), περιπλέκει ακόμη περισσότερο τον σαφή διαχωρισμό των ενζύμων αυτών. Σε γενικές γραμμές, έχουν επικρατήσει στη βιβλιογραφία δύο κριτήρια για να χαρακτηριστεί ένα ένζυμο ως πραγματική λακκάση, δηλαδή να οξειδώνει τη συρινγκαλδαζίνη, αλλά όχι την τυροσίνη (Thurston, 1994).

Οι μυκητιακές λακκάσες συνήθως έχουν βέλτιστες τιμές pH δράσης σε όξινες συνθήκες. Ενώ τα βέλτιστα pH για την οξείδωση του ABTS είναι σε γενικές γραμμές κάτω του 4, για άλλες ενώσεις όπως η 2,6 DMP, η γουαϊακόλη και η συρινγκαλδαζίνη, οι τιμές αυτές είναι από 4 έως 7. Οι θερμοκρασίες δράσης των λακκασών συνήθως δεν αποκλίνουν πολύ από άλλα εξωκυτταρικά λιγνιολυτικά ένζυμα με βέλτιστες τιμές από 50-70 °C, αν και έχουν περιγραφεί και ένζυμα με βέλτιστες τιμές εκτός του εύρους αυτού, όπως η λακκάση του *G. lucidum* με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 25 °C (Ko et al., 2001). Η σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες ωστόσο ποικίλλει πολύ. Ο χρόνος ημιζωής στους 50 °C μπορεί να κυμαίνεται από μερικά λεπτά, όπως για τη λακκάση του *B. cinnerea* (Slomczynski et al., 1995), πάνω από 2-3 ώρες για τις λακκάσες των *L. edodes* και *A. bisporus* (D'Annibale et al., 1996), έως και 50-70 ώρες για τη λακκάση των ειδών *Trametes* (Smirnov et al., 2001).

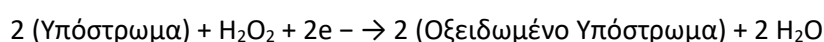
Κάποια μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία οξειδώνονται από τη λακκάση σε ελεύθερες ρίζες, μπορούν να λειτουργήσουν σαν μεσολαβητές, οξειδώνοντας με τη σειρά τους άλλες ενώσεις, οι οποίες δεν μπορούν να οξειδωθούν απευθείας από το εν λόγω ένζυμο. Ένα παράδειγμα τέτοιων ενώσεων είναι αυτές που ανήκουν στο μη φαινολικό κλάσμα της λιγνίνης, το οποίο δεν οξειδώνεται από τις λακκάσες, αλλά τα μόρια-μεσολαβητές μπορούν να διαχυθούν σε σημεία που δεν είναι προσβάσιμα από το ένζυμο και να επιφέρουν οξειδωτικές αλλαγές στο πολυμερές. Στη φύση, οι ενώσεις που παίζουν το ρόλο των μεσολαβητών μπορεί να είναι μικρομοριακές ενώσεις που προκύπτουν από την αποικοδόμηση της ίδιας της λιγνίνης από τα οξειδωτικά ένζυμα (Camarero et al., 2005).

Οι λακκάσες εμφανίζουν μια σειρά πλεονεκτημάτων που τις καθιστούν πολύτιμα εργαλεία σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Αρχικά, εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, γεγονός που τους επιτρέπει να οξειδώνουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων πολλών ξενοβιοτικών ουσιών, όπως τα χλωριωμένα φαινολικά παράγωγα (Balcázar-López et al., 2016), συνθετικές βαφές (Nguyen et al., 2016), ζιζανιοκτόνα (Torres et al., 2003) και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Bautista et al., 2015). Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη λεύκανση του χαρτοπολτού (Singh et al., 2015) ή στην αποτοξικοποίηση αγροβιομηχανικών αποβλήτων όπως τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Ntougias et al., 2012, Ntougias et al., 2015). Ωστόσο, το χαμηλό

οξειδωτικό δυναμικό των λακκασών (450-800 mV) σε σχέση με τις αντίστοιχες λιγνινολυτικές υπεροξειδάσες (>1V) επιτρέπει μόνο την άμεση αποικοδόμηση ενώσεων χαμηλού οξειδωτικού δυναμικού και όχι των πιο ανθεκτικών αρωματικών ενώσεων, στις οποίες περιλαμβάνονται κάποιες συνθετικές βαφές και οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) (Nunes, 2018). Το ζήτημα αυτό θα μπορούσε εν μέρει να αντιμετωπιστεί με τη χρήση μορίων μεσολαβητών. Ωστόσο, η χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα δεν έχει επιτευχθεί ακόμη, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους της παραγωγής των μορίων αυτών. Η χρήση φυσικών μεσολαβητών, οι οποίοι μπορούν να απομονωθούν από φυσικά υποστρώματα όπως τα αγροβιομηχανικά απόβλητα, θα μπορούσε ενδεχομένως να αμβλύνει το πρόβλημα αυτό.

#### 1.1.6.2 Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες καταλύουν την οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων, σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι υπεροξειδάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση, μεταξύ άλλων σε φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς (Falade et al., 2016), και διαχωρίζονται ανάλογα με την ύπαρξη ή την απουσία αίμης (πρωτοπορφυρίνης IX) στο ενεργό τους κέντρο.

Οι υπεροξειδάσες της αίμης διαχωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες (Plácido and Capareda 2015). Η Τάξη I περιλαμβάνει τις ενδοκυτταρικές υπεροξειδάσες, όπως είναι η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C της ζύμης. Η Τάξη II περιλαμβάνει τις εξωκυτταρικές μυκητιακές λακκάσες, όπως είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η πολυλειτουργική υπεροξειδάση, οι οποίες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, ενώ η Τάξη III περιλαμβάνει υπεροξειδάσες φυτικής προέλευσης όπως η υπεροξειδάση HRP, οι οποίες εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Οι υπεροξειδάσες της αίμης της Τάξης II αναφέρονται ως μυκητιακές ή βακτηριακές. Πρόκειται για εξωκυτταρικά ένζυμα που σχετίζονται με την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Οι υπεροξειδάσες αυτές, κυρίως οι MnP, LiP και VP οξειδώνουν συγκεκριμένα στοιχεία της δομής της λιγνίνης και μπορούν να δράσουν συνεργατικά, εφόσον παράγονται από τον ίδιο μικροοργανισμό. Η MnP οξειδώνει τις φαινολικές ενώσεις της λιγνίνης, η LiP στοχεύει στο

μη-φαινολικό κομμάτι της λιγνίνης, ενώ η VP έχει την ικανότητα να οξειδώνει τόσο τις φαινολικές, όσο και τις μη φαινολικές ενώσεις.

#### 1.1.6.3 Υπεροξειδάσες της λιγνίνης

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiPs) διαθέτουν υψηλό οξειδωτικό δυναμικό και ως εκ τούτου μπορούν να οξειδώνουν τις μη φαινολικές δομές της λιγνίνης, οι οποίες αποτελούν έως και το 90% του μακρομορίου (Kirk, 2018). Επίσης, χαρακτηρίζονται και από την ικανότητά τους να οξειδώνουν ένα ευρύ φάσμα αρωματικών ενώσεων, και έτσι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης. Ακόμη, μπορούν να οξειδώσουν και μεγάλη ποικιλία φαινολικών ουσιών (Kirk, 2018). Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP, EC 1.11.1.14, diarylpropane oxygenase) είναι μια αιμοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωτική αποδόμηση της λιγνίνης, εξαρτώμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι LiPs οξειδώνουν διαφορετικές ενώσεις-μοντέλα, αντιπροσωπευτικά της δομής της λιγνίνης, συμπεριλαμβανομένων των αρυλ-γλυκερολ-αρυλ-αιθέρων με β-O-4 δεσμούς. Η οξείδωση του υποστρώματος από τη LiP οδηγεί στη δημιουργία κατιονικής ρίζας, με αποτέλεσμα τη διάσπαση πλευρικών αλυσίδων, την απομεθυλίωση, την ενδομοριακή προσθήκη κ.α. (Kirk, 2018). Η οξείδωση από LiP μπορεί επίσης να οδηγήσει σε υδροξυλίωση βενζολικών μεθυλομάδων, οξείδωση των βενζυλ-αλκοολών στις αντίστοιχες κετόνες και οξείδωση φαινολών (Paliwal et al., 2012). Εκτός από την οξείδωση των μη φαινολικών υποστρωμάτων, η LiP μπορεί να οξειδώσει και μια ποικιλία φαινολικών υποστρωμάτων, όπως N-υποκατεστημένες ανιλίνες (Kirk, 2018). Τα φαινολικά υποστρώματα που μπορεί να οξειδώσει η LiP περιλαμβάνουν τη γουαϊακόλη, την ακετοσυρινγκόνη, την κατεχόλη, τη βανιλλυλ-αλκοόλη και το συρινγκικό οξύ (Wong, 2009). Ωστόσο, το κλασικό της υπόστρωμα είναι η βερατρυλική αλκοόλη, ένα υψηλού οξειδωτικού δυναμικού, μη φαινολικό μόριο, το οποίο έχει προταθεί ότι παίζει το ρόλο του μεσολαβητή κατά την αποικοδόμηση της λιγνίνης, με στόχο την ενίσχυση της οξειδωτικής ικανότητας των LiPs (Houtman et al., 2018)

#### 1.1.6.4 Υπεροξειδάσες του μαγγανίου

Η παραγωγή υπεροξειδασών του μαγγανίου μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί μόνο για βασιδιομύκητες λευκής σήψης. Οι μύκητες αυτοί συνήθως παράγουν πολλαπλά ισοένζυμα με ενεργότητα MnP (Hattaka, 1994, 2001) Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν κυρίως στα ισοηλεκτρικά σημεία τους, τα οποία συνήθως είναι όξινα και κυμαίνονται γύρω στο 3-4,

αν και έχουν βρεθεί και ένζυμα με λιγότερο όξινα, έως και ουδέτερα ισοηλεκτρικά σημεία (Hattaka 1994, 2001)

Ο καταλυτικός κύκλος των MnPs μοιάζει με αυτόν των άλλων υπεροξειδασών αίμης, αλλά σε αντίθεση με αυτές περιλαμβάνει  $Mn^{2+}$ , το οποίο παίζει το ρόλο του υποστρώματος. Ο κύκλος ξεκινά με την πρόσδεση του  $H_2O_2$  ή ενός οργανικού υπεροξειδίου στο ένζυμο και τη δημιουργία ενός συμπλόκου σιδήρου-υπεροξειδίου. Η διάσπαση του δεσμού οξυγόνου-οξυγόνου του υπεροξειδίου απαιτεί μια μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από την αίμη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της Ένωσης I της MnP, δηλαδή ενός συμπλόκου  $Fe^{4+}$ -οξο-πορφυρινικής ρίζας. Κατόπιν, ο δεσμός οξυγόνου-οξυγόνου διασπάται και απελευθερώνεται ένα μόριο νερού. Η αναγωγή πραγματοποιείται μέσω της Ένωσης II της MnP (σύμπλοκο  $Fe^{4+}$ -οξο-πορφυρίνης). Ένα ιόν  $Mn^{2+}$ , το οποίο οξειδώνεται σε  $Mn^{3+}$ , λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων για αυτό το πορφυρινικό ενδιάμεσο. Η αναγέννηση του ενζύμου επιτυγχάνεται με την οξείδωση ενός ακόμη μορίου  $Mn^{2+}$  σε  $Mn^{3+}$  και την απελευθέρωση ενός ακόμη μορίου νερού. Ενώ η Ένωση I της MnP μοιάζει με αυτήν της LiP και άλλων υπεροξειδασών και μπορεί να αναχθεί, εκτός από το  $Mn^{2+}$  και από άλλες φαινολικές ενώσεις, η Ένωση II ανάγεται πολύ αργά με τα άλλα υποστρώματα εκτός του  $Mn^{2+}$ , ενώ η παρουσία του είναι απαραίτητη για να ολοκληρωθεί ο καταλυτικός κύκλος (Kirk, 2018). Το  $Mn^{3+}$  που σχηματίζεται σταθεροποιείται από οργανικά οξέα όπως είναι το οξικό οξύ, το οποίο με τη σειρά του λειτουργεί σαν ένας μικρομοριακός, διαχεόμενος μεσολαβητής, που μπορεί να οξειδώσει οργανικές ενώσεις μη-ειδικά, μέσω απόσπασης υδρογόνου και ενός ηλεκτρονίου (Hattaka, 2001). Οι ενώσεις του  $Mn^{3+}$  με καρβοξυλικά οξέα όπως το οξικό, το μαλονικό, το μηλικό, το τρυγικό και το γαλακτικό, μπορούν να προκαλέσουν την οξείδωση διαφόρων υποστρωμάτων (Hattaka, 2001). Οι φαινολικές και αμινο-αρωματικές ενώσεις οξειδώνονται με αφαίρεση ενός υδρογόνου προς τις αντίστοιχες ρίζες (Wariishi et al., 1989, 1992). Κάποιες μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό μπορούν επίσης να οξειδωθούν, όπως το τετραμεθοξυβενζένιο ή το ανθρακένιο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των αντίστοιχων κατιονικών άρυλ-ριζών (Sack et al., 1997). Όμως, η MnP είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε υψηλές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αντιστρεπτή απενεργοποίηση του ενζύμου, μέσω του σχηματισμού της Ένωσης III, μια οξειδωτική κατάσταση που είναι καταλυτικά ανενεργή (Wariishi et al., 1989).

Οι MnPs θεωρούνται κυρίως λιγνινολυτικά ένζυμα επειδή το  $Mn^{3+}$  που παράγεται ως προϊόν της δράσης τους μπορεί να οξειδώσει διάφορες μονομερείς και διμερείς φαινόλες, συμπεριλαμβανομένων μορίων-μοντέλων της δομής της λιγνίνης. Η αντίδραση της MnP του

*P. chrysosporium* με το  $Mn^{2+}$ , το  $H_2O_2$  και το μαλονικό νάτριο βρέθηκε ότι μπορεί να οδηγήσει σε διασπάσεις δεσμών  $C_{\alpha}-C_{\beta}$ , οξείδωση  $C_{\alpha}$  και διάσπαση των δεσμών των φαινολικών συρινγκυλ- ομάδων της λιγνίνης (Wariishi et al., 1989). Επίσης, έχει επιτευχθεί η διάσπαση τεσσάρων διαφορετικών συνθετικών μορίων λιγνίνης με τη χρήση του ίδιου ενζύμου και με προσθήκη μαλονικού οξέος ως μεσολαβητή (Hofrichter, 2002).

**Πίνακας 1.1.2. Ένζυμα που παράγονται από λιγνοκυτταρινολυτικούς μύκητες σε υποστρώματα αποτελούμενα από διάφορα γεωργικά και δασικά παραπροϊόντα.**

Είδος	Κλάση	Τύπος σήψης	Υπόστρωμα	Ένζυμα	Πηγή
<i>Aspergillus niger</i>	Ascomycota	Φαιά	Υπολείμματα σακχαροκάλαμου	Ξυλανάσες, κυτταρινάσες	Aguiar (2001), Hasan (2000), Keon and Waksman (1990). Park et al. (2002)
<i>Bjerkandera adusta</i>	Basidiomycota	Λευκή	Ξύλο, καλαμπόκι και κομποστοποιημένο άχυρο σίτου	MnP, LiP	Kimura et al. (1991), Quintero et al. (2006), Romero et al. (2007),
<i>Clonostachys rosea</i>	Ascomycota	Λευκή	Φύλλα φυτών του γένους Aster, υπολείμματα φυτών βρώμης και καλαμποκιού	Ενδοπολυγαλακτορουνάσες, γαλακτοσιδάση, ενδο-ξυλανάση, κυτταρινάσες, ακέτυλοεστεράση, ξυλοσιδάση, αραβινοφουρανοσιδάση	Mikan and Castellanos (2004), Rezácová et al. (2006).
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomycota	Φαιά	Φύλλα φυτών του γένους Aster, υπολείμματα φυτών βρώμης και καλαμποκιού	Ενδοπολυγαλακτορουνάσες, γαλακτοσιδάση,	Mikan and Castellanos (2004)
<i>Fusarium merismoides</i>	Ascomycota	Φαιά	Φύλλα φυτών του γένους Aster, υπολείμματα φυτών βρώμης και καλαμποκιού	ενδο-ξυλανάση, κυτταρινάσες, ακέτυλοεστεράση, ξυλοσιδάση, αραβινοφουρανοσιδάση	Fernández-Martín et al. (2007)
<i>Lentinula edodes</i>	Basidiomycota	Λευκή	Μικροκρυσταλική κυτταρίνη, άχυρο, φύλλα δέντρων	Ενδο-ξυλανάσες, ενδογλουκανάσες, λακκάσες, MnP	Cai et al., 2017, Elisashvili et al., 2015
<i>Strobilurus ohshimae</i>	Basidiomycota	Λευκή	Ξύλο	LiP, MnP	Homma et al. (2007)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Basidiomycota	Λευκή	Ξύλο, σπέρματα σταφυλιού και άλευρο βρώμης	LiP, MnP	Kersten and Cullen (2007), Rodríguez et al. (1997),



<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomycota	Λευκή	Ξύλο, καλαμπόκι και κομποστοποιημένο άχυρο σίτου	Lac	Quintero et al. (2006). Dumonceaux et al. (2001), Márquez et al. (2007), Moredo et al. (2003)
			Ξύλο, σπέρματα σταφυλιού και άλευρο βρώμης	Lac, ξυλανάσες, MnP, κελλοβιόζη, αφυδρογονάση	
			Υπολείμματα σακχαροκάλαμου	Lac, MnP, οξειδάση της γλυκόζης, οξειδάση της γλυοξάλης, κελλοβιόζη, οξειδορεδοκτάση της κινόνης	Tong et al. (2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomycota	Λευκή	Άχυρο καλαμποκιού	Ξυλανάσες, κυτταρινάσες, MnP	Márquez et al. (2007), Okamoto et al. (2002)
<i>P. ostreatus, P. pulmonarius</i>	Basidiomycota	Λευκή	Υπολείμματα καφέ, διάφορα αγριόχορτα (ζιζάνια), άχυρο σίτου, ίνες βαμβακιού	Ενδογλουκανάση, κελλοβιο-υδρολάση, Lac, MnP	Delfin and Duran de Bazúa (2003), Marnyye et al. (2002), Okamoto et al. (2002)
<i>Penicillium</i> sp.	Ascomycota	Λευκή	Φύλλα φυτών του γένους <i>Aster</i> , υπολείμματα φυτών βρώμης και καλαμποκιού	Ενδοξυλανάση, κυτταρινάσες, αραβινοφουρανοσιδάση, ακέτυλοεστεράση, ξυλοσιδάση	Mikan and Castellanos (2004)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Basidiomycota	Λευκή	Ξύλο κωνοφόρων	Lac, Lip, MnP	Eggert et al. (1996a,b), Geng and Li (2002),
<i>Xylaria hyoxyylon, X. polymorpha</i>	Ascomycota	Λευκή	Ξύλο	Lac, ενδογλουκανάση, γλυκοσιδάση, εστεράση ξυλανάση	Liers et al. (2006).
<i>Fomitopsis palustris</i>	Basidiomycota	Φαιά	Ξύλο, Μικροκρυσταλική κυτταρίνη	Κυτταρινάσες (εξωγλουκανάσες, ενδογλουκανάσες, β-γλυκοσιδάσες)	Yoon et al. (2007).

### 1.1.7 Βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

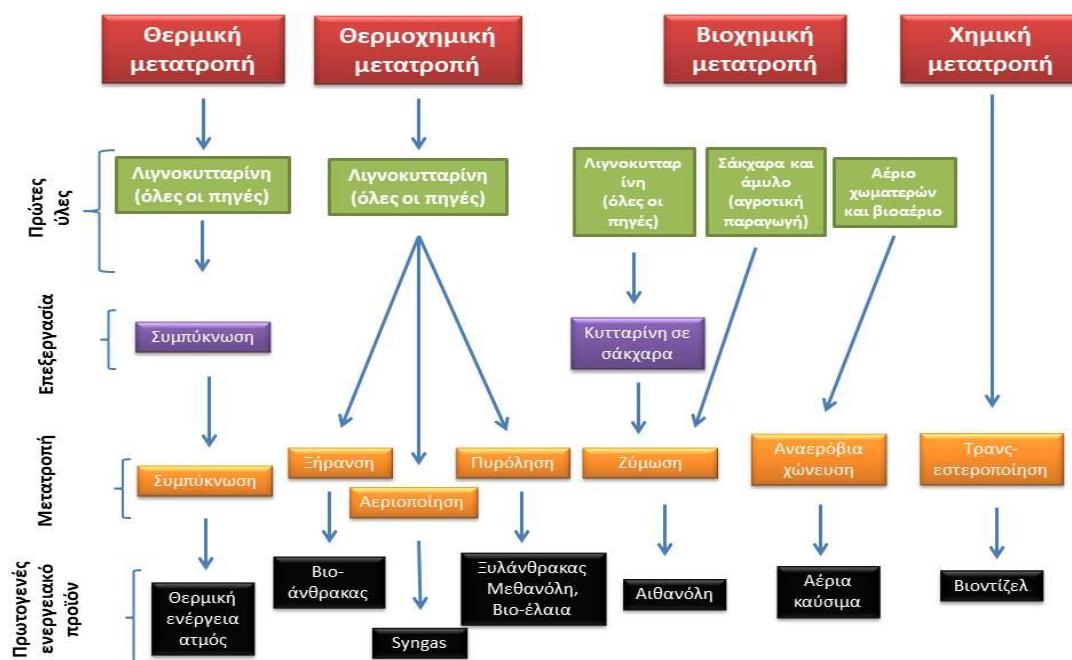
Όπως προαναφέρθηκε η βιομετατροπή των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων σε προϊόντα με μεγαλύτερη αξία συνήθως προϋποθέτει μια σειρά διαδικασιών στα οποία περιλαμβάνονται:

- i. προεπεξεργασία (μηχανική, χημική ή βιολογική)
- ii. υδρόλυση των πολυμερών για την παραγωγή άμεσα μεταβολιζόμενων μορίων (σάκχαρα)
- iii. χρήση των παραπάνω μορίων για την ενίσχυση της μικροβιακής ανάπτυξης ή την παραγωγή χημικών προϊόντων και
- iv. διαχωρισμό και καθαρισμό (Sun and Cheng, 2005).

Μέχρι σήμερα πολλές χρήσεις έχουν προταθεί για την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων παραπροϊόντων. Μεταξύ αυτών η παραγωγή βιοαιθανόλης, χαρτιού, ζωοτροφών και υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών είναι αυτές που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή, ενώ λιγότερο ανεπτυγμένες ή σε πειραματικό στάδιο βρίσκονται διεργασίες όπως η παραγωγή ενζύμων, αντιβιοτικών κ.α. (Εικόνα 1.1.8.).

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα ερευνών έχει εστιάσει στην ανάπτυξη διαδικασιών παραγωγής εναλλακτικών καυσίμων με τη χρήση βιολογικών μεθόδων, λόγω του σημαντικού περιβαλλοντικού αντίκτυπου των βιοκαυσίμων. Η αιθανόλη, χρησιμοποιείται ή ως χημική πρώτη ύλη είτε ως πρόσθετο στη βενζίνη. Τα μαλακά ξύλα -ως η κύρια πηγή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων στο βόρειο ημισφαίριο- έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης στη Σουηδία, τον Καναδά και τις Η.Π.Α. (Galbe et al., 2005). Η χρήση της βιοαιθανόλης ως καύσιμο μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη μείωση των αερίων του θερμοκηπίου και να βελτιώσει την ποιότητα του αέρα, ενώ παράλληλα προσφέρει στρατηγικά και οικονομικά πλεονεκτήματα (Moiser et al., 2005). Στη Βραζιλία και τις Η.Π.Α. παράγεται μεγάλη ποσότητα αιθανόλης από την ζύμωση χυμού ζαχαροκάλαμου και άμυλου καλαμποκιού αντίστοιχα. Στις Η.Π.Α. η αιθανόλη προστίθεται ως βελτιωτικό στη βενζίνη (σε ποσοστό μέχρι και 20%) ήδη από τις αρχές του 1980 (Sun and Cheng, 2002). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες το κόστος της βιολογικής μετατροπής της κυτταρίνης σε αιθανόλη έχει μειωθεί κατά πολύ, συμβάλλοντας σημαντικά στη διάδοση της παραγωγής της.

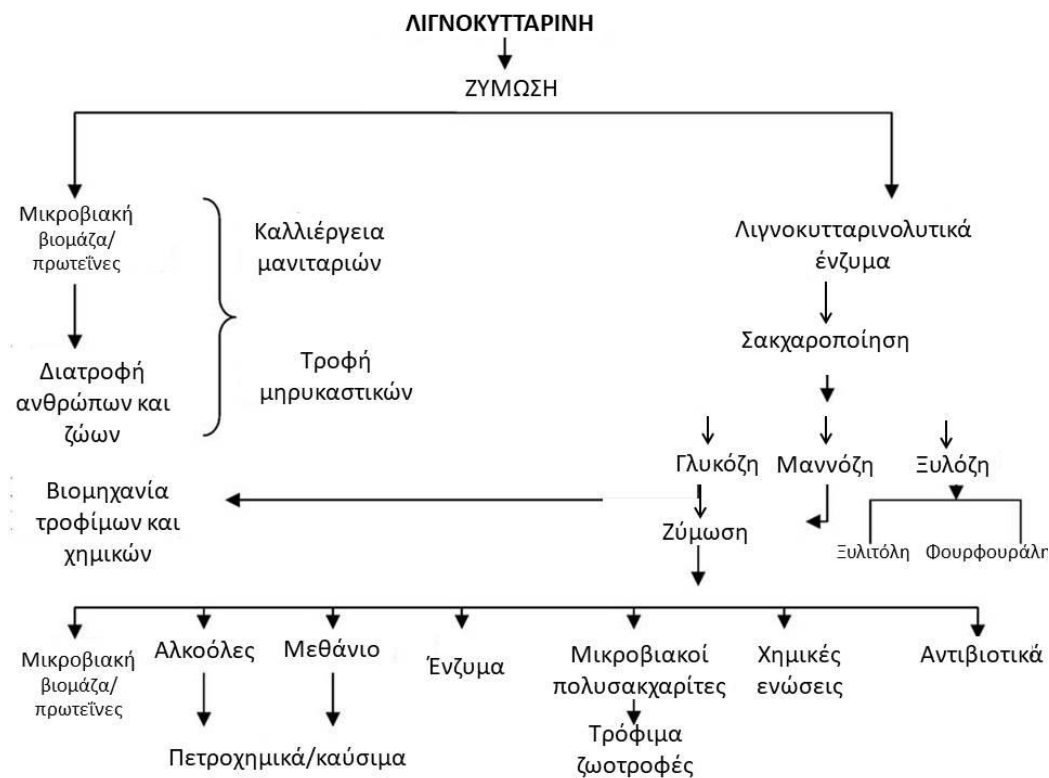
Η πυρόλυση είναι μια διαδικασία κατά την οποία η φυτική βιομάζα αποδομείται θερμικά απουσία αέρα/οξυγόνου. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή στερεών (κάρβουνο), υγρών (πίσσας και άλλων οργανικών) και αέριων προϊόντων τα οποία μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές πηγές ενέργειας μέσω της αξιοποίησης λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Η μελέτη της πυρόλυσης αποκτά αυξανόμενη σημασία και εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες ανανεώσιμες και συμβατικές πηγές ενέργειας (Babu, 2008). Στη διαδικασία αεριοποίησης, η βιομάζα θερμαίνεται υπό κατάλληλες συνθήκες και παράγεται εύφλεκτο αέριο. Το βιοαέριο αυτό μπορεί περαιτέρω να καθαριστεί για την αποβολή δύστροπων χημικών ενώσεων και να χρησιμοποιηθεί σε πιο αποδοτικά συστήματα παραγωγής ενέργειας, τα οποία συνδυάζουν τουρμπίνες αερίου και ατμού για την παραγωγή ηλεκτρισμού.



Εικόνα 1.1.8. Επισκόπηση της μετατροπής λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων σε ενέργεια (ΠΗΓΗ: UNF Bioenergy, 2006).

Η αναερόβια χώνευση είναι μια διαδικασία που πλέον εφαρμόζεται ευρέως για την επεξεργασία και ανακύκλωση νωπών οργανικών υπολειμμάτων και υγρών αποβλήτων. Αποτελεί μια διεργασία χώνευσης κατά την οποία η οργανική ύλη μετατρέπεται σε βιοαέριο το οποίο αποτελείται κυρίως από μεθάνιο (περίπου 60%) και διοξείδιο του άνθρακα (περίπου 40%). Το μεθάνιο μετά από κατάλληλη επεξεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη οικιακών αναγκών ή δευτερογενώς σε μηχανές εσωτερικής καύσης για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας (UN Foundation Report, 2008).

Πέραν της παραγωγής καυσίμων, ένας μεγάλος αριθμός υψηλής προστιθέμενης αξίας βιοπροϊόντων, όπως τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα, οι βιταμίνες και πληθώρα βακτηριακών και μυκητιακών πολυσακχαριτών όπως οι ξανθάνες, παράγονται μέσω διαδικασίας ζύμωσης χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως βασικό υπόστρωμα αλλά -θεωρητικά- τα ίδια προϊόντα θα μπορούσαν να παράγονται από λιγνοκυτταρινούχα παραπροϊόντα (Εικόνα 1.1.9).



**Εικόνα 1.1.9. Γενικευμένα στάδια της βιομετατροπής λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων (ΠΗΓΗ: Sánchez, 2009, τροποποιημένη)**

Επιπλέον, πολλοί μικροοργανισμοί μετατρέπουν την κυτταρίνη και άλλους φυτικούς υδατάνθρακες σε μεγάλες ποσότητες οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέος, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν από οικόσιτα ζώα ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (Ezeji et al., 2006, Martin et al., 2006). Οι εν λόγω μικροοργανισμοί είναι πολλά υποσχόμενοι όσον αφορά την εμπορική τους αξιοποίηση για την αναερόβια επεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.

Τέλος η καλλιέργεια μανιταριών με τη χρήση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων που αποτέλεσε και αντικείμενο έρευνας της παρούσας διατριβής, αποτελεί μια διαδικασία δημιουργίας προϊόντων προστιθέμενης αξίας, η οποία οδηγεί στην παραγωγή τροφίμων με ιδιαίτερα διατροφικά χαρακτηριστικά. Μάλιστα, συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο αποδοτικές μεθόδους μέσω της οποίας τα εν λόγω παραπροϊόντα δύναται να ανακυκλωθούν-αξιοποιηθούν (Ingale et al., 2010, Zervakis et al., 1996).

## 1.2 Παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας

### 1.2.1 Γενικά

Η καλλιέργεια της ελιάς για την παραγωγή ελαιόλαδου, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αγροτικές δραστηριότητες στις χώρες της Μεσογείου. Η κύρια παραγωγός χώρα ελαιόλαδου είναι η Ισπανία, ακολουθούμενη από την Ιταλία, την Ελλάδα, την Τουρκία, τη Συρία και την Τυνησία. Το 30% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής προέρχεται από την Ανδαλουσία (Ν. Ισπανία), ενώ και σε άλλες περιοχές την νότιας Ευρώπης όπως η Κρήτη και η Σικελία γίνεται εντατική καλλιέργεια της ελιάς. Τα τελευταία χρόνια, η καλλιέργεια της ελιάς διαδίδεται ραγδαίως και σε περιοχές εκτός της ευρωπαϊκής ηπείρου όπως η Αργεντινή, η Αυστραλία, η Νότιος Αφρική και η Καλιφόρνια. Η αύξηση των καλλιεργούμενων με ελαιόδεντρα εκτάσεων, σε συνδυασμό με την εντατικοποίηση της καλλιέργειας, έχουν σαν αποτέλεσμα η παγκόσμια παραγόμενη ποσότητα ελαιόλαδου να βαίνει συνεχώς αυξανόμενη.

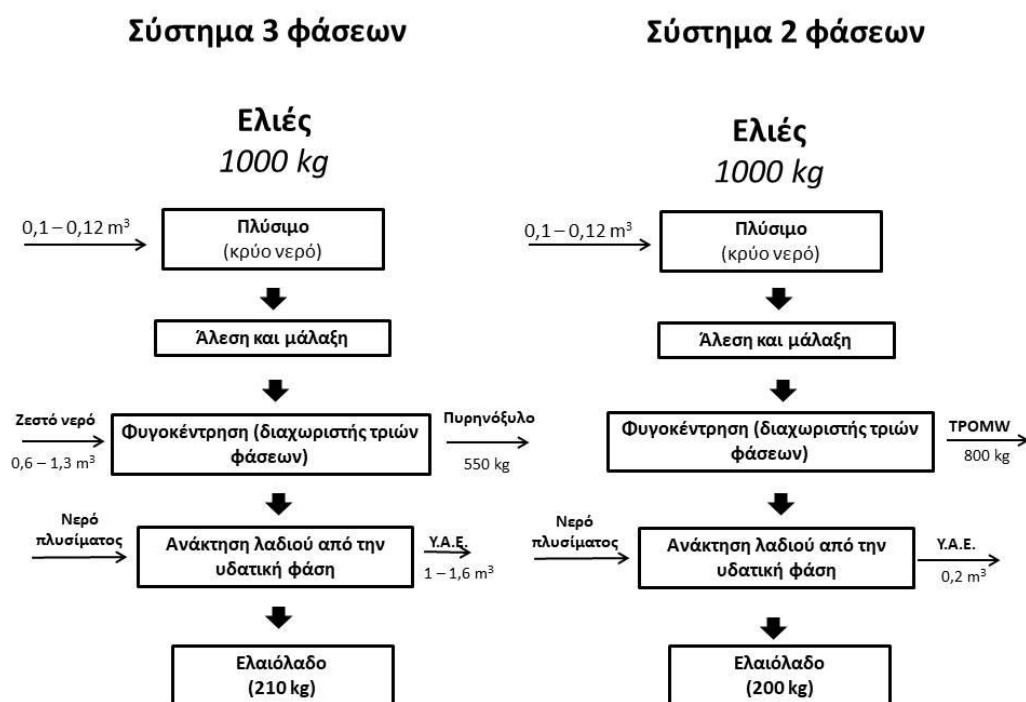
Η εξαγωγή του ελαιόλαδου όμως, συνεπάγεται την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων αποβλήτων, τα οποία ασκούν αρνητική επίδραση σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους. Σε πολλές έρευνες έχουν αποδειχθεί οι αρνητικές συνέπειες των εν λόγω αποβλήτων σε χερσαίους μικροοργανισμούς και φυτά (Karrouzas et al., 2010, Saadi et al., 2007), υδάτινους αποδέκτες (Goldfarb et al., 2016), καθώς επίσης και στην ποιότητα του αέρα (Nasini, 2015). Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη για τη θέσπιση κατευθυντήριων οδηγιών για τη διαχείριση των παραπάνω αποβλήτων ώστε να ελαχιστοποιούνται οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις και να γίνεται βιώσιμη χρήση των διαθέσιμων πόρων.

Για πολλά χρόνια, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) αποτελούσαν το πιο ρυπογόνο παραπροϊόν της ελαιουργικής διαδικασίας στην περιοχή της Μεσογείου. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να προσελκύσουν το ερευνητικό ενδιαφέρον και να προταθούν διάφορες προσεγγίσεις για την διαχείριση/επεξεργασία τους. Ωστόσο, τα τελευταία 25 χρόνια, η υιοθέτηση ενός νέου συστήματος εξαγωγής (τεχνολογία 2 φάσεων) είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ημίρρευστου αποβλήτου γνωστό ως «απόβλητο ελαιοτριβείων δύο φάσεων» (“two phase olive mill waste, ΤΡΟΜΩ”) με ιδιαίτερα διαχειριστικά προβλήματα. Εκτός αυτών, οι καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή του ελαιόκαρπου οδηγούν σε πολύ μεγάλη συσσώρευση φυτικής βιομάζας (φύλλα ελιάς, υπολείμματα κλαδέματος

ελαιόδεντρων) τα οποία χρήζουν με τη σειρά τους ιδιαίτερης διαχείρισης για να αποφευχθεί η καύση και η ανεξέλεγκτη διάθεση στο περιβάλλον.

## 1.2.2 Συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου και παραγόμενα απόβλητα

Η εξαγωγή του ελαιολάδου, περιλαμβάνει διάφορα στάδια μεταξύ των οποίων πλύσιμο, σύνθλιψη, μάλαξη και τέλος διαχωρισμό. Η ποσότητα και τα φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή. Οι δύο βασικές μέθοδοι εξαγωγής περιλαμβάνουν την πίεση (πρέσες-πιεστήρια), η οποία ακολουθήθηκε για πολλούς αιώνες με μικρές τροποποιήσεις και την φυγοκεντρική η οποία επικράτησε τις τελευταίες δεκαετίες. Στην τελευταία περιλαμβάνονται συστήματα τριών και δύο φάσεων (Εικόνα 1.2.1).



Εικόνα 1.2.1. Στάδια των συστημάτων εξαγωγής ελαιολάδου 3 και 2 φάσεων (ΠΗΓΗ: Alburquerque et al., 2004).

Συνήθως ο πυρήνας που παράγεται από τα ελαιοτριβεία 3 φάσεων οδηγείται για ξήρανση και την εξαγωγή πυρηνελαίου με οργανικούς διαλύτες. Όταν όμως έγινε προσπάθεια για να υιοθετηθεί η ίδια πρακτική και για τα απόβλητα των ελαιοτριβείων δύο φάσεων, εμφανίστηκαν σημαντικές δυσκολίες λόγω της υψηλής υγρασίας τους και των περιεχόμενων υδατανθράκων. Επιπλέον, η υψηλή θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για τη ξήρανση σε σχέση με αυτή του ελαιοπυρήνα, επηρεάζει τη σύσταση του υλικού και τελικά

την ποιότητα του πυρηνελαίου. Στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας, διαπιστώθηκε ότι τα βενζοπυρένια που περιέχονται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο πυρηνέλαιο που παράγεται από ΤΡΟΜΩ, είναι τοξικά για τον άνθρωπο (καρκινογενείς ενώσεις, Zhang et al., 2016). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την κατακόρυφη μείωση της ζήτησης του παραπάνω προϊόντος με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες να παραμένουν ανεκμετάλλευτες. Έτσι η ανάγκη για εύρεση ορθών πρακτικών διαχείρισης του παραπάνω αποβλήτου, γίνεται πιο επιτακτική από ποτέ.

### 1.2.3 Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων – Προτεινόμενοι μέθοδοι αξιοποίησης

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) αποτελούν τον κύριο παράγοντα ρύπανσης των ελαιοτριβείων 3 φάσεων και των παραδοσιακών ελαιοτριβείων. Αποτελούνται από το νερό που περιέχεται στον ελαιόκαρπο και αυτό που προστίθεται στα διάφορα στάδια της εξαγωγής (Εικόνα 1.2.1). Η σύσταση του εμφανίζει έντονες διακυμάνσεις επηρεαζόμενη από τις καλλιεργητικές τεχνικές, την εποχή συγκομιδής και κυρίως από την τεχνολογία που ακολουθείται κατά την εξαγωγή (Ntougias et al. 2013).

Τα κύρια χαρακτηριστικά των Υ.Α.Ε. είναι η παρουσία οργανικών ενώσεων όπως τα οργανικά οξέα, τα λίπη, οι αλκοόλες και οι πολυφαινόλες, τα οποία το καθιστούν ιδιαίτερα φυτοτοξικό όταν δεν υπόκειται σε καμία επεξεργασία πριν τη διάθεση του στο περιβάλλον. Ωστόσο αποτελούν και πηγή πολύτιμων στοιχείων (π.χ. κάλιο), τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν για τη λίπανση του εδάφους. Στον Πίνακα 1.2.1. παρουσιάζονται τα κύρια χαρακτηριστικά των Υ.Α.Ε. όπως μελετήθηκαν από διάφορους συγγραφείς.

Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί πολλές διαδικασίες για την επεξεργασία ή/και την αξιοποίηση των Υ.Α.Ε. Οι περισσότερες από αυτές περιγράφονται στη συνέχεια και εστιάζουν στη μείωση της φυτοτοξικότητας ώστε να εφαρμοστούν σε γεωργικές καλλιέργειες, ενώ έχουν αναδειχθεί και καινοτόμες διαδικασίες με γνώμονα την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.



**Πίνακας 1.2.1. Σύγκριση των κύριων χημικών χαρακτηριστικών σε διαφορετικά δείγματα Υ.Α.Ε.**

Βιβλιογραφία Παράμετρος	1	2	3	4	5	6	7	8
Ξηρά ουσία	6,35	7,1	δ.π.	δ.π.	7,19	6,33	δ.π.	δ.π.
pH	4,8	4,93	4,8	δ.π.	5,17	5,00	4,2	5,0
EC (dS/m)	12,0	7,3	δ.π.	10,0	5,50	δ.π.	7,0	δ.π.
OM (g/l)	57,4	-δ.π.	62,1	δ.π.	46,5	57,2	δ.π.	δ.π.
TOC (g/l)	39,8	δ.π.	δ.π.	δ.π.	34,2	δ.π.	δ.π.	δ.π.
TN (g/l)	0,76	0,62	0,79	δ.π.	0,63	0,86	2,1	δ.π.
P <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/l)	0,53	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0,31	0,61	0,7	0,7
K <sub>2</sub> O (g/l)	2,37	δ.π.	δ.π.	2,9	4,46	δ.π.	3,5	10,8
Na (g/l)	2,37	δ.π.	δ.π.	0,2	0,11	δ.π.	δ.π.	0,42
Ca (g/l)	0,27	δ.π.	δ.π.	0,2	0,30	δ.π.	δ.π.	0,64
Mg (mg/l)	44	δ.π.	δ.π.	92	129	δ.π.	δ.π.	220
Fe (mg/l)	120	δ.π.	δ.π.	18,3	68,5	δ.π.	δ.π.	120
Cu (mg/l)	6	δ.π.	δ.π.	2,1	1,5	δ.π.	δ.π.	3
Mn (mg/l)	12	δ.π.	δ.π.	1,5	1,1	δ.π.	δ.π.	6
Zn (mg/l)	12	δ.π.	δ.π.	2,4	4,1	δ.π.	δ.π.	6
d (g/cm <sup>3</sup> )	1,048	δ.π.	δ.π.	δ.π.	1,02	1,048	δ.π.	δ.π.
Λιπαρά (g/l)	1,64	8,6	12,2	δ.π.	3,1	δ.π.	δ.π.	δ.π.
Πολυφαινόλες (g/l)	10,7	0,98	3,8	δ.π.	1,6	δ.π.	7,8	δ.π.
Υδατάνθρακες (g/l)	16,1	4,8	4,7	δ.π.	8,79	δ.π.	1,4	δ.π.
COD (g/l)	93	67	103	178	δ.π.	130	177	δ.π.
BOD <sup>5</sup> (g/l)	46	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	55	94	δ.π.

δ.π. δεν προσδιορίστηκε. (1) Baeta-Hall et al. (2005), (2) Alburquerque et al. (2004), (3) Vlyssides et al. (2004), (4) Cayuela (2004), (5) Saviozzi et al. (2001) (6) Cegarra et al. (2000), (7) Ordon et al. (1999), (8) Madejon et al. (1998).

### 1.2.3.1 Εξάτμιση

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος επεξεργασίας των Υ.Α.Ε. είναι η εξάτμιση η οποία επιτυγχάνεται σε ανοιχτές λιμνο-δεξαμενές, λόγω της χαμηλής επένδυσης που απαιτείται και των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών στην περιοχή της Μεσογείου. Ωστόσο, η πρακτική αυτή, απαιτεί μεγάλες εκτάσεις και οδηγεί σε σειρά προβλημάτων όπως η έκλυση δυσάρεστων οσμών, η διείσδυση των Υ.Α.Ε. στο έδαφος και η προσέλκυση εντόμων. Το στερεό υπόλειμμα-ίζημα που απομένει στον πυθμένα των λιμνοδεξαμενών συνήθως εναποτίθεται σε χέρσα εδάφη, αλλά θα μπορούσε να εφαρμοστεί -υπό προϋποθέσεις- και σε καλλιεργούμενες εκτάσεις ώστε να αξιοποιηθεί η υψηλή περιεκτικότητα του σε οργανική ουσία και σε ανόργανες ενώσεις. Οι περισσότερες έρευνες για τη διαχείριση του εν λόγω ιζήματος εστιάζουν καταρχήν στη μείωση της τοξικότητας του μέσω διαδικασιών κομποστοποίησης. Οι Paredes et al. (2002) κομποστοποίησαν το εν λόγω υλικό μαζί με άχυρο καλαμποκιού και υπολείμματα βάμβακος και συμπέραναν ότι μπορεί να παραχθεί ένα φιλικό προς το περιβάλλον προϊόν. Οι Vitolo et al. (1999) πρότειναν την παραγωγή καυσίμου μετά την μίξη της λάσπης με τον ελαιοπυρήνα. Τέλος, έχει δοκιμαστεί με επιτυχία η

αξιοποίηση του παραπάνω υλικού ως πρόσθετο για την ανάπτυξη δομικών υλικών σε εργαστηριακή κλίμακα (Hytiris et al., 2004).

### 1.2.3.2 Απευθείας εφαρμογή στο έδαφος

Αρκετές έρευνες έχουν εστιάσει στην απευθείας εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στο έδαφος και στην αξιολόγηση της επίδρασης του ως οργανικό λίπασμα με αντικρουόμενα μέχρι στιγμής αποτελέσματα. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου, συγκαταλέγονται η προσθήκη θρεπτικών (κυρίως Κ) και η δυνατότητα κινητοποίησης των εδαφικών ιόντων, ενώ οι αρνητικές συνέπειες σχετίζονται με την υψηλή συγκέντρωση μεταλλικών αλάτων, το χαμηλό pH και την παρουσία φυτοτοξικών ενώσεων (κυρίως πολυφαινολών) (Hmid et al., 2015). Οι Rinaldi et al. (2003) εφάρμοσαν Υ.Α.Ε. χωρίς καμία προεπεξεργασία για τρεις συνεχείς χρονιές σε καλλιέργεια σιταριού και παρατήρησαν την εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα, χωρίς όμως να επηρεάζεται η παραγωγή και η απόδοση του σπόρου. Η εφαρμογή ΥΑΕ σε καλλιέργειες καλαμποκιού είχε σαν αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης των θρεπτικών (N, K και P) καθώς και των υδατοδιαλυτών φαινολικών στο επιφανειακό στρώμα του εδάφους. Παρόλα αυτά, όχι μόνο δεν εμφανίστηκαν φαινόμενα τοξικότητας αλλά η ανάπτυξη των φυτών ευνοήθηκε αποδεικνύοντας την ανθεκτικότητα των φυτών καλαμποκιού στην εφαρμογή συγκεκριμένων δοσολογιών Υ.Α.Ε. (Belakziz et al., 2016) Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα Υ.Α.Ε. μειώνουν την κινητικότητα διάφορων οργανικών ενώσεων στο έδαφος, όπως τα φυτοφάρμακα σε καλλιεργούμενα εδάφη (Gámiz et al., 2016). Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των Υ.Α.Ε. είναι η αντιμικροβιακή τους δράση, η οποία δύναται να αξιοποιηθεί εναντίον φυτοπαθογόνων όπως το *Rhizoctonia solani* (El-Abbassi et al., 2017). Έτσι, η εφαρμογή τους πριν τη φύτευση θα μπορούσε ενδεχομένως να βοηθήσει στην αντιμετώπιση ασθενειών από εδαφογενείς μικροοργανισμούς.

### 1.2.3.3 Φυσικοχημική επεξεργασία

Η φυσικοχημική επεξεργασία συνίσταται στην προσθήκη χημικών ενώσεων οι οποίες βοηθούν την κροκίδωση, την κατακρήμνιση ή την διάλυση των περιεχόμενων οργανικών ενώσεων. Ήδη από το 1989 έχει προταθεί η προσθήκη  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  και  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  για τη μείωση του COD κατά 20-30% από την αρχική συγκέντρωση (Tsonis et al., 1989). Οι Aktas et al. (2001) πρότειναν την προεπεξεργασία με άσβεστο για τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου, η οποία είναι εύκολα διαθέσιμη και πιο οικονομική από άλλες ενώσεις. Τελευταία, πολλές εταιρίες

υιοθέτησαν την κροκίδωση της οργανικής ουσίας των Υ.Α.Ε. μέσω της χρήσης ενός εμπορικά διαθέσιμου οργανικού πολυηλεκτρολύτη. Μέσω της προαναφερθείσας διαδικασίας παράγεται νερό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άρδευση και μια ιλύς η οποία είναι γνωστή ως το στερεό κλάσμα των Υ.Α.Ε. Το τελευταίο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συγκομποστοποιηθεί επιτυχώς με άλλα αγροτικά παραπροϊόντα (Gallioy et al., 2018, Rigane et al., 2015,).

## 1.2.4 Βιοτεχνολογικές μετατροπές υγρών αποβλήτων ελαιотριβείου

### 1.2.4.1 Αποτοξικοποίηση με τη χρήση μικροοργανισμών

Πολλοί ερευνητές έχουν επιτυχώς εφαρμόσει τη χρήση μικροοργανισμών για την επεξεργασία Υ.Α.Ε και την ταυτόχρονη παραγωγή βιοπολυμερών όπως η ξανθάνη (Lopez and Ramos-Cormenzana, 1996) και η πουλλουλάνη (Oğuzhan and Yangilar, 2013). Η αερόβια επεξεργασία για τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου έχει επίσης εφαρμοστεί επιτυχώς στο παρελθόν και εστιάζει κυρίως στη μείωση των φαινολικών τα οποία είναι υπεύθυνα για την υψηλή φυτοτοξικότητα. Ανάμεσα στους οργανισμούς που έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία, οι πιο διαδομένοι είναι οι *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma australe* (Hajjouji et al., 2014, Ntougias et al., 2012). Επιπροσθέτως, οι Ntougias et al., 2015 πρότειναν τη χρήση ενζύμων που παράγονται από μύκητες για την αποτοξικοποίηση των Υ.Α.Ε. Παλιότερα οι Peperidou et al. (2000) είχαν δοκιμάσει με επιτυχία τη χρήση Υ.Α.Ε. ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *Azotobacter vinelandii* και την εφαρμογή του βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου στο έδαφος ως λίπασμα. Αν και παρόμοιες τεχνικές παρουσιάζουν έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον, η μεταφορά τους σε βιομηχανικό επίπεδο συναντά συνήθως δυσεπίλυτα προβλήματα.

### 1.2.4.2 Συγκομποστοποίηση

Η συγκομποστοποίηση συνιστά την πιο διαδομένη τεχνική μετά την εξάτμιση για την ανακύκλωση των Υ.Α.Ε. και τη βιομετατροπή τους σε βελτιωτικό εδάφους. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί η εκμετάλλευση των θρεπτικών στοιχείων που περιέχει (όπως το Κ) και η προσθήκη τους στο έδαφος. Η επιτυχής συγκομποστοποίηση των Υ.Α.Ε. προϋποθέτει αρχικά, την προσρόφηση τους σε κάποιο στερεό λιγνοκυτταρινούχο υλικό. Οι Tomati et al. (1995) απέδειξαν ότι η προσρόφηση τους σε άχυρο σίτου, ακολουθούμενη από κομποστοποίηση, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ενός προϊόντος με υψηλό βαθμό

χουμοποίησης σε συνδυασμό με την απουσία φυτοτοξικών ενώσεων. Αργότερα οι Paredes et al. (2005) δοκίμασαν τη συγκομποστοποίηση με υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος ή λυματολάσπη και απέδειξαν ότι όχι μόνο δεν μειώνεται η παραγωγικότητα του εδάφους, αλλά βελτιώνονται τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά. Αξιοσημείωτες είναι ακόμη οι δοκιμές των Fernández-Hernández (2014) μέσω των οποίων διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή κομποστοποιημένων αποβλήτων ελαιοτριβείου σε ελαιώνες οδήγησε στην παραγωγή καρπών με μεγαλύτερη περιεκτικότητα ελαίου συγκριτικά με καρπούς από ελαιώνες που δέχονταν χημική λίπανση.

#### **1.2.4.3 Αναερόβια χώνευση**

Οι μέθοδοι αναερόβιας χώνευσης, εστιάζουν κυρίως στην παραγωγή ενέργειας (βιοαερίου) και την επαναχρησιμοποίηση του αποβλήτου για άρδευση (Marques, 2001). Το σημαντικότερο εμπόδιο στη συγκεκριμένη προσέγγιση είναι η αναστολή της ανάπτυξης των μεθανογενών βακτηρίων λόγω των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών και οργανικών οξέων του αποβλήτου (Gonçalves et al., 2012). Τα αποτελέσματα των Azbar et al. (2004) ενισχύουν την άποψη ότι οι αναερόβιοι αντιδραστήρες ιλύος με ανερχόμενη ροή είναι κατάλληλοι για την επεξεργασία Υ.Α.Ε. με την προϋπόθεση της αφαίρεσης σε προηγούμενο στάδιο των ανεπιθύμητων ενώσεων. Η τελευταία, μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλο βαθμό μέσω της διήθησης/καθίζησης κατά την προεπεξεργασία του Υ.Α.Ε.

Σε αρκετές περιπτώσεις έχει επίσης δοκιμαστεί η ταυτόχρονη χώνευση των ΥΑΕ με άλλα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα όπως η γλυκερόλη, η κοπριά χοίρων ή πουλερικών και η ενεργοποιημένη ιλύς αστικών αποβλήτων με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την απόδοση στην παραγωγή βιοαερίου (Astals et al., 2012, Athanasoulia et al., 2012, Khoufi et al., 2015)

#### **1.2.4.4 Εξαγωγή αξιοποιήσιμων χημικών ενώσεων**

Τα Υ.Α.Ε. περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών και φαινολικών συστατικών, τα οποία θα μπορούσαν να απορροφηθούν στη φαρμακευτική βιομηχανία και την κοσμετολογία. Μεταξύ των πιο σημαντικών ενώσεων συγκαταλέγονται η τυροσόλη, η υδροτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη και τα τερπενικά (Rahmanian et al., 2014). Οι Briante et al. (2004) ανέπτυξαν και βελτιστοποίησαν βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή

αντιοξειδωτικών ενώσεων υψηλής καθαρότητας, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε φαρμακευτικά δραστικές ενώσεις. Επιπλέον, οι Turano et al., (2002) πρότειναν την υιοθέτηση ενός ολοκληρωμένου συστήματος φυγοκέντρισης - υπερδιήθησης το οποίο επιτρέπει την απομάκρυνση των ρυπογόνων ουσιών και στη συνέχεια την παραλαβή χρήσιμων προϊόντων όπως τα λιπαρά, τα σάκχαρα και οι πολυφαινόλες. Πιο πρόσφατα δοκιμάστηκε από διάφορους ερευνητές η χρήση μεμβρανών ή προσροφητικών μέσων (Conidi et al., 2014, Zagklis et al., 2015), η οποία φαίνεται να κερδίζει έδαφος τόσο λόγω της σχετικά εύκολης ανάκτησης των επιθυμητών συστατικών όσο και λόγω της τελικής καθαρότητας του αποβλήτου που εύκολα μπορεί να διατεθεί σε υδάτινους αποδέκτες (Cassano et al., 2013)

Πολλές ακόμη μέθοδοι έχουν ερευνηθεί για την επεξεργασία των Υ.Α.Ε. όπως η αντίστροφη ώσμωση (Ochando-Pulido, 2012), η φωτοχημική αποδόμηση των φαινολών (Cermola et al., 2004) αλλά και η αξιοποίηση τους με διάφορους τρόπους στην καλλιέργεια μανιταριών η οποία περιγράφεται αναλυτικά στα Κεφάλαια 2.1 έως 2.7. Παρόλα αυτά, σε όλες τις ελαιοπαραγωγικές περιοχές που χρησιμοποιούνται διαχωριστές 3 φάσεων, δεν εφαρμόζονται ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης των αποβλήτων, κυρίως λόγω του επιπλέον κόστους που συνεπάγεται η υιοθέτησή τους, με αποτέλεσμα την συνεχή υποβάθμιση των παρακείμενων βιοτόπων.

### 1.2.5 Ημίρρευτο απόβλητο ελαιοτριβείων δύο φάσεων –Προτεινόμενοι μέθοδοι αξιοποίησης

Τα απόβλητα από ελαιοτριβεία δύο φάσεων (TPOMW) γνωστά και ως *alperujo* ή *olive wet pomace*, αποτελούν ένα ημίρρευτο απόβλητο με έντονη μυρωδιά και χαρακτηρίζονται από δυσκολία στη μεταφορά και την επεξεργασία τους. Στο εν λόγω υλικό, τα υγρά που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο ενσωματώνονται στο απόβλητο αυξάνοντας την υγρασία του σε ποσοστό περίπου 65%. Έτσι, το ημίρρευτο απόβλητο επιφέρει σημαντικά προβλήματα στα ελαιοτριβεία, καθώς η διαχείριση του απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό (όπως οι ειδικές δεξαμενές αποθήκευσης και μεταφοράς). Επιπροσθέτως, η μειωμένη αξία του σε σύγκριση με τον ελαιοπυρήνα δημιούργησε την ανάγκη για εκτενή έρευνα και εύρεση νέων εναλλακτικών μεθόδων αξιοποίησης.

Στον Πίνακα 1.2.2. παρουσιάζονται τα κύρια χημικά χαρακτηριστικά του προαναφερθέντος υλικού όπως παραθέτονται στη σχετική βιβλιογραφία. Γενικά, τα TPOMW χαρακτηρίζονται από ελαφρώς όξινο pH, υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (κυρίως

ινώδη συστατικά) και κάλιο. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι επίσης υψηλή, αλλά εμφανίζει μεγάλη διακύμανση ανάλογα με την μέθοδο προσδιορισμού τους. Τέλος, χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (όπως συμβαίνει και με τα Υ.Α.Ε.), οι οποίες τους προσδίδουν έντονα φυτοτοξική δράση. Έρευνες των τελευταίων 20 ετών έχουν αποδείξει ότι πολλά από τα συστατικά που περιέχονται στα ΤΡΟΜΩ (π.χ. ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη, καφεϊκό οξύ) έχουν αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση και προστατεύουν τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα και το DNA έναντι οξειδωτικών βλαβών (Araújo et al., 2015, Pantano et al., 2017). Σε αντίθεση με άλλα οργανικά απόβλητα, όπως τα αστικά και η λυματολάσπη, τα ΤΡΟΜΩ δεν περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων με αποτέλεσμα να προτείνεται η εφαρμογή τους σε γεωργικές εκτάσεις (Clemente et al., 2007).

**Πίνακας 1.2.2. Σύγκριση των κύριων χημικών χαρακτηριστικών σε διαφορετικά δείγματα ΤΡΟΜΩ.**

Βιβλιογραφία Παράμετρος	1	2	3	4	5	6	7	8
Υγρασία (%)	61,8	64	57	64,5	65	64	49,6	71,4
pH (H <sub>2</sub> O)	4,9	5,32	δ.π.	5,23	5,4	5,5	6,8	5,19
EC (dS/m)	1,78	3,42	δ.π.	5,24	δ.π.	3,47	1,2	2,85
ΟΜ (%)	97,4	93,3	98,5	94,3	95,4	91,6	60,3	94,5
C <sub>οτ</sub> /N <sub>τ</sub>	53	47,8	59,7	49,3	29,3	42	32,2	46,6
N <sub>τ</sub> (g/kg)	10,5	11,4	10,0	11,3	18,5	13,5	1,0	9,7
P (g/kg)	δ.π.	1,2	0,5	0,9	δ.π.	1,4	0,3	1,5
K (g/kg)	δ.π.	19,8	6,3	24,3	δ.π.	15,9	29,0	17,1
Ca (g/kg)	δ.π.	4,5	2,6	δ.π.	δ.π.	2,3	12,0	4,0
Mg (g/kg)	δ.π.	1,7	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0,9	1,0	0,5
Na (g/kg)	δ.π.	0,8	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0,2	1,0
Fe (mg/kg)	δ.π.	614	δ.π.	526	δ.π.	769	2600	1030
Cu (mg/kg)	δ.π.	17	δ.π.	17	δ.π.	21	13	138
Mn (mg/kg)	δ.π.	16	δ.π.	13	δ.π.	20	67	13
Zn (mg/kg)	δ.π.	21	δ.π.	18	δ.π.	27	10	22
Λιγνίνη (%)	41,2	42,6	19,8	47,5	δ.π.	46,8	δ.π.	35
Ημικυτταρίνη (%)	δ.π.	35,1	15,3	38,7	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
Κυτταρίνη (%)	δ.π.	19,4	33,7	17,3	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
Λιπαρά (%)	3,76	12,1	10,9	18,0	11,0	12,7	δ.π.	8,6
Πρωτεΐνες (%)	δ.π.	7,2	6,7	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.
Υδατάνθρακες (%)	δ.π.	9,6	19,3	9,6	12,7	10,4	δ.π.	δ.π.
Φαινολικά (%)	0,54	1,4	2,4	1,2	2,1	0,5	δ.π.	δ.π.
Pb, Cd, Cr, Hg (mg/kg)	δ.π.	δ.π.	δ.π.	<5	δ.π.	δ.π.	δ.π.	<1

δ.π. Δεν προσδιορίστηκε, (1) Vlyssides et al. (2004), (2) Filidei et al. (2003), (3) Aktas et al. (2001), (4) Piperidou et al. (2000), (5) Paredes et al. (1999); (6) Vlyssides et al. (1996), (7) Saviozzi et al. (1991), (8) Moreno et al. (1987).

### 1.2.6 Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας ημίρρευστου ελαιοτριβείου δύο φάσεων

#### 1.2.6.1 Ξήρανση και εκχύλιση του εναπομείναντος ελαίου

Τα ΤΡΟΜΩ μπορούν να αξιοποιηθούν για την εξαγωγή επιπλέον ελαίου (πυρηνελαίου) σε αντιστοιχία με την περίπτωση του ελαιοπυρήνα, με την προϋπόθεση ότι θα προηγηθεί ξήρανση του υλικού. Η υψηλή αρχική τους υγρασία καθιστά αδύνατη την απορρόφηση τους από τα παραδοσιακά πυρηνελαιουργεία, με αποτέλεσμα την ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων ξήρανσης με βασικό στόχο την εξοικονόμηση ενέργειας (Arjona et al. 1999, 2005, Krokida et al., 2002). Ωστόσο η ενέργεια που απαιτείται για την ξήρανση και την εξαγωγή του ελαίου παραμένει μεγάλη και σε συνδυασμό με την χαμηλή απόδοση και ποιότητα του παραγόμενου πυρηνελαίου, έχουν οδηγήσει την ερευνητική κοινότητα στη διερεύνηση εναλλακτικών πρακτικών.

#### 1.2.6.2 Δυνατότητες αξιοποίησης για την παραγωγή ενέργειας

Μετά την ξήρανση και την εξαγωγή του ελαίου, το εναπομένον υλικό συνήθως χρησιμοποιείται για θέρμανση ή παραγωγή ενέργειας μέσω καύσης (Caruto et al., 2003, Masghouni and Hassairi, 2000). Η παραπάνω μέθοδος υιοθετείται από τα περισσότερα ελαιοτριβεία ή πυρηνελαιουργεία λόγω της υψηλής θερμογόνου δύναμης του εν λόγω υλικού (400 kcal/kg). Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας που παράγεται αξιοποιείται για τη ξήρανση του “φρέσκου” ΤΡΟΜΩ με αποτέλεσμα το καθαρό υπόλοιπο της ενέργειας που απομένει να είναι σχετικά χαμηλό (Azbar et al., 2004).

Η αεριοποίηση της βιομάζας αποτελεί μια σύγχρονη μέθοδο, ιδιαίτερα για την επεξεργασία του από-ελαιομένου υπολείμματος. Με την παραπάνω μέθοδο η στερεή βιομάζα μετατρέπεται σε συνθετικό αέριο (γνωστό ως “syngas”), το οποίο αποτελεί μείγμα CO και H<sub>2</sub>. Το σύνθετο αέριο χρησιμοποιείται για την παραγωγή σημαντικών χημικών προϊόντων όπως το CH<sub>3</sub>OH ή η NH<sub>3</sub> καθώς επίσης και για την προετοιμασία συνθετικών καυσίμων (Jurado et al., 2003).

#### 1.2.6.3 Απευθείας διάθεση στο έδαφος

Η απευθείας εφαρμογή των ΤΡΟΜΩ στο έδαφος προτείνεται λόγω της προσθήκης σημαντικών ποσοτήτων Κ και πλεονεκτεί έναντι των υπολοίπων διαδικασιών λόγω του χαμηλού κόστους και της μη απαίτησης για μεταφορά (εφόσον εφαρμόζεται σε παρακείμενα της παραγωγής του εδάφη). Επιπλέον, αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η

φυτοτοξικότητα του είναι μικρότερη συγκριτικά με τα Υ.Α.Ε. και προκαλεί σημαντική ανισορροπία στο έδαφος επηρεάζοντας τον κύκλο του αζώτου, λόγω του υψηλού λόγου C/N (Thompson and Nogales, 1999). Οι Saviozzi et al. (2001) αξιολόγησαν την καταλληλότητα της προσθήκης TPOMW ως εδαφοβελτιωτικό με την ταυτόχρονη εφαρμογή ανόργανου αζώτου και συμπέραναν ότι η ανοργανοποίηση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του εδάφους, ενώ αναστέλλεται προσωρινά σε όξινα εδάφη. Επίσης, οι Ordonez et al. (1999) πρότειναν την ταυτόχρονη εφαρμογή TPOMW και αζωτούχου λίπανσης ως μέτρο για την αύξηση του K του εδάφους και της απόδοσης των καλλιεργειών. Η μακροχρόνια εναπόθεση (10 χρόνια) αποελαιομένου TPOMW σε ελαιώνες αποδείχθηκε ότι αυξάνει σημαντικά τη διαθεσιμότητα N, P και K, ενώ η ηλεκτρική αγωγιμότητα αυξήθηκε σημαντικά, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια της μελέτης, αποδεικνύοντας ότι η εφαρμογή τέτοιων υπολειμμάτων στους αγρούς από τους οποίους προήλθαν, δύναται να αποτελέσει μια ιδανική στρατηγική για την ανακύκλωση τους χωρίς να επηρεάζει αρνητικά την απόδοση και βελτιώνοντας ταυτόχρονα τις ιδιότητες του εδάφους (López-Piñeiro et al., 2011).

## 1.2.7 Βιοτεχνολογικές μετατροπές ημίρρευστου αποβλήτου ελαιοτριβείων 2 φάσεων

### 1.2.7.1 Αναερόβια χώνευση

Μέσω της αναερόβιας χώνευσης των TPOMW, μπορεί να παραχθεί βιοαέριο (μείγμα CH<sub>4</sub> και CO<sub>2</sub>) ταυτόχρονα με σχετικά σταθερή οργανική ουσία. Το πρώτο δύναται να αξιοποιηθεί στην παραγωγή ενέργειας, ενώ το δεύτερο να εφαρμοστεί ως εδαφοβελτιωτικό. Οι Tekin and Dalgic (2000) πειραματίστηκαν με την παραγωγή βιοαερίου από τον ελαιοπυρήνα και διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητά του σε μεθάνιο κυμαινόταν από 75 έως 80%. Επιπλέον, οι Borja et al., (2003) και Fezzani and Cheikh (2010), πειραματιζόμενοι με την παραγωγή βιοαερίου με μεσόφιλους αναερόβιους μικροοργανισμούς, παρατήρησαν ικανοποιητική παραγωγή μεθανίου όπως και αρνητική επίδραση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στη μεθανογένεση.

### 1.2.7.2 Ζύμωση στερεάς φάσης

Στο παρελθόν έχει προταθεί η αξιοποίηση των TPOMW στη διατροφή οικόσιτων ζώων (Molina Alcaide and Nefzaoui, 1996). Ωστόσο η υψηλή περιεκτικότητα δύσπεπτων



ινωδών συστατικών και το μικρό ποσοστό πρωτεϊνών (κυρίως λυσίνη) επιτάσσουν την χρήση πρωτεϊνικών συμπληρωμάτων (Molina Alcaide et al., 2003). Το ίδιο αποτέλεσμα όμως μπορεί να επιτευχθεί με την επεξεργασία του υλικού σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης. Η παραπάνω διαδικασία η οποία υλοποιείται μέσω της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε στερεά υποστρώματα, έχει υιοθετηθεί με επιτυχία για την παραγωγή ζωοτροφών, καυσίμων και ενζύμων (Salgado et al., 2014). Στην περίπτωση των TPOMW έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης σε ποσοστό από 5,9% έως και 40,3% (Haddadin et al., 1999). Η καλλιέργεια μυκήτων για την παραγωγή εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών συνιστά επίσης μια διαδικασία στερεάς ζύμωσης στην οποία έχει δοκιμαστεί η προσθήκη TPOMW σε μείγματα με άχυρο για την παραγωγή μανιταριών των γενών *Pleurotus* και *Cyclocybe*. Μάλιστα η χρήση κομποστοποιημένου TPOMW συγκριτικά με το μη επεξεργασμένο, αποδείχτηκε ότι μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση της απόδοσης σε μανιτάρια (Zervakis et al., 2013).

### 1.2.7.3 Κομποστοποίηση

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει τη συγκομποστοποίηση των TPOMW σε συνδυασμό με άλλα γεωργικά υπολείμματα, επειδή το πρώτο λόγω της ιδιαίτερης δομής του (ιλύς) δυσχεραίνει την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών στο εσωτερικό του. Τα TPOMW προστίθενται στο μείγμα στην αρχή της διαδικασίας κομποστοποίησης, σε αντίθεση με τα ΥΑΕ των οποίων η προσθήκη προτείνεται να είναι επαναλαμβανόμενη και μόνο κατά την θερμόφιλη φάση της κομποστοποίησης. Κάποια από τα υλικά, των οποίων η καταλληλότητα για κομποστοποίηση με TPOMW έχει αποδειχθεί, είναι τα υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (Cegarra et al., 2000), το πριονίδι λεύκας και ο τεμαχισμένος φλοιός σκληρών ξύλων (Filippiet al., 2002), τα στελέχη σταφυλιών (Cayuela et al., 2010), το άχυρο σιτηρών και τα υπολείμματα κλαδεμάτων ελαιόδεντρων (Gigliotti et al., 2012). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό χουμοποίησης, μείωση της φυτοτοξικότητας και μεγάλες συγκεντρώσεις ανόργανων θρεπτικών. Για τους παραπάνω λόγους, υποστηρίζεται ότι η κομποστοποίηση των TPOMW με τα υπόλοιπα στερεά παραπροϊόντα της ελαιοκαλλιέργειας αποτελεί μια οικονομική λύση που μπορεί να εφαρμοστεί αντικαθιστώντας την ανεξέλεγκτη διάθεση και την καύση τους.

Τα φυσικά χαρακτηριστικά των TPOMW καθιστούν αδύνατη την κομποστοποίηση με παροχή αέρα, λόγω της δημιουργίας καναλιών αέρα που ξεραίνουν το υλικό και το αδρανοποιούν (Cayuela, 2004). Οι Baeta-Hall et al. (2005), συγκρίνοντας δύο συστήματα

αερισμού κατά την κομποστοποίηση ΤΡΟΜΩ με στέμφυλα οινοποιίας, πρότειναν την εφαρμογή της μηχανικής ανάδευσης έναντι της παροχής αέρα. Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ολοκληρωμένη γεωργία. Η υψηλή καθαρότητα του εν λόγω υλικού (εφόσον απομακρυνθούν οι τοξικές ενώσεις) εξασφαλίζει την ποιότητα και την ανταγωνιστικότητα του “λιπάσματος” που παράγεται από τον μετασχηματισμό των εν λόγω υπολειμμάτων. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Cayuela et al. (2004), πρότειναν τη βιομηχανική κομποστοποίηση με κοπριά, ως μια εναλλακτική προσέγγιση για την αξιοποίηση των ΤΡΟΜΩ σε περιοχές που γειτνιάζουν με ελαιοτριβεία. Σε αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης των κομποστοποιημένων υπολειμμάτων ως λιπάσματα, ο κυριότερος περιορισμός ήταν το υψηλό pH συγκριτικά με άλλα γεωργικά απόβλητα. Για την επίλυση του παραπάνω εμποδίου, οι Roig et al. (2004) δοκίμασαν με επιτυχία την προσθήκη στοιχειακού θείου για την ρύθμιση του pH κατά την διαδικασία κομποστοποίησης.

#### 1.2.7.4 Εκχύλιση αξιοποιήσιμων προϊόντων

Τα ΤΡΟΜΩ έχουν αναδειχθεί σε πολλές ερευνητικές εργασίες, ως κατάλληλο υπόστρωμα για την εκχύλιση χρήσιμων συστατικών. Για παράδειγμα, φαίνεται ότι μπορούν να αποτελέσουν αξιοποιήσιμη πηγή πηκτινών, οι οποίες ανήκουν στα φυσικά υδροκολλοειδή και χρησιμοποιούνται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων ως πηκτωματοποιητικοί παράγοντες, σταθεροποιητές και γαλακτοματοποιητές, ενώ μέχρι σήμερα παραλαμβάνονται από τα υπολείμματα χυμοποίησης μήλων και εσπεριδοειδών. Η οικονομικότητα της παραπάνω διαδικασίας φαίνεται να είναι ιδιαίτερα θετική λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης τους στα ΤΡΟΜΩ (Galanakis, 2012). Επιπλέον, τα ΤΡΟΜΩ αποτελούν πλούσια πηγή φαινολικών με μεγάλο εύρος βιολογικών εφαρμογών. Μάλιστα, το μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών που περιέχονται στον ελαιοκάρπο (έως και 98%) καταλήγουν τελικά στα απόβλητα (Obied et al., 2005). Οι κύριοι εκπρόσωποι αυτών -όπως και στην περίπτωση των ΥΑΕ- είναι η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη, η τυροσόλη και το καφεϊκό οξύ, για τα οποία έχουν αποδειχθεί οι αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιμικροβιακές, αντιυπερτασικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πληθώρα διεργασιών για την απομόνωση και τον καθαρισμό τους με σκοπό την χρήση τους στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων (Boucif et al., 2005, Zaglis et al., 2015).

### 1.2.7.5 Άλλες προτεινόμενες εφαρμογές αξιοποίησης

Αρκετές ακόμη ενδιαφέρουσες διαδικασίες έχουν προταθεί για την αξιοποίηση των ΤΡΟΜΩ με δυνατότητα απορρόφησης μικρότερων ποσοτήτων συγκριτικά με τις προαναφερθείσες. Μεταξύ αυτών αξιοσημείωτη είναι η χρήση τους για την προσρόφηση βαρέων μετάλλων διαλυμένα σε νερό (Blázquez et al., 2010, Pagnanelli et al., 2002) και η εφαρμογή τους σε καλλιεργούμενα εδάφη για την ενίσχυση της προσρόφησης ζιζανιοκτόνων (simazine) και εντομοκτόνων (imidacloprid), την αύξηση του χρόνου διατήρησης τους και την καθυστέρηση της έκπλυσης τους, μειώνοντας τον κίνδυνο ρύπανσης των υπόγειων υδάτων (Albarrán et al., 2004, Cox et al., 2004). Τέλος έχει προταθεί η χρήση τους για την παραγωγή δομικών υλικών (José et al., 2012) όπως και για την ανάπτυξη νέων υλικών και την αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών (Mumtaz et al., 2010)

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι ο συνδυασμός περισσότερων από μια μεθόδων, μπορεί να οδηγήσει σε αποτελεσματική και ταυτόχρονα οικονομικά βιώσιμη διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείων.

### 1.2.8 Άλλα στερεά υπολείμματα

Κατά το πλύσιμο του ελαιόκαρπου στα ελαιοτριβεία, συλλέγεται μια περιορισμένη ποσότητα φύλλων, τα οποία όμως δεν αποτελούν μείζον πρόβλημα για τα ελαιοτριβεία, καθώς μπορούν να αποτελέσουν μέρος σιτηρεσίου ζώων ή καύσιμη ύλη.

Ορισμένα ελαιοτριβεία είναι εξοπλισμένα με συστήματα αφαίρεσης του πυρήνα πριν την άλεση, για την αύξηση της απόδοσης και της ποιότητας του ελαιολάδου. Οι πυρήνες του ελαιοκάρπου έχουν σημαντική θερμογόνο δύναμη με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ως πηγή θερμικής ενέργειας, ενώ πρόσφατα προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον για την παραγωγή υποστρωμάτων υδροπονίας (Chrysargyris et al., 2018) και ενεργού άνθρακα (Alsaibi et al., 2013). Επιπλέον, η επεξεργασία των πυρήνων με ατμό μπορεί να βοηθήσει στην παραλαβή προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως η υδροξυτυροσόλη και οι ξυλο-ολιγοσακχαρίτες καθώς και υψηλής καθαρότητας λιγνίνη, ενώ μέσω υψηλής θερμοκρασίας υδρόλυσης μπορεί να παραληφθεί φουρφουράλη (Matos et al., 2010).

## 1.3 Στέμφυλα οινοποιίας

### 1.3.1 Γενικά

Η καλλιέργεια της αμπέλου αποτελεί μια από τις πιο εκτεταμένες γεωργικές δραστηριότητες στον κόσμο, με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και ετήσια παραγωγή που αγγίζει τα 63 εκατομμύρια τόνους. Το μεγαλύτερο ποσοστό των παραγόμενων σταφυλιών (75%) οδηγείται στην παραγωγή οίνου (FAOSTAT 2013). Περίπου 20% της οινοποιήσιμης ποσότητας αντιστοιχεί στα στέμφυλα, δηλαδή στο κύριο υπόλειμμα της οινοποίησης (Laufenberg et al., 2003). Τα στέμφυλα αποτελούνται κυρίως από τα σπέρματα, τον φλοιό και τμήματα του βόστρυχα καθώς και κύτταρα ζύμης προερχόμενα από τη διαδικασία της ζύμωσης.

Πολύ μεγάλες ποσότητες στέμφυλων παράγονται σε διάστημα 1-2 μηνών κάθε χρόνο και συσσωρεύονται στις οινοπαραγωγές περιοχές. Η αποτέφρωση μετά από ξήρανση ή η ανεξέλεγκτη διάθεση τους μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα ρύπανσης, λόγω του υψηλού φαινολικού φορτίου που προκαλεί αύξηση της ανθεκτικότητας στη μικροβιακή αποδόμηση. Επιπλέον μπορεί να οδηγήσουν στην υποβάθμιση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων, πρόκληση οσμών, προσέλκυση εντόμων τα οποία με τη σειρά τους βοηθούν την εξάπλωση ασθενειών κλπ. (Christ and Burrit, 2013, Dwyer et al., 2014). Τις τελευταίες δεκαετίες, η διαχείριση και αξιοποίηση του παραπάνω υπολείμματος κρίνεται ως αναποτελεσματική. Υπολογίζεται ότι περίπου το 3% της παραγόμενης ποσότητας χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή (Brenes et al., 2016, Dwyer et al., 2014), ενώ μικρές ποσότητες κομποστοποιούνται μαζί με άλλα γεωργικά υπολείμματα (Santos et al., 2016). Πρόσφατα, εξετάστηκε επίσης η δυνατότητα χρήσης τους για τη βελτίωση της θερμομόνωσης σε κτηριακές κατασκευές με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Muñoz et al., 2014).

### 1.3.2 Χημική σύσταση

Η σύσταση των στέμφυλων μπορεί να ποικίλει σημαντικά και εξαρτάται τόσο από εξωτερικούς παράγοντες όπως οι εδαφικές συνθήκες (Kliwer 1977) και οι αμπελουργικές τεχνικές που ακολουθούνται (Freeman et al., 1979), όσο και από εγγενείς στους οποίους περιλαμβάνονται η ποικιλία, το στάδιο ωριμότητας και καλλιεργητικές συνθήκες (Philip and Kuykendall 1973, Robredo et al., 1991). Ομοίως, τόσο ο τύπος όσο και οι συνθήκες της

οινοποίησης επηρεάζουν σημαντικά τη σύσταση του τελικού προϊόντος (Pérez-Magariño, and González-San José, 2000). Η ποικιλομορφία μεταξύ των διάφορων ποικιλιών που καλλιεργούνται και η διαφορετική επίδραση της οινοποίησης φαίνεται να είναι οι κύριοι παράγοντες για τη μεγάλη διακύμανση στη σύσταση των στέμφυλων (García-Lomillo and González-SanJosé, 2017). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα στέμφυλα από ερυθρή οινοποίηση έχουν υποστεί ζύμωση, ενώ αυτά από λευκή ή ροζέ έχουν αφαιρεθεί πριν ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης με αποτέλεσμα τα περιεχόμενα σάκχαρα να παραμένουν στο υπόλειμμα.

**Πίνακας 1.3.1. Χημική σύσταση των στέμφυλων προερχόμενων από 5 διαφορετικές ποικιλίες οινοποιήσιμων σταφυλιών (ΠΗΓΗ: Deng et al., 2011).**

Συστατικό	Ποικιλία				
	Muller Thurgau	Morio Muscat	Cabernet Sauvignon	Merlot	Pinot Noir
Πρωτεΐνες (%)	6,54	5,38	12,34	11,26	12,13
Λιπαρά (%)	2,64	1,14	6,33	3,35	4,74
Τέφρα (%)	2,53	3,31	7,59	7,19	6,17
Διαλυτά σάκχαρα (%)	55,77	77,53	1,71	1,34	1,38
Ολικά ινώδη συστατικά (%)	28,01	17,28	53,21	51,09	56,31
Γλυκόζη (%)	4,59	3,16	7,33	9,16	8,43
Ξυλόζη (%)	0,91	0,45	1,94	2,13	2,09
Γαλακτόζη (%)	0,67	0,54	0,97	1,02	1,17
Αραβινόζη (%)	0,43	0,34	0,76	0,75	0,58
Μαννόζη (%)	0,49	0,6	1,48	1,54	1,12
Ολικά φαινολικά συστατικά (mg GAE /g d.w.)	15,8	1,6	26,7	25,0	21,4

Τα στέμφυλα μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως η αιθανόλη, τα τρυγικά και μηλεϊνικά άλατα, το έλαιο των σπερμάτων, τα υδροκολλοειδή και οι διαιτητικές ίνες. Επιπροσθέτως, τα στέμφυλα χαρακτηρίζονται από υψηλό φαινολικό περιεχόμενο, λόγω της πλημμελούς εκχύλισης τους κατά την οινοποίηση (Kammerer et al., 2004). Η χημική σύσταση των στέμφυλων που προέρχονται από 5 διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών παρουσιάζονται στον παραπάνω Πίνακα 1.3.1.

### 1.3.3 Δυνατότητες αξιοποίησης των στέμφυλων

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση του ελαίου που εκχυλίζεται από τα σπέρματα κερδίζει συνεχώς έδαφος, λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης σε αντιοξειδωτικά συστατικά (Gonzalez-Paramas et al., 2004). Τα δύο κύρια παραπροϊόντα της οινοποίησης, δηλαδή τα σπέρματα

και οι φλοιοί των σταφυλιών, αποτελούν μια πολύ οικονομική πηγή για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών φλαβονοειδών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής ή για την παραγωγή φυτοχημικών, παρέχοντας έτσι ένα σημαντικό οικονομικό πλεονέκτημα (Gonzalez-Paramas et al., 2004, Negro et al., 2003,).

Εκτενείς έρευνες έχουν αποδείξει τη δυνατότητα πολλών οργανικών υπολειμμάτων να κομποστοποιηθούν με βιολογικό και οικονομικό τρόπο για την παραγωγή κατάλληλων εδαφοβελτιωτικών (Cerde et al., 2017). Στην περίπτωση των στέμφυλων, φαίνεται ότι μπορούν να ανακυκλωθούν παρέχοντας μάλιστα στο έδαφος οργανική ουσία πλούσια σε θρεπτικά συστατικά. Συγκριτικά με το κομπόστ άλλων γεωργικών παραπροϊόντων, οι τιμές των περισσότερων παραμέτρων βρίσκονται στο ίδιο εύρος, με εξαίρεση την υψηλή περιεκτικότητα σε Ca λόγω της φύσης της οινοποίησης (Bertran et al., 2004).

Η οινολάσπη που παραμένει μετά το τέλος της οινοποίησης στις δεξαμενές, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει αποδοτικά ως προσροφητικό μέσο βαρέων μετάλλων περιεχόμενων σε νερό. Η προσρόφηση των μετάλλων αποτελείται από μια σειρά μηχανισμών που ποσοτικά και ποιοτικά διαφέρουν ανάλογα με το στοιχείο, το είδος του διαλύματος και την προέλευση και επεξεργασία του προσροφητικού μέσου (Villaescusa et al., 2004, Yuan-shen et al., 2004) . Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ικανότητα των αποβλήτων οινοποιίας στην προσρόφηση μετάλλων, είναι συγκρίσιμη με αυτή των διαδομένων προσροφητικών μέσων (Yuan-shen et al., 2004). Επιπλέον, οι φλοιοί των σταφυλιών αναφέρονται ως ενδεδειγμένο υπόστρωμα για την παραγωγή πουλουλάνης, η οποία έχει μεγάλο μοριακό βάρος ( $4,22 \times 10^6$ ) και υψηλή καθαρότητα (Israilides et al., 1998). Τα εκχυλίσματα θερμού ύδατος (hot water extracts) αποτελούν επίσης ικανοποιητικό υπόστρωμα για την ζύμωση με τον μύκητα *Aerobasidium pullulans* (Arapoglou et al., 2002). Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι μέχρι σήμερα πιθανές χρήσεις κάθε κλάσματος των παραπροϊόντων της οινοποιίας καθώς και η επεξεργασία που απαιτείται.

**Πίνακας 1.3.2. Επεξεργασία των υπολειμμάτων οινοποίησης, φυσικοχημικές ιδιότητες και χρήσεις.**

Υπόλειμμα οινοποίησης	Επεξεργασία	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Χρήσεις	Πηγή
Υπολείμματα σταφυλιών	Κομποστοποίηση με κοπριά πουλερικών	Υψηλό οργανικό περιεχόμενο	Λίπανση σε καλλιέργεια καλαμποκιού	Ferrer et al., 2001
Σπέρματα και φλούδες	Διαχωρισμός από τα υπόλοιπα υπολείμματα	Συγκέντρωση φαινολικών	Συμπληρώματα διατροφής για την πρόληψη ασθενειών	Shrikhande, 2000
Στέμφυλα	Εκχύλιση θερμού ύδατος	Σάκχαρα και πολυσακχαρίτες	Συμπληρώματα διατροφής	Beres et al., 2016
Υπολείμματα σταφυλιών	Αεριοποίηση	Συγκέντρωση άχρηστων παραπροϊόντων	Παραγωγή αερίου για θέρμανση	Blasi et al., 1997
Πεπιεσμένες φλούδες σταφυλιών	Συγκομποστοποίηση με υγρά απόβλητα	Υψηλό οργανικό περιεχόμενο	Λίπανση	Manios, 2004
Στέμφυλα και σπέρματα	Λυοφιλίωση και εκχύλιση των φλαβονοειδών	Συγκέντρωση φλαβονοειδών	Συμπληρώματα διατροφής και παραγωγή φυτοχημικών	Gonzalez-Paramas et al., 2004
Σπέρματα	Εκχύλιση ελαίου	Υψηλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών	Φαρμακευτική, συμπληρώματα διατροφής, ζωοτροφές	Ismail et al., 2015, Shinagawa et al., 2015
Στέμφυλα, βόστρυχες και οινολάσπη	Λυοφιλίωση και εκχύλιση των πολυφαινολών	Συγκέντρωση πολυφαινολών	Συμπληρώματα διατροφής	Fontana et al., 2013
Φλούδες, σπέρματα και βόστρυχες	Αποδόμηση ενός πολυμερούς προανθοκυανιδικού κλάσματος παρουσίας κυστεαμίνης	Συγκέντρωση φλαβονοειδών	Πηγή φλαβονοειδών	Torres & Bobet, 2001
Εκχύλισμα σπερμάτων	Χρήση σε σιτηρέσιο οικόσιτων ζώων	Συγκέντρωση πολυφαινολών	Παραγωγή ζωοτροφών	Lau & King, 2003
Πούλπα φλοιών	Ζύμωση με <i>Aureobasidium pullulans</i>	Παραγωγή αιθανόλης	Παραγωγή πουλουλάνης	Israilides et al., 1998
Σπέρματα	Στερεά ζύμωση με <i>Trametes hirsuta</i>	Υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνοκυτταρίνη	Παραγωγή λακάσσης	Moldes et al., 2003
Στέμφυλα	Υπόστρωμα για την καλλιέργεια ειδών <i>Pleurotus</i>	Υψηλή συγκέντρωση σε φαινολικά και ολικά σάκχαρα	Παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών	Sanchez et al., 2002

## 1.4. Μύκητες

### 1.4.1. Γενικά

Το βασίλειο των Μυκήτων περιέχει ευκαρυωτικούς, ετερότροφους μικροοργανισμούς οι οποίοι με βάση την οικολογική τους προσαρμογή διαβιούν ως παρασιτικοί, συμβιωτικοί ή σαπροτροφικοί. Είναι χημειοργανότροφοι, ενώ πολλά είδη έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα (μέχρι και 62 °C). Εντοπίζονται σε ποικίλα ενδιαιτήματα, σε γλυκά νερά και θάλασσες, αλλά το μεγαλύτερο μέρος τους είναι χερσαίοι οργανισμοί (Madigan et al., 2007).

Αποτελούν τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα οργανισμών στη βιόσφαιρα μετά τα έντομα, ενώ μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περίπου 100.000 είδη (εκ των οποίων μόνο τα 200 έχουν προσδιοριστεί ως ανθρώπινα παθογόνα), ενώ ο συνολικός εκτιμώμενος αριθμός τους στον πλανήτη υπολογίζεται σε περίπου 6 εκατομμύρια (Nguyen et al., 2016). Συνολικά υπολογίζεται ότι έχει ανακαλυφθεί το 1,5 -2,0% των μυκήτων, καθιστώντας τους μια από τις λιγότερο εξερευνημένες ομάδες οργανισμών της Γης.

Οι μύκητες παρουσιάζουν έντονο επιστημονικό αλλά και οικονομικό ενδιαφέρον. Από επιστημονικής σκοπιάς, η πολύ γρήγορη ανάπτυξη τους, καθώς και οι μεγάλες ποσότητες βιομάζας που μπορούν να παραχθούν τους καθιστούν σημαντικά βιολογικά εργαλεία. Επίσης αποτελούν οργανισμούς μοντέλα για τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των γονιδίων. Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος του *Saccharomyces cerevisiae*, το 1996, οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι ανάμεσα στους μύκητες και τα ζώα, εκτός από αρκετά κοινά γονίδια, υπάρχουν και κοινές κυτταρικές λειτουργίες. Σημαντική είναι επίσης η συνεισφορά τους στη βιομηχανία τροφίμων (κυρίως ζύμες) όπου συμμετέχουν σε διαδικασίες ζύμωσης στην αρτοποιία, την ζυθοποιία, την οινοποιία και αλλού. Επιπλέον χρησιμοποιούνται εμπορικά για την παραγωγή ενζύμων, αντιβιοτικών, αμινοξέων, βιταμινών κ.α. ενώ υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην βιοεξυγίναση εδαφών και αποβλήτων. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθούν οι αρνητικές επιδράσεις των μυκήτων, τόσο ως ασθένειες ανθρώπων, ζώων και φυτών όσο και στην ποιοτική υποβάθμιση τροφίμων, ζωοτροφών, ξυλείας και λοιπών υλικών.

Από οικολογικής πλευράς, σπουδαίος είναι ο ρόλος τους στις συμβιωτικές σχέσεις με τα φυτά (σχηματίζοντας μυκόρριζες). Στην σχέση αμοιβαίας ωφέλειας που αναπτύσσεται



μεταξύ τους, οι μύκητες χρησιμοποιούν τα προϊόντα φωτοσύνθεσης ενώ προσφέρουν στα φυτά μεγαλύτερη ικανότητα απορρόφησης θρεπτικών και νερού από το έδαφος.

#### 1.4.2. Ταξινόμηση κατάταξη μυκήτων

Η συστηματική ταξινόμηση στους μύκητες βρίσκεται υπό συνεχή αναθεώρηση κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, καθώς η ολοένα αυξανόμενη χρήση μοριακών τεχνικών ταυτοποίησης, αποκαλύπτει φυλογενετικές σχέσεις, που καταρρίπτουν πολλές φορές την παραδοσιακή ταξινόμηση. Αυτό έγινε δυνατό χάρη στην εφαρμογή της τεχνικής της «Αλυσιδωτής Αντίδρασης της DNA Πολυμεράσης» (PCR) για την ανάλυση τμημάτων του γονιδιώματος που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA, αλλά και άλλων χρήσιμων φυλογενετικά μιτοχονδριακών ή χρωμοσωμικών γονιδίων. Σήμερα η ταξινόμηση των μυκήτων με τη χρήση μοριακών τεχνικών είναι πλέον ιδιαίτερα διαδεδομένη (Hibbett et al., 2007). Σύμφωνα με πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα βασισμένα σε φυλογενετικές αναλύσεις το Βασίλειο των μυκήτων περιλαμβάνει ένα Υποβασίλειο, 7 Φύλα και 10 Υποφύλα (Πίνακας 1.4.1).

**Πίνακας 1.4.1. Ταξινόμηση των υψηλότερων επιπέδων του Βασιλείου των Μυκήτων σύμφωνα με φυλογενετικές αναλύσεις (Hibbet et al., 2007).**

Kingdom	Subkingdom	Phylum	Subphylum
Fungi	Dicarya	Ascomycota	Taphrinomycotina Saccharomycotina Pezizomycotina Pucciniomycotina
		Basidiomycota	Ustilaginomycotina Agaricomycotina
		Blastocladiomycota	
		Chytridiomycota	
		Glomeromycota	
		Microsporidia	
		Neocallimastigomycota	
		Subphyla Incertae sedis	Mucoromycotina Kickxellomycotina Zoopagomycotina Entomophthoromycotina

#### 1.4.3. Μορφολογία και κυτταρική δομή των μυκήτων

Το βλαστικό σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός και μπορεί να είναι είτε μονοκύτταρο, είτε αποτελούμενο από διακλαδισμένα νημάτια (τα οποία ονομάζονται υφές),

το σύνολο των οποίων αποτελεί το μυκήλιο. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις δημιουργίας αλυσίδας κυττάρων προερχόμενες από διαδοχικές εκβλαστήσεις, σε μύκητες με μονοκύτταρο θαλλό. Κάποιοι μύκητες επίσης εμφανίζουν το φαινόμενο του διμορφισμού, κατά το οποίο αναπτύσσονται με διαφορετικού τύπου θαλλό ανάλογα με το υπόστρωμα. Αυτό αφορά κυρίως παρασιτικούς μύκητες φυτών, οι οποίοι επάνω στον ξενιστή τους εμφανίζουν μυκηλιακό θαλλό, ενώ σε θρεπτικά υλικά ο θαλλός μπορεί να πάρει τη μορφή ζύμης (όπως τα παθογόνα που ευθύνονται για τον εξώασκο των πυρηνόκαρπων).

Οι υφές αποτελούν μικροσκοπικά μυκηλιακά νημάτια, διακλαδισμένα και κοίλα εσωτερικά (όπου περιέχονται οι πυρήνες, το κυτταρόπλασμα και τα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια). Μπορεί να είναι συνεχείς χωρίς εγκάρσια διαφράγματα (septa) συνιστώντας έτσι το κοινοκύτταρο μυκήλιο (που αποτελεί χαρακτηριστικό κατώτερων μυκήτων). Εναλλακτικά μπορεί να είναι πολυκύτταρες με τα septa να διαχωρίζουν εσωτερικά τις υφές σε τμήματα, σχηματίζοντας έτσι υποτυπώδη κύτταρα (χαρακτηριστικό των ανώτερων μυκήτων).

Εγκάρσια διαφράγματα όμως μπορούν να σχηματιστούν και στους μύκητες με κοινοκύτταρο μυκήλιο, σε περιπτώσεις όπου κάποιο τμήμα της υφής πρέπει να αποκοπεί από το υπόλοιπο μυκήλιο. Τα παραπάνω septa ονομάζονται "περιστασιακά" και σχετίζονται με έντονες αλλαγές στη συγκέντρωση του κυτταροπλάσματος μεταξύ δύο περιοχών της υφής. Σε αντίθεση όμως με τα κυρίως septa των ανώτερων μυκήτων (τα οποία φέρουν οπή στο κέντρο από όπου ρέει το κυτταρόπλασμα, κυτταρικά οργανίδια και σε ορισμένες περιπτώσεις πυρήνες), στα περιστασιακά septa σχηματίζεται ένα αδιαπέρατο διάφραγμα το οποίο απομονώνει πλήρως τις υφές.

Τα τοιχώματα των κυρίως septa των ανώτερων μυκήτων είναι συνήθως ισοπαχή. Πιο συγκεκριμένα στους ασκομύκητες, τους μύκητες της τάξης Uredinales των Βασιδιομυκήτων καθώς και σε άλλους τα τοιχώματα τους είναι ισοπαχή ή λεπταίνουν προς το κέντρο. Πλησίον του κεντρικού πόρου των ασκομυκήτων υπάρχει το σωματίδιο Woronin, του οποίου αν και ο ακριβής ρόλος παραμένει αδιευκρίνιστος, θεωρείται ότι πωματίζει τον πόρο σε περίπτωση ανάγκης για απομόνωση τμήματος των υφών. Στους υπόλοιπους Βασιδιομύκητες (εκτός των Uredinales) δεν υπάρχει αυτή η τυπική δομή, αλλά τα τοιχώματα των septa εμφανίζουν μια βαρελοειδή διόγκωση στην περιφέρεια του κεντρικού πόρου και καλύπτονται από μια μεμβρανώδη κατασκευή (παρενθόσωμα) η οποία φέρει πολυάριθμες οπές και τα septa σε αυτή την περίπτωση ονομάζονται δολίπορα. Το μέγεθος του κεντρικού πόρου κυμαίνεται από 0,4 έως 1,2 μm, ενώ των οπών του παρενθοσώματος από 0,1 έως 0,18 μm (μέγεθος που δεν επιτρέπει την μετακίνηση πυρήνων των βασιδιομυκήτων).

Τα κυτταρικά τοιχώματα των υφών των μυκηλιακών κυττάρων περιέχουν χιτίνη (πολυμερές N-ακετυλογλυκοζαμίνης) που εναποτίθεται σε δέσμες μικροϊνιδίων (Madigan et al., 2007) και διάφορους πολυσακχαρίτες καθώς και πρωτεΐνες, λιπίδια κ.α. (Alexopoulos et al., 1996), ενώ των ανωτέρων μυκήτων περιέχουν χιτίνη και μη-κυτταρινικές β-γλουκάνες.

Η αύξηση των υφών συντελείται επάκρια και το υλικό από το οποίο θα δομηθούν οι νέες μεμβράνες προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Από εκεί μεταφέρεται στα δικτυοσώματα όπου αποκτά δομή ανάλογη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Από τα δικτυοσώματα αποσπάται με τη μορφή κυστιδίων και έτσι μεταφέρεται στα ακραία τμήματα των υφών. Στους περισσότερους ανώτερους μύκητες τα κυστίδια τελικά ομαδοποιούνται στη ζώνη επιμήκυνσης και δημιουργούν μια δυναμική δομή (σωματίδιο Spitzenkörper) που αποτελεί τροφοδότη κυστιδίων. Τα κυστίδια τελικά συντήκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και έτσι αυξάνεται η επιφάνεια της. Στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος εμπλέκονται και τα χιτινοσώματα (συνθετάση της χιτίνης (Alexopoulos et al., 1996). Στους Ωμομήκητες αλλά και σε κάποιους κοινοκύτταρους μύκητες (π.χ. Ζυγομήκητες) οι υφές τους δεν περιέχουν αναγνωρίσιμο Spitzenkörper, ενώ τα κυστίδια είναι λιγότερα και πιο αραιά στο επάκριο τμήμα (Webster and Weber, 2007).

Ο σχηματισμός των αποικιών στους μύκητες ποικίλει και εξαρτάται από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως, η ανάπτυξη τους είναι γραμμική. Έτσι σε στερεά υποστρώματα σχηματίζονται κυκλικές αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται ισομερώς σε δύο διαστάσεις, ενώ σε υγρά θρεπτικά μέσα σχηματίζονται σφαιρικές αποικίες ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης τους σε τρεις άξονες.

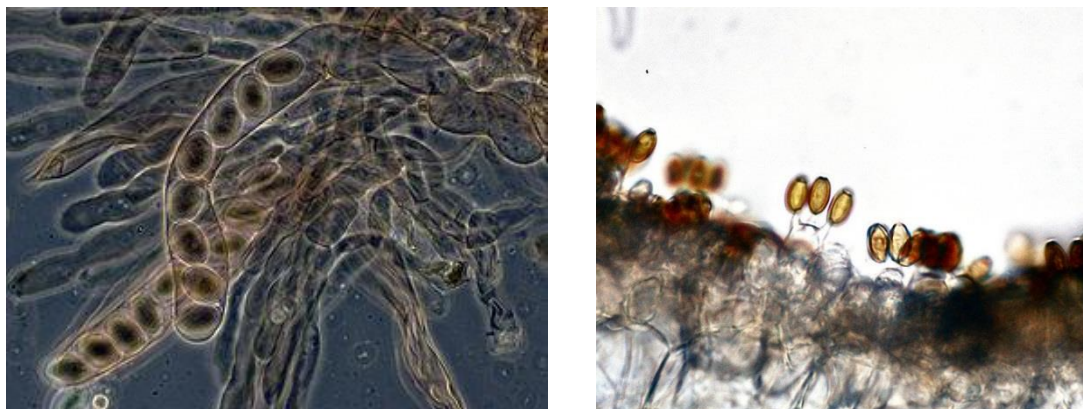
Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται στο θερμοκρασιακό εύρος από 0 έως 35 °C, ενώ οι άριστες θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι συνήθως 20-30 °C. Υπάρχουν όμως και θερμοφιλά είδη, τα οποία αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 20-50 °C. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, προτιμούν ελαφρά όξινο pH υποστρώματος (τιμές pH 5,5 – 6,5). Το φως δεν είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη τους, απαιτείται όμως για την δημιουργία καρποφοριών (Alexopoulos et al., 1996).

#### 1.4.4. Αναπαραγωγή μυκήτων

Οι μύκητες κατά την διαδικασία σχηματισμού αναπαραγωγικών οργάνων διακρίνονται σε ολοκαρπικούς (όταν ολόκληρος ο θαλλός τους μετατρέπεται σε αναπαραγωγικό όργανο) και ευκαρπικούς (όταν μόνο ένα τμήμα του θαλλού

μετασχηματίζεται σε αναπαραγωγικό όργανο, ενώ το υπόλοιπο συνεχίζει να αναπτύσσεται κανονικά). Έτσι στους ευκαρπικούς μύκητες η βλαστική και αναπαραγωγική φάση συνυπάρχουν.

Η αναπαραγωγή στους μύκητες διακρίνεται σε αγενή και εγγενή, με την πλειονότητα των μυκήτων να αναπαράγεται και με τους δύο τρόπους. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με τη βοήθεια αγενών σπορίων τα οποία σχηματίζονται ή στο εσωτερικό σποριαγγείων είτε στην επιφάνεια κονιδιοφόρων και βλασάνου όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα. Τα σποριάγγεια σχηματίζονται στο άκρο σποριαγγειοφόρων υφών κατώτερων μυκήτων, ενώ τα αγενή τους σπόρια μπορεί να είναι ζωοσπόρια (τα οποία διαθέτουν μαστίγια με δυνατότητα ελεύθερης κίνησης) ή απλανοσπόρια (δεν διαθέτουν αυτονομία κίνησης και η διασπορά τους γίνεται παθητικά). Οι κονιδιοφόροι μπορεί να είναι ελεύθεροι ή να βρίσκονται σε σποριοδοχεία, πυκνίδια ή ακέρβουλα, ενώ τα σπόρια (κονίδια) που σχηματίζουν δεν διαθέτουν αυτονομία κίνησης.



Εικόνα 1.4.1. (i) Ασκοί του μύκητα *Morchella elata* με οκτώ σπόρια (αριστερά) και (ii) και βασίδια με τέσσερα βασιδιοσπόρια (Δεξιά), (ΠΗΓΗ: Wikipedia).

Η εγγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις, την πλασμογαμία, την καρυογαμία και τη μείωση. Οι εγγενείς αναπαραγωγικές δομές αποτελούν ταξινομικό χαρακτηριστικό για πολλούς μύκητες. Τα εγγενή σπόρια των Ασκομυκήτων παράγονται εντός σακοειδών κατασκευών (ασκών) και ονομάζονται ασκοσπόρια, ενώ οι ασκοί εδράζονται στο εσωτερικό εγγενών καρποφοριών (αποθήκια, περιθήκια, κλειστοθήκια). Στους Βασιδιομύκητες σχηματίζονται στο άκρο ροπαλοειδών δομών (βασίδια) και ονομάζονται βασιδιοσπόρια, ενώ τα βασίδια σχηματίζονται στα βασιδιοκάρπια. Γενικά τα εγγενή σπόρια των μυκήτων είναι ανθεκτικά στην ξηρασία, το ψύχος και σε ορισμένους χημικούς παράγοντες (Madigan et al., 2007).

#### 1.4.5. Βασιδιομύκητες

Το φύλο των βασιδιομυκήτων σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες εκτιμήσεις υποδιαιρείται σε 3 υποφύλα, 16 κλάσεις, 52 τάξεις, 177 οικογένειες, 1589 γένη και 31.515 είδη (Kirk et al., 2008). Τα τρία βασικά υποφύλα των Βασιδιομυκήτων είναι τα ακόλουθα:

- *Pucciniomycotina*: Τα περισσότερα είδη αυτής της ομάδας είναι παράσιτα φυτών (Aime et al., 2006).
- *Ustilaginomycotina*: Οι πλειοψηφία των ειδών αυτής της ομάδας, γνωστών και ως smut fungi, είναι παράσιτα αγγειοσπέρμων φυτών και κυρίως αγρωστωδών (Begerow et al. 2006).
- *Agaricomycotina*: Στο συγκεκριμένο υποφύλο ανήκει περίπου το ένα πέμπτο των περιγεγραμμένων ειδών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων μανιταριών, των ζελατινοειδών μανιταριών και ορισμένων ζυμών (Millanes et al., 2011). Μέχρι σήμερα αριθμεί περίπου 21.000 είδη (δηλαδή περίπου τα δύο τρίτα των βασιδιομυκήτων (Kirk et al., 2008). Στην συγκεκριμένη ομάδα, συγκαταλέγονται πολλά ξυλοσηπτικά, σαπροτροφικά και εκτομυκορριζικά είδη, μαζί με ορισμένα σημαντικά παθογόνα φυτών και θηλαστικών. Ορισμένα είδη *Agaricomycotina* σχηματίζουν δηλητηριώδη μανιτάρια, ενώ πολλά άλλα θεωρούνται εδώδιμα με ιδιαίτερα αξιολογα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα εδώδιμα είδη μπορεί να είναι τόσο σαπρότροφα, ορισμένα από τα οποία καλλιεργούνται ευρέως (*Agaricus* spp., *Pleurotus* spp. κ.α.) ενώ πολλά είναι συμβιωτικά και συλλέγονται στα φυσικά τους ενδιαιτήματα (*Boletus* spp., *Cantharellus* spp.κ.α.).

Οι περισσότεροι βασιδιομύκητες είναι εδαφογενείς, με σπόρια που διασπείρονται με τον άνεμο, αλλά υπάρχουν και ορισμένοι που διαβιούν στο νερό. Το μυκήλιο τους έχει πολύ μεγάλη διάρκεια ζωής, ενώ υπάρχουν και κάποιοι των οποίων ο θαλλός έχει τη μορφή ζύμης ή είναι διμορφικό (Webster and Weber, 2007).

Ο σχηματισμός κονιδίων και συνεπώς οργάνων αγενούς αναπαραγωγής είναι λιγότερο κοινός στους βασιδιομύκητες. Το κονίδιο μπορεί να σχηματίζονται σε μονοκάρυο ή δικάρυο μυκήλιο ή και στα δύο, όπως επίσης και σε βασιδιόματα. Μπορούν να συμβάλλουν καθοριστικά στην διασπορά του μύκητα, ή να έχουν ρόλο συμπληρωματικό της εγγενούς αναπαραγωγής. Τα παραπάνω ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: τα αρθροκονίδια (ή ωΐδια), τα βλαστικά κονίδια και τα χλαμυδοσπόρια (Webster and Weber, 2007).

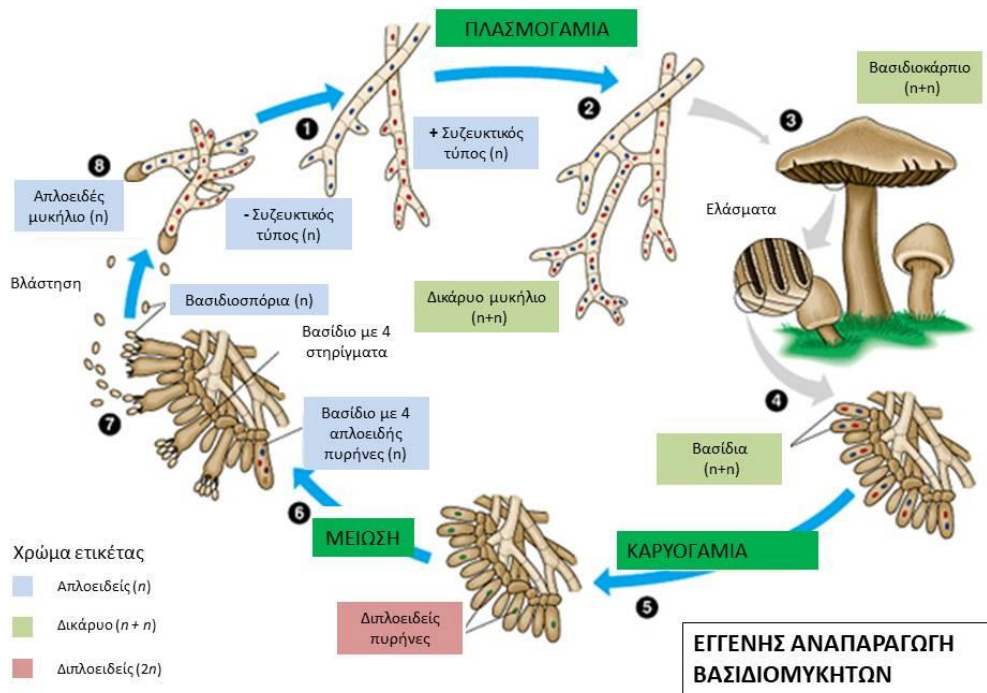
Τα βασίδια αποτελούν τις δομές εγγενούς αναπαραγωγής των βασιδιομυκήτων. Πρόκειται για κύτταρα τα οποία φέρουν εξωτερικά στηρίγματα και 4 συνήθως σπόρια (εξαιρέσεις αποτελούν είδη που σχηματίζουν 1, 2 ή περισσότερα από 4 στηρίγματα σε κάθε βασίδιο). Ο τύπος των βασιδίων αποτελεί ταξινομικό χαρακτηριστικό και ανάλογα με το αν φέρουν ή όχι septa διακρίνονται σε ολοβασίδια ή ομοβασίδια (μονοκύτταρα) και φραγμοβασίδια ή ετεροβασίδια (πολυκύτταρα).

Τα βασιδιοσπόρια αποτελούν τις δομές εγγενούς αναπαραγωγής. Έχουν μέγεθος 3-20 μm και συνήθως βρίσκονται σε ομάδες των τεσσάρων στα στηρίγματα των βασιδίων. Τη στιγμή του αποχωρισμού τους από τα βασίδια είναι κοινοκύτταρα αλλά σε μερικούς βασιδιομύκητες (ετεροβασιδιομύκητες) μπορεί αργότερα να διαχωριστούν με septa. Έχουν ασύμμετρο σχήμα και η επιφάνεια τους είναι λεία ή με επάρματα και πτυχώσεις. Το χρώμα τους ποικίλει από άχρωμο έως μαύρο και εξαρτάται από τις χρωστικές που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα ή τα κυτταρικά τοιχώματα. Η εμφάνιση των χρωστικών στα τοιχώματα καθυστερεί, πράγμα που εξηγεί την αλλαγή χρώματος των ελασμάτων κατά την ωρίμανση των μανιταριών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά των σπορίων αποτελούν ένα από τα βασικότερα ταξινομικά χαρακτηριστικά των βασιδιομυκήτων. Τα βασιδιοσπόρια των περισσότερων βασιδιομυκήτων είναι βαλιστοσπόρια δηλαδή διαθέτουν εγγενείς μηχανισμούς εκτίναξης (με εξαίρεση αυτά των γαστερομυκήτων τα οποία διασπείρονται παθητικά). Λίγο πριν την απομάκρυνση των βαλιστοσπορίων σχηματίζονται σταγόνες υγρού στο σημείο επαφής του σπορίου με τα στηρίγματα. Οι σταγόνες αυτές αυξάνουν σταδιακά σε μέγεθος και οδηγούν στην εκτίναξη του σπορίου. Μετά τον αποχωρισμό τους τα βασιδιοσπόρια μπορούν να διατηρήσουν τη ζωτικότητα τους, παραμένοντας αδρανή εφόσον οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν την βλάστηση τους, για μήνες ή και μερικά χρόνια. Η βλάστηση τους μπορεί να γίνει απευθείας (μέσω του σχηματισμού βλαστικού σωλήνα) ή μέσω του σχηματισμού κονιδίων. Κατά την βλάστηση, πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενες μιτωτικές διαιρέσεις και κατά τα αρχικά στάδια η βλαστική υφή είναι πολυπύρνηνη και κοινοκύτταρη. Κατόπιν, εγκάρσια διαφράγματα (septa) αρχίζουν να σχηματίζονται μετατρέποντας την κοινοκύτταρη υφή σε πολυκύτταρη με ένα πυρήνα σε κάθε τμήμα, σχηματίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο το μονοκύτταρο ή πρωτογενές μυκήλιο.

#### 1.4.6. Βιολογικός κύκλος βασιδιομυκήτων

Ως σημείο εκκίνησης του βιολογικού κύκλου μπορεί να θεωρηθεί το βασιδιοσπόριο το οποίο είναι μονοκύτταρο και απλοειδές (n χρωμοσώματα). Το βασιδιοσπόριο

βλασταίνοντας στη φύση δίνει γένεση σε ένα απλοειδές μυκήλιο (σε κάθε “κύτταρο” των υφών υπάρχει ένας απλοειδής πυρήνας και γι’ αυτό ονομάζεται και μονοκάρυο μυκήλιο). Το μυκήλιο αυτό είναι άγονο (δεν σχηματίζει εγγενείς καρποφορίες), έχει περιορισμένη διάρκεια ζωής στη φύση και σύντομα εκφυλίζεται και πεθαίνει. Αν όμως έλθει σε επαφή με ένα άλλο μονοκάρυο μυκήλιο αντίθετου συζευκτικού τύπου του ίδιου είδους (τα μονοκάρυα διαφορετικού φύλου δεν διαφοροποιούνται μορφολογικά) τότε αναστομώνονται οι υφές στα σημεία επαφής και πραγματοποιείται πλασμογαμία (ένωση πρωτοπλάσμάτων). Οι απλοειδείς πυρήνες αντίθετου φύλου πλησιάζουν μεταξύ τους αλλά δεν συγχωνεύονται σε ένα διπλοειδή-ζυγωτό πυρήνα. Από το σημείο αυτό και μετά αναπτύσσονται υφές οι οποίες σε κάθε “κυτταρικό” διαμέρισμα έχουν ένα ζεύγος πυρήνων αντίθετου συζευκτικού τύπου και γι’ αυτό το μυκήλιο ονομάζεται δικάρυο.



**Εικόνα 1.4.2. Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των βασιδιομυκήτων. (ΠΗΓΗ: Pearson education).**

Η πλασμογαμία μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ειδικά μικρά σπόρια από μονοκάρυα αντίθετου φύλου τα οποία ονομάζονται σπερμάτια. Το δικάρυο μυκήλιο είναι αυτό που έχει την δυνατότητα να παράξει εγγενείς καρποφορίες και θεωρητικά μπορεί να επεκτείνεται συνεχώς. Καθώς αυξάνεται μία δικάρυα υφή, το ζεύγος των πυρήνων του ακραίου κυττάρου διαιρείται ταυτόχρονα μιτωτικά, δίνοντας ένα νέο ζεύγος το οποίο

προχωρεί προς το αυξανόμενο άκρο, ενώ βαθμιαία δημιουργείται ένα νέο εγκάρσιο διάφραγμα πίσω τους. Σε πολλούς βασιδιομύκητες, οι δικάρυες υφές, στα σημεία των εγκαρσίων διαφραγμάτων φέρουν χαρακτηριστικά εξαρτήματα, τα οποία συνδέουν γειτονικά “κύτταρα” και ονομάζονται κρίκοι. Οι κρίκοι σχηματίζονται ταυτόχρονα με το εγκάρσιο διάφραγμα και σχετίζονται με τη συζυγή διαίρεση του ζεύγους των πυρήνων. Κάτω από την επίδραση ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών, το δικάρυο μυκήλιο σχηματίζει τις καταβολές (αρχέγονα) των βασιδιοκαρπίων. Οι καταβολές αυτές μεγαλώνουν σε μέγεθος και ταυτόχρονα διαφοροποιούνται σχηματίζοντας τα διάφορα τμήματα του βασιδιοκαρπίου. Ένα πλήρως αναπτυγμένο τυπικό καρπόσωμα των *Agaricales* αποτελείται από τον πύλο (καπέλο) και τον στύπο (πόδι). Στο κάτω μέρος του πύλου, τοποθετημένα κατακόρυφα και ακτινοειδώς γύρω από το στύπο, υπάρχουν τα ελάσματα. Η επιφάνεια των ελασμάτων και κυρίως η ακμή τους, επενδύεται από το υμένιο έτσι ώστε τα βασίδια να είναι κάθετα στην επιφάνεια του ελάσματος. Στην υποκλάση των *Agaricomycetidae* (όπου ανήκει και η τάξη των *Agaricales*) τα βασίδια είναι κύτταρα ροπαλοειδή ή κυλινδρικά. Ολόκληρο το βασιδιοκάρπιο (μανιτάρι) είναι κατασκευασμένο από δικάρυες υφές (ψευδοϊστό). Μέσα στο βασίδιο οι δύο πυρήνες αντίθετου συζευκτικού τύπου ενώνονται σε ένα διπλοειδή (ζυγωτό) πυρήνα. Ακολουθεί αμέσως μείωση του πυρήνα (ύστερα από διπλασιασμό των χρωματίδων του πυρήνα) που καταλήγει στη δημιουργία 4 νέων απλοειδών πυρήνων (n χρωμοσώματα ο καθένας), ανά δύο αντίθετου συζευκτικού τύπου. Ταυτόχρονα στην κορυφή του βασιδίου σχηματίζονται 4 προεξοχές, τα στηρίγματα. Κάθε ένας από τους πυρήνες, μετακινείται στην άκρη ενός στηρίγματος, το οποίο (άκρο) με χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος και με την εισροή πρωτοπλάσματος βαθμιαία διογκώνεται. Τελικά με το σχηματισμό ενός εγκαρσίου διαφράγματος αποκόπτεται ένα απλοειδές κύτταρο στην άκρη κάθε στηρίγματος, το οποίο θα αποτελέσει το βασιδιοσπόριο. Κάθε βασίδιο σχηματίζει συνήθως 4 βασιδιοσπόρια απλοειδή και ανά δύο αντίθετου “φύλου”. Όταν ωριμάσουν τα βασιδιοσπόρια, εκτινάσσονται από τα στηρίγματα τους, διασπείρονται και όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα βλασταίνουν δίνοντας μονοκάρυα απλοειδή μυκήλια. Στα μανιτάρια της υποκλάσης των *Tremellomycetidae* (τα οποία έχουν ζελατινώδη υφή) τα βασίδια χωρίζονται σε 4 διαμερίσματα με δύο εγκάρσια χωρίσματα τα οποία τέμνονται μεταξύ τους κάθετα κατά μήκος του μεγάλου άξονά τους. Σ’ αυτή την περίπτωση, κάθε διαμέρισμα έχει έναν απλοειδή πυρήνα και το δικό του στήριγμα. Σε πολλά είδη μανιταριών μεταξύ των βασιδίων υπάρχουν χαρακτηριστικά άγωνα στοιχεία τα οποία ονομάζονται κυστίδια και των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι επίσης χρήσιμα στην ταξινόμηση.



#### 1.4.7. Μύκητες λευκής σήψης

Οι μύκητες που έχουν τη δυνατότητα να αποδομούν τα συστατικά του ξύλου, μπορούν να χωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, τους μύκητες λευκής, φαιάς και μαλακής σήψης. Οι δύο πρώτες κατηγορίες περιλαμβάνουν μύκητες που ταξινομικά ανήκουν στους βασιδιομύκητες, ενώ η τελευταία στους ασκομύκητες. Οι μύκητες λευκής σήψης αποδομούν όλα τα συστατικά του ξύλου, συμπεριλαμβανομένης της λιγνίνης και προσδίδουν στο ξύλο μια χαρακτηριστική λευκή απόχρωση. Οι περισσότεροι αναπτύσσονται σε ξύλο σκληρών δέντρων (βελανιδιάς, οξιάς κ.α.) αλλά υπάρχουν και ορισμένοι που απαντώνται κυρίως σε κωνοφόρα όπως τα είδη *Heterobasidion annosum*, *Phellinus pini* και *Phlebia radiata*.

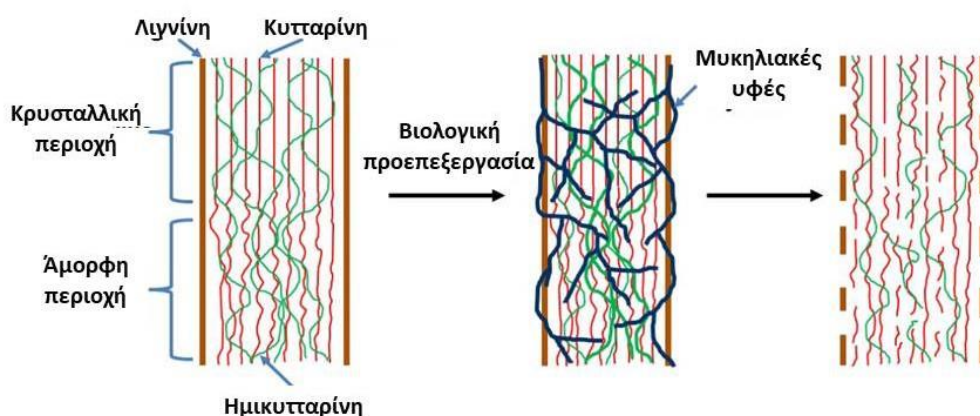
Η αποδόμηση της λιγνίνης από τους μύκητες λευκής σήψης επιτυγχάνεται με δύο τρόπους δράσης (εκλεκτική και μη εκλεκτική διάσπαση). Η εκλεκτικότητα όσον αφορά την αποδόμηση της λιγνίνης, εξαρτάται από το είδος του ξύλου, την περίοδο ανάπτυξης του μύκητα και άλλους, ήσσονος σημασίας παράγοντες (Hatakka and Hammel, 2010). Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι μυκήτων λευκής σήψης που εμφανίζουν εκλεκτική υποβάθμιση της λιγνίνης κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι οι *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Phanerochaete chrysosporium* και *Phlebia radiata*. Διαδεδομένα είδη που χαρακτηρίζονται από μη εκλεκτικό μηχανισμό αποδόμησης είναι οι *Trametes versicolor* και *Fomes fomentarius*. Στον εκλεκτικό τρόπο δράσης, η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη αποδομούνται, ενώ η κυτταρίνη παραμένει ανεπηρέαστη. Αντίθετα, στην μη εκλεκτική διάσπαση, αποδομείται περίπου όμοιο ποσοστό κάθε κλάσματος της λιγνοκυτταρίνης (Gao et al., 2010).

Όσον αφορά την αποδόμηση της λιγνίνης οι παραπάνω μύκητες αντιμετωπίζουν τρεις ιδιαίτερες προκλήσεις: (1) το πολυμερές της λιγνίνης έχει μεγάλο μέγεθος και ως εκ τούτου το λιγνινολυτικό σύστημα είναι εξωκυτταρικό, (2) η δομή της λιγνίνης απαρτίζεται από δεσμούς άνθρακα-άνθρακα και αιθέρα με συνέπεια ο μηχανισμός αποδόμησης να πρέπει να είναι οξειδωτικός και όχι υδρολυτικός και (3) η στερεοχημική δομή του πολυμερούς της λιγνίνης είναι ακανόνιστη με αποτέλεσμα οι λιγνινολυτικοί παράγοντες να είναι πολύ λιγότερο εκλεκτικοί σε σχέση με τα ένζυμα αποδόμησης (Kirk and Cullen, 1998). Στα επιφορτισμένα με την αποδόμηση της λιγνίνης ένζυμα, όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.1.6, περιλαμβάνονται οι Lip, Lac, MnP, VP, GLOX και AAO (Gao et al., 2010, Wong 2009). Αξίζει να αναφερθεί ότι η λακάσση και η υπεροξειδάση του μαγγανίου επάγονται από όλους τους μύκητες λευκής σήψης, ενώ η υπεροξειδάση της λιγνίνης έχει ανιχνευτεί σε λίγα μόνο

είδη. Εκτός αυτών, οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν κυτταρινάσες, ξυλανάσες και άλλες ημικυτταρινάσες (Gao et al., 2010).

#### 1.4.8. Επίδραση της βιολογικής επεξεργασίας στα χαρακτηριστικά της φυτικής βιομάζας

Η βιολογική επεξεργασία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης διαφοροποιεί τα βιοχημικά και φυσικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 1.4.3.). Η αποδόμηση της λιγνίνης έχει γίνει αντικείμενο μελέτης σε πολλές εργασίες στο παρελθόν. Έτσι, φάνηκε ότι η μείωση της λιγνίνης σε άχυρο καλαμποκιού μετά την επεξεργασία του με τον μύκητα *T. versicolor* έφτασε το 54,6% (Yu et al., 2010b), η αντίστοιχη του μπαμπού μειώθηκε περισσότερο από 20% μετά από 4 εβδομάδες ανάπτυξης του *Echinodontium taxodii* και του *T. versicolor* (Zhang et al., 2007b), ενώ σε άχυρο σίτου άγγιξε το 39,7% μετά την επεξεργασία του με τον *P. ostreatus* (Zadrazil and Puniya, 1994).



Εικόνα 1.4.3.. Σχηματική απεικόνιση της βιολογικής επεξεργασίας της λιγνοκυτταρίνης. Οι μύκητες λευκής σήψης μειώνουν την περιεχόμενη λιγνίνη και αλλάζουν τη χημική και φυσική δομή της λιγνοκυτταρίνης καθιστώντας πιο εύκολη την βιοαποδόμηση της (ΠΗΓΗ: Isroi et al., 2011).

Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν τη μοναδική ικανότητα να αποπολυμερίζουν τους δεσμούς C-C, ανοργανοποιώντας τη λιγνίνη με τη βοήθεια των λιγνινολυτικών ενζύμων. Έρευνες με επισημασμένη λιγνίνη με  $C^{14}$  έδειξαν ότι τη μετατρέπουν σε  $^{14}CO_2$  (Hofrichter et al., 1999). Τα είδη *P. ostreatus* και *Bjerkandera adusta*, αποδείχθηκαν ιδιαίτερα εκλεκτικά στην αποδόμηση της λιγνίνης με βάση πειράματα με  $^{14}C$ -λιγνίνη (Agosin et al., 1985). Αλλαγές στην αναλογία μεταξύ p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) και syringyl (S) στο μόριο της λιγνίνης μελετήθηκαν μέσω πυρόλυσης, αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, 10 U υπεροξειδάσης ανά mg αχύρου μείωσαν το λόγο

φαινολικών Η μονάδων κατά 3 έως 31%, τις μονάδες G κατά 4 έως 40%, ενώ αφαίρεσαν ολοκληρωτικά τη μικρή ποσότητα φαινολικών S μονάδων που υπήρχαν στο άχυρο (Camarero et al., 2001). Έτσι, προτάθηκε ότι η ευαισθησία των υπομονάδων της λιγνίνης ακολουθεί τη σειρά S>G>H. Γενικά, λιγνίνη πλούσια σε S μονάδες είναι πιο ευαίσθητη στη μυκητιακή αποδόμηση συγκριτικά με τις υπόλοιπες μονάδες (Valmaseda et al., 1991).

Η ημικυτταρίνη αποτελεί το ευκολότερα αποδομήσιμο συστατικό των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Μύκητες λευκής σήψης όπως οι *P. chrysosporium* (Kirik and Cullen, 1998), *Phlebia floridensis* (Sharma and Arora, 2010), *C. subvermispora* (Mendonca et al., 2008), *P. ostreatus* (Baldrian et al., 2005) και *P. dryinus* (Kachlishvili et al., 2005) έχει αποδειχτεί ότι παράγουν πληθώρα ενδο-ξυλανασών. Η ανάλυση της σύστασης σε σπάδικες καλαμποκιού μετά την ανάπτυξη μυκήτων λευκής σήψης, έδειξε ότι η ημικυτταρίνη μειώθηκε κατά 24,4 – 34,9% (Yang et al., 2010). Η επεξεργασία του παραπάνω υπολείμματος με τη χρήση του *Ceriperiopsis subvermispora* για 18 ημέρες επέφερε μείωση μέχρι και 22,5%, ενώ σε ξύλο κινέζικης ιτιάς που αποδομήθηκε από το *Echinodontium taxodii* για 120 ημέρες η μείωση έφτασε το 54,8% (Yu et al., 2009a).

Τέλος, οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρινολυτικών ενζύμων με διαφορετικό βαθμό εκλεκτικότητας. Οι κυτταρινάσες υδρολύουν τους β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς της κυτταρίνης. Οι μη εκλεκτικοί μύκητες λευκής σήψης αποδομούν σχεδόν ισόποσα τα τρία βασικά κλάσματα των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Αντίθετα, αυτοί που χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα επηρεάζουν ελάχιστα τα μόρια της κυτταρίνης (Sharma and Arora, 2015) και είναι καταλληλότεροι για τη βιολογική προεπεξεργασία όταν απαιτείται η παραμονή της κυτταρίνης στο τελικό προϊόν. Επιπλέον, XRD αναλύσεις απέδειξαν ότι η κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης μειώνεται μετά τη βιολογική επεξεργασία. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας σε άχυρο ρυζιού μειώθηκε κατά 44% σε ανεπεξέργαστο υλικό σε σχέση με 15% σε βιολογικά επεξεργασμένο με τη χρήση του *P. chrysosporium* (Zeng et al., 2011). Αντιθέτως, ο δείκτης κρυσταλλικότητας στο ίδιο υλικό δεν μειώθηκε μετά την επεξεργασία με τον *Dichomitus squalens* (Bak et al., 2010). Η ίδια διαδικασία σε ξύλο *Pinus densiflora* έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και αυξάνει τον αριθμό των πόρων με μέγεθος πάνω από 120 nm (Lee et al., 2007).

Η επιφάνεια της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας έχει επίσης μελετηθεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (SEM). Με βάση την εικόνα τους, τα υλικά έδειξαν σημαντικές φυσικές αλλαγές στην επιφάνεια τους μετά την επεξεργασία με μύκητες λευκής σήψης. Οι

Yu et al. (2010), επισήμαναν ότι η βιολογική επεξεργασία είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ακανόνιστων οπών στην επιφάνεια του άχυρου καλαμποκιού. Αυτό συνεπάγεται ότι αυξάνεται τόσο το πορώδες όσο και η ειδική επιφάνεια του υποστρώματος. Η ανάπτυξη του *Irpex lacteus* σε σπάδικες καλαμποκιού αύξησε σημαντικά τον όγκο και το μέγεθος των πόρων (Xu et al., 2010). Η καλλιέργεια του *P. chrysosporium* σε άχυρο σίτου οδήγησε σε αύξηση της επιφάνειας, υποδεικνύοντας σημαντική μείωση ή μετατροπή της λιγνίνης, καθιστώντας προσβάσιμες τις επιφάνειες της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (Zeng et al., 2011). Τέλος, η επιφάνεια του άχυρου ρυζιού απέκτησε τραχιά εμφάνιση λόγω της δράσης του *D. squalens* και κατέστη περισσότερο εύθραυστη (Bak et al., 2010).

#### 1.4.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την επεξεργασία της λιγνοκυτταρίνης με μύκητες λευκής σήψης

Η δραστηριότητα των μυκήτων λευκής σήψης και η παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το στέλεχος του μύκητα, τη συγκέντρωση και την πηγή του αζώτου, την προσθήκη  $Mn^{2+}$  και  $Cu^{2+}$ , τον αερισμό, την υγρασία, το pH και τη θερμοκρασία. Έτσι, η αποτελεσματικότητα των μυκήτων λευκής σήψης στη βιοαποδόμηση μπορεί να βελτιωθεί. Διατροφικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την αποδόμηση της λιγνίνης τόσο σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης όσο και σε υγρές καλλιέργειες. Σε παλιότερες εργασίες (Kirk et al., 1978) η αποδόμηση της λιγνίνης αναφέρθηκε ότι επηρεαζόταν από τη συγκέντρωση του αζώτου, την ανάδευση, τη συγκέντρωση του  $O_2$ , το pH και τις περιεχόμενες βιταμίνες. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη οι παραπάνω παράγοντες ώστε να επιτυγχάνεται το επιθυμητό αποτέλεσμα.

##### 1.4.9.1 Στέλεχος του μύκητα

Μεταξύ των μυκήτων λευκής σήψης, κάποιοι παράγουν όλα τα λιγνινολυτικά ένζυμα, ενώ ορισμένοι διαθέτουν μικρότερο βιοχημικό οπλοστάσιο (Elisashvili et al., 2008). Για παράδειγμα, τα είδη *Pleurotus pulmonarius* ("*P. sajor caju*") και *Lentinula edodes* παράγουν MnP και Lac αλλά όχι LiP όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα

τη γλυκόζη. Αντίθετα το *P. chrysosporium* έχει αναφερθεί ότι παράγει και τα τρία προαναφερθέντα ένζυμα (Isroi et al., 2015, Rivela et al., 2000).

Συνήθως, το πρώτο βήμα στην αξιοποίηση του δυναμικού των μυκήτων λευκής σήψης είναι η διερεύνηση πολλών στελεχών όσον αφορά τη λιγνινολυτική τους ικανότητα και την παραγωγή ενζύμων στα εκάστοτε υποστρώματα. Σε μία από τις παλαιότερες σχετικές εργασίες (Hatakka, 1983), 19 στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ενζυμική υδρόλυση του αχύρου και μετά από 5 εβδομάδες, 35% του αρχικού υποστρώματος είχε μετατραπεί σε απλά σάκχαρα (κυρίως μονομερή γλυκόζης) μέσω του *P. ostreatus*. Αντίθετα, μόνο το 12% μετατράπηκε σε απλά σάκχαρα στον μάρτυρα, το 42% των οποίων αντιστοιχούσε σε γλυκόζη. Όμως η επιλεκτική αποδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών εξαρτάται και από το υπόστρωμα. Για παράδειγμα τα είδη *Pleurotus*, αποδομούν επιλεκτικά τη λιγνίνη του αχύρου, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο και σε σκληρό (οξιά) ή μαλακό (πεύκο) ξύλο (Hatakka, 1983). Σε πιο πρόσφατη μελέτη, η διερεύνηση τεσσάρων στελεχών για την προεπεξεργασία αχύρου ρυζιού, ακολουθούμενη από ενζυματική υδρόλυση, έδειξε ότι ο *P. ostreatus* προτίμησε την αποδόμηση της λιγνίνης σε σχέση με τους πολυσακχαρίτες, ενώ οι *P. chrysosporium* και *C. subvermispora*, αποδόμησαν εξίσου αποδοτικά τα παραπάνω συστατικά (Taniguchi et al., 2005).

Η ικανότητα των μυκήτων λευκής σήψης στην αποδόμηση της λιγνίνης μπορεί επίσης να μελετηθεί και μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Σε μια σχετική εργασία αποδείχθηκε η ικανότητα 29 στελεχών στην επιλεκτική αποδόμηση της λιγνίνης από ξύλο πλατύφυλλων και κωνοφόρων δέντρων (Blanchette, 1984). Παρομοίως, έχει μελετηθεί η ικανότητα 32 απομονώσεων στην αποδόμηση αχύρου σίτου για την παραγωγή βιοαερίου (Muller and Trosch, 1986). Μεταξύ αυτών, η προεργασία με τον μύκητα *P. ostreatus* έδειξε ότι επιφέρει την μέγιστη μείωση στο κλάσμα της λιγνίνης, με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της παραγόμενης ποσότητας βιοαερίου συγκριτικά με τα υπόλοιπα.

#### 1.4.9.2 Πηγή και συγκέντρωση αζώτου

Η συγκέντρωση του αζώτου παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων τόσο σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης όσο και σε υγρές καλλιέργειες. Ωστόσο, η επίδραση του αζώτου ποικίλει ανάμεσα στα διαφορετικά είδη ή ακόμη και τα στελέχη του ίδιου είδους που εξετάζονται. Από πολύ νωρίς (Kirk et al., 1978) έχει επισημανθεί, ότι εκτός από τη συγκέντρωση, η πηγή του αζώτου επηρεάζει σημαντικά την αποδόμηση της λιγνίνης

στο είδος *P. chrysosporium*. Επιπλέον, μειούμενης της συγκέντρωσης του αζώτου σε υπολείμματα κάνναβης, αποδείχθηκε ότι μπορεί να βελτιωθεί κατά πολύ η παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων σε είδη του γένους *Bjerkandera* (Dorado et al., 2001). Αντίθετα, η ενεργότητα λιγνινολυτικών ενζύμων (Lac, MnP και υπεροξειδασών) στο είδος *P. ostreatus*, μειώθηκε όταν στο μέσο καλλιέργειας προστέθηκε ανόργανης προέλευσης άζωτο. Επιπλέον, ο εμπλουτισμός με οργανική πηγή αζώτου (πεπτόνη, καζεΐνη), σε μικρές συγκεντρώσεις έδειξε θετική επίδραση στα παραπάνω ένζυμα παραγόμενα από είδη του γένους *Pleurotus* (Mikiashvili et al., 2006). Η διαφορετική απόκριση ανάλογα με την πηγή του αζώτου έχει επίσης επιβεβαιωθεί από τους Stajic et al. (2006a). Η μέγιστη παραγωγή Lac στα είδη *P. ostreatus* και *P. eryngii*, παρατηρήθηκε όταν σαν πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Επιπροσθέτως, η παραγωγή υπεροξειδασών με τη χρήση του *P. ostreatus* επετεύχθη μόνο όταν προστέθηκε πεπτόνη ως πηγή άνθρακα (Isroi et al., 2015).

Στην περίπτωση του *L. edodes*, ανιχνεύτηκε παραγωγή Lac όταν ο μύκητας αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα με υψηλό περιεχόμενο αζώτου (Buswell et al., 1995). Η επαγωγή της LiP σε είδη *Bjerkandera* παρατηρήθηκε σε περιβάλλον επάρκειας N (σε μέσο με γλυκόζη και πεπτόνη), ενώ δεν σημειώθηκε όταν περιορίστηκε η συγκέντρωση του αζώτου (Isroi et al., 2015). Η παραγωγή της LiP επάγεται από την παρουσία πεπτιδικών συστατικών του συγκεκριμένου μέσου, αλλά και από την πρωτεΐνη σόγιας. Επιπλέον, η παραγωγή της MnP αυξάνεται σε υποστρώματα που περιέχουν οργανικής προέλευσης άζωτο, ενώ χαμηλότερη ενεργότητα παρατηρείται σε συνθήκες έλλειψης N. Η πεπτόνη επάγει την παραγωγή της LiP σε όλες τις τιμές pH που εξετάστηκαν, ενώ η μέγιστη ενεργότητα σημειώθηκε στην τιμή pH 7,3 (Isroi et al., 2015).

Η διαφορετική απόκριση μεταξύ των ειδών ή ακόμη και των στελεχών των μυκήτων λευκής σήψης ανάλογα με την πηγή και την συγκέντρωση αζώτου οφείλεται πιθανώς στο διαφορετικό μεταβολισμό του αζώτου. Σε παλιότερη εργασία (Li et al., 1994), η επαγωγή της LiP στο *P. chrysosporium* ρυθμίστηκε σε επίπεδο γονιδιακής μεταγραφής επηρεαζόμενη από την πηγή αζώτου. Χαμηλή συγκέντρωση αζώτου, ιδιαίτερα οργανικής προέλευσης, χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων και την αναβάθμιση της αποδόμησης της λιγνίνης μέσω των μυκήτων λευκής σήψης. Σε άλλη εργασία φάνηκε ότι η επαγωγή της LiP εξαρτάται από τον συνδυασμό του pH και της πηγής του αζώτου (Sánchez, 2009). Έτσι μείγμα αμινοξέων και αμμωνίου οδήγησε στην επαγωγή της LiP μόνο σε τιμές pH από 6,0 έως 7,3.

### 1.4.9.3 Προσθήκη Mn<sup>2+</sup> και Cu<sup>2+</sup>

Η προσθήκη στοιχείων όπως τα Mn<sup>2+</sup> και Cu<sup>2+</sup> έχουν εκτενώς μελετηθεί όσον αφορά την επίδραση τους στην αποδόμηση της λιγνίνης από μύκητες λευκής σήψης (Isroi et al., 2015). Η επαγωγή και παραγωγή της MnP ρυθμίζεται από την παρουσία Mn<sup>2+</sup> στο μέσο ανάπτυξης. Το Mn<sup>2+</sup>, έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *mnp*. Σύμφωνα με τους Vrsanska et al. (2016), η παρουσία του Mn<sup>2+</sup> επηρεάζει καθοριστικά την παραγωγή των ενζύμων LiP και MnP. Με την απουσία Mn<sup>2+</sup> προάγεται η επαγωγή των εξωκυτταρικών LiP ισοενζύμων, ενώ με την παρουσία του κυριαρχεί αυτή των MnP. Η ρυθμιστική αυτή ικανότητα του Mn<sup>2+</sup> έχει αναφερθεί σε πέντε είδη μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων δύο ειδών του γένους *Phanerochaete* και ειδών *Phlebia*, των *Lentinula edodes* και *Phellinus pini*. Η LiP επάγεται αποκλειστικά όταν η συγκέντρωση του Mn<sup>2+</sup> είναι χαμηλή (0,3 – 1,6 ppm). Άλλα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η ανοργανοποίηση της συνθετικής λιγνίνης αυξάνεται με την προσθήκη Mn<sup>2+</sup> (στο εύρος από 30 έως 620 mg) για το είδος *P. ostreatus*, ενώ η προσθήκη Mn<sup>2+</sup> (0,3 mM) στο μέσο ανάπτυξης οδήγησε σε αύξηση της ανοργανοποίησης κατά 125% με τη χρήση του είδους *P. pulmonarius* (Isroi et al., 2015).

Ο χαλκός έχει διαπιστωθεί ότι συμμετέχει στην κρυσταλλική δομή της λακάσσης (Polyakov et al., 2009). Η προσθήκη Cu<sup>2+</sup> αναφέρεται ότι προάγει την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων και είναι ο πιο αποδοτικός επαγωγέας της Lac (Yang et al., 2013). Η προσθήκη Cu<sup>2+</sup> (25 mM) αύξησε την ενεργότητα της Lac από 270 στα 1420 U/L σε καλλιέργειες του *P. pulmonarius* (Tychanowicz et al., 2006). Επιπλέον, συγκέντρωση 1 mM του παραπάνω στοιχείου σε καλλιέργεια *P. ostreatus* σε υγρά μέσα με περιορισμένα επίπεδα αζώτου οκταπλασίασε την παραγωγή της Lac (Baldrian and Gabriel, 2002). Άλλα αποτελέσματα δείχνουν ότι η βέλτιστη προσθήκη Cu<sup>2+</sup> για την παραγωγή λακκάσσης στο *P. ostreatus* είναι 1 mM (Stajic et al., 2006b). Η αύξηση της ποσότητας Cu<sup>2+</sup> σε συγκέντρωση υψηλότερη των 0,3 mM ανέστειλε τη μυκηλιακή ανάπτυξη και μείωσε την ενεργότητα της Lac στο *P. ostreatus* (Patel et al., 2009b). Ταυτόχρονη προσθήκη Cu<sup>2+</sup> και λιγνίνης μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση από 8 U/ml (μόνο με την προσθήκη Cu<sup>2+</sup>) στα 12 U/ml με την ταυτόχρονη χορήγηση Cu<sup>2+</sup> και λιγνίνης (Tinoco et al., 2010). Τέλος, νανοσωματίδια χαλκού και σιδήρου επάγουν την παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων, αλλά μειώνουν σημαντικά αυτή των υδρολυτικών ενζύμων (β-γλυκοσιδάση, β-ξυλοσιδάση και υδρολάση της κελλοβιόζης) (Shah et al., 2010).

Συμπερασματικά, η προσθήκη Mn<sup>2+</sup> και Cu<sup>2+</sup> σε συγκριμένες συγκεντρώσεις στο μέσο καλλιέργειας των μυκήτων λευκής σήψης δύναται να επάγει την παραγωγή λιγνινολυτικών

ενζύμων. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του  $Mn^{2+}$  μπορεί να επηρεάσει την ενεργότητα των MnP και LiP, ενώ αυτή του  $Cu^{2+}$  την ενεργότητα της Lac.

#### 1.4.9.4 Αερισμός

Ο αερισμός είναι μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την παραγωγή και την ενεργότητα των λιγνινολυτικών ενζύμων. Ο αερισμός επιδρά στην οξυγόνωση της καλλιέργειας, στην αποβολή του πλεονάζοντος  $CO_2$ , στη διατήρηση της θερμοκρασίας, καθώς και στην διασπορά της υγρασίας και των πτητικών ενώσεων που παράγονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Το πορώδες του υλικού μέσου ανάπτυξης επηρεάζει τον ρυθμό αερισμού με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των  $O_2$  και  $CO_2$  να πρέπει να βελτιστοποιηθεί για κάθε τύπο μέσου, μικροοργανισμού και διαδικασίας (Graminda et al., 2008). Η αποδόμηση της λιγνίνης αποτελεί μια αερόβια διεργασία και η αντικατάσταση του αέρα με  $O_2$  επιταχύνει την αποδόμηση της λιγνίνης σε πολλά είδη μυκήτων λευκής σήψης, τα οποία αναπτύχθηκαν σε άχυρο και ξύλο (Isroi et al., 2015). Ο εμπλουτισμός της ατμόσφαιρας με οξυγόνο προωθεί επίσης την αποδόμηση άλλων συστατικών πέραν της λιγνίνης. Η μελέτη της παραγωγής LiP από το *P. chrysosporium* έδειξε ότι αυτή αυξάνεται με την αύξηση του αερισμού του μέσου (Couto et al., 2002). Αντίθετα, η παραγωγή της MnP δεν επηρεάζεται σημαντικά από τον αερισμό. Σε άλλη εργασία, αποδείχθηκε ότι ο αερισμός του αντιδραστήρα με ρυθμό 0,5 vvm οδήγησε σε μεγιστοποίηση της ενεργότητας των MnP και LiP που παράγονται από το *P. chrysosporium* (574 και 116 U/L αντίστοιχα) (Belinky et al., 2003). Φάνηκε επίσης ότι ο αερισμός της καλλιέργειας του *P. chrysosporium* με καθαρό  $O_2$  μπορεί να αυξήσει την ενδοκυτταρική παραγωγή LiP και MnP. Αντίθετα, η επεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων με τη χρήση των *Trametes versicolor* και *Phanerochaete flavidobrunnea* ενισχύθηκε σε συνθήκες χαμηλού αερισμού (Lopez et al., 2002).

#### 1.4.9.5 Περιεχόμενη υγρασία

Η περιεχόμενη υγρασία σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης είναι καθοριστικός παράγοντας για τη μυκηλιακή ανάπτυξη και την ενζυμική ενεργότητα και ως εκ τούτου επηρεάζει σημαντικά την αποδόμηση της λιγνίνης (Shi et al. 2008). Η περιεχόμενη υγρασία ορίζεται ως η αρχική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε νερό πριν τον εμβολιασμό με τον μύκητα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Το συνηθισμένο εύρος της υγρασίας του υποστρώματος σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης κυμαίνεται από 60 έως 80% (Isroi et al., 2015).



Διάφορες αναφορές επισημαίνουν ότι ο χαμηλός λόγος στερεού/υγρό είναι περισσότερο ευεργετικός για την παραγωγή των MnP και LiP. Η ζύμωση του αχύρου αναφέρεται ότι βελτιστοποιείται όταν η υγρασία του είναι 75 ml / 25 g υποστρώματος (Zadrazil and Brunnert, 1981). Ωστόσο, τα περισσότερα είδη που έχουν μελετηθεί, μπορούν να αποδομήσουν το άχυρο σε μεγάλο εύρος τιμών υγρασίας. Σε συνθήκες υψηλότερης περιεκτικότητας νερού (125-150 ml / 25 g υποστρώματος) παρατηρήθηκε αύξηση των εναέριων υφών. Η παραγωγή της λακκάσης στο είδος *P. pulmonarius* επηρεάστηκε θετικά από την αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας από 40% σε 60% (Patel et al., 2009b). Οι Shi et al. (2008) διερεύνησαν την επίδραση της υγρασίας του υποστρώματος, της συγκέντρωσης των ανόργανων αλάτων και του χρόνου της καλλιέργειας στην προεπεξεργασία στελεχών βαμβακιού με το *P. chrysosporium*. Η υγρασία και ο χρόνος καλλιέργειας επηρέασαν σημαντικά την αποδόμηση της λιγνίνης. Το μέγιστο ποσοστό υγρασίας του υποστρώματος (75 και 80%) οδήγησε σε αύξηση της αποδόμησης της λιγνίνης κατά 6% σε σχέση με χαμηλότερες τιμές υγρασίας (65%). Ωστόσο, το βέλτιστο ποσοστό υγρασίας εξαρτάται τόσο από τον οργανισμό όσο και από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται. Αυξανόμενη της υγρασίας μειώνεται το πορώδες του υποστρώματος και συνεπώς η μεταφορά οξυγόνου. Η ενεργότητα της Lac στο *P. pulmonarius* μειώθηκε όταν η υγρασία αυξήθηκε από 60% σε 80% (Patel et al., 2009b).

#### 1.4.9.6 Συγκέντρωση ιόντων Η (pH)

Η επίδραση του pH είναι επίσης καθοριστικής σημασίας για την καλλιέργεια των μυκήτων, αλλά είναι πρακτικά δύσκολο να προσδιοριστεί σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης (Holker et al., 2004). Οι περισσότεροι μύκητες λευκής σήψης αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε τιμές pH μεταξύ 4 και 5 (Isroi et al., 2015). Πολλοί μύκητες λευκής σήψης έχει παρατηρηθεί ότι μειώνουν το pH του υποστρώματος κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους (Rouchel et al., 2016). Η παραγωγή και η ενεργότητα των λιγνινολυτικών ενζύμων επίσης επηρεάζεται από την οξύτητα του υποστρώματος. Η μέγιστη ενεργότητα των ενζύμων LiP και MnP από τον μύκητα *P. chrysosporium* σημειώθηκε όταν οι αρχικές τιμές του pH ήταν 4,0 και 5,5 αντίστοιχα (Xu et al., 2001). Η στερεά ζύμωση με επιλεγμένους μύκητες λευκής σήψης αποδείχθηκε ότι οδήγησε σε μείωση του pH κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Τα είδη *Vararia effusata* και *D. squalens* έχοντας παρόμοια συμπεριφορά στην ανάπτυξή τους, οδήγησαν σε μείωση του pH έως την τιμή 4,9 και 4,2 αντίστοιχα (Isroi et al., 2015). Η βέλτιστη τιμή pH για την παραγωγή Lac από τον μύκητα *P. ostreatus* παρατηρήθηκε ότι είναι το 5,0. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή του παραπάνω ενζύμου μειώθηκε όταν η οξύτητα

αυξήθηκε σε τιμές μεγαλύτερες του 5,0. Έχει αναφερθεί ότι οι αλλαγές στην παραγωγή της Lac οφείλονται στο γεγονός ότι η διακύμανση του pH επιφέρει αλλαγές στην τρισδιάστατη δομή της Lac (Patel et al., 2009b).

#### 1.4.9.7 Θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό παραγωγής και την εκλεκτικότητα της διαδικασίας απολιγνινοποίησης διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών μυκήτων. Οι περισσότεροι μύκητες λευκής σήψης είναι μεσόφιλοι, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης από 15 έως 35 °C (Isroi et al., 2015). Διαφορετικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τη βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής λιγνολυτικών ενζύμων σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική παραγωγή στο *P. chrysosporium* είναι οι 39 °C (Xu et al., 2001). Αντίθετα, οι Asther et al. (1998) αναφέρουν ως βέλτιστη θερμοκρασία μυκηλιακής ανάπτυξης τους 37 °C, ενώ στους 30 °C φαίνεται ότι μεγιστοποιείται η παραγωγή της υπεροξειδάσης της λιγνίνης. Ωστόσο, τα *G. applanatum*, *P. ostreatus* και *Panellus serotinus* εμφάνισαν μικρότερη αποδόμηση της λιγνίνης στους 30 °C συγκριτικά με τους 22 °C, ενώ μόνο στο *T. hirsuta* παρατηρήθηκαν αντίθετα αποτελέσματα (Zadrazil and Brunnert, 1981). Διαφορετικές βέλτιστες θερμοκρασίες σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης για την επεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων συνδέονται με τη φυσιολογία των μυκήτων, το στέλεχος και τον εκάστοτε τύπο του υποστρώματος. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή Lac στο *P. ostreatus* αναφέρθηκε ότι είναι οι 28 °C (Patel et al., 2009b). Τέλος, αξίζει να τονιστεί ότι ο μεταβολισμός των μυκήτων λευκής σήψης κατά την αποδόμηση της λιγνίνης παράγει θερμότητα, η οποία μπορεί να φτάσει σε επίπεδα αναστολής της αύξησης αν δεν ρυθμιστεί εγκαίρως.

## 1.5 Καλλιέργειαμανιταριών σε λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα και αγρα-βιομηχανικά παραπροϊόντα

### 1.5.1. Γενικά

Τεράστιες ποσότητες φυτικών υπολειμμάτων και αγραβιομηχανικών παραπροϊόντων όπως προαναφέρθηκε παραμένουν κάθε χρόνο ανεκμετάλλευτες, προκαλώντας σε πολλές περιπτώσεις σημαντικά προβλήματα ρύπανσης. Μόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση, παράγονται ετησίως περισσότερα από 80 εκατ. τόνοι αχύρου σιτηρών και σπάδικες καλαμποκιού (<http://faostat.fao.org>, και <http://www.indexmundi.com/agriculture>), ταυτόχρονα με πολλά ακόμη παραπροϊόντα παρόμοιας προέλευσης (διάφορα αγραωστώδη, υπολείμματα κλαδέματος δέντρων, φλοιοί και ροκανίδια ξύλου, απόβλητα ελαιολιτριβείων κ.α.). Η σύσταση πολλών από αυτά (πλούσια σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά) τα καθιστά κατάλληλα για την προετοιμασία υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών. Στον Πίνακα 1.5.1. παρουσιάζεται η σύσταση των κυριότερων (από άποψη παραγόμενης ποσότητας) λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, όπως προέκυψε από ανεξάρτητες έρευνες.



Εικόνα 1.5.1. Στάδια προετοιμασίας τους υποστρώματος και της καλλιέργειας μανιταριών

Η καλλιέργεια των μανιταριών αποτελεί μια αξιοσημείωτη περίπτωση ολοκληρωμένης διαχείρισης-αξιοποίησης γεωργικών, δασικών και αγροβιομηχανικών παραπροϊόντων, μέσω μιας ελεγχόμενης διαδικασίας στερεάς ζύμωσης με την οποία μετατρέπονται σε εδώδιμη βιομάζα. Τέτοιες βιομετατροπές, βασίζονται σε καθιερωμένες μεθοδολογίες, οι οποίες περιλαμβάνουν διακριτά στάδια μεταξύ των οποίων η προετοιμασία του υποστρώματος (διαβροχή, ανάμιξη και συχνά κομποστοποίηση των υλικών), παστερίωση ή αποστείρωση, εμβολιασμός, επώαση (πλήρης αποικισμός του υποστρώματος από τις μυκηλιακές υφές) και σχηματισμός, ανάπτυξη και συλλογή των μανιταριών (Εικόνα 1.5.1.). Οι εφαρμογή και διατήρηση των κατάλληλων περιβαλλοντικών συνθηκών κατά την καλλιέργεια του μύκητα είναι απαραίτητη για τη μείωση του συνολικού χρόνου που απαιτείται, τη μεγιστοποίηση της απόδοσης και την παραγωγή υψηλής ποιότητας τελικού προϊόντος. Οι παραπάνω συνθήκες, σε συνδυασμό με την επιλογή του κατάλληλου στελέχους και του υποστρώματος ανάπτυξης, αποτελούν τους κρίσιμότερους παράγοντες για την επιτυχή καλλιέργεια του εκάστοτε είδους και αποτελούν αντικείμενο έρευνας.

Πρόσφατα, η παγκόσμια παραγωγή μανιταριών υπολογίστηκε σε 27 εκατομμύρια τόνους, παρουσιάζοντας αύξηση κατά 25 φορές τα τελευταία 40 χρόνια (Roysse, 2014). Περίπου τα δύο τρίτα της προαναφερθείσας ποσότητας προέρχεται από την Κίνα. Παράλληλα, η κατά κεφαλήν κατανάλωση των μανιταριών τετραπλασιάστηκε από το 1997, αγγίζοντας σήμερα τα 4 kg ανά άτομο. Πέντε είδη μανιταριών αντιπροσωπεύουν το 85% της παγκόσμιας παραγωγής (Roysse, 2014). Είδη του γένους *Agaricus* (κυρίως το *A. bisporus* και πολύ μικρότερες ποσότητες του *A. brasiliensis*) αντιστοιχούν στο ένα τρίτο της συνολικής παραγωγής και ακολουθούν τα είδη *Pleurotus* (πρωτίστως το *P. ostreatus* και δευτερευόντως τα *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *P. citrinopileatus* και *P. djamor*) και το *Lentinula edodes* (με 17% της παραγωγής το κάθε γένος). Είδη των γενών *Auricularia* και *Flammulina* κατατάσσονται στην τέταρτη και πέμπτη θέση, με ποσοστά που δεν ξεπερνούν το 6% και 5% αντίστοιχα. Άλλα είδη με μικρότερη συνεισφορά στην συνολική παραγωγή είναι τα *Volvariella volvacea*, *Cyclocybe cylindracea*, *Pholiota nameko*, *Hericium erinaceus*, *Grifola frondosa*, *Tremella fuciformis*, καθώς και ορισμένα χωρίς γαστρονομική αξία αλλά με αποδεδειγμένες φαρμακευτικές ιδιότητες όπως τα *Ganoderma lucidum* και *Trametes versicolor*. Κάποια από τα παραπάνω είναι ιδιαίτερα δημοφιλή σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως για παράδειγμα το *C. cylindracea* στην Ιταλία ή τα είδη *Ganoderma* στην Κίνα.

**Πίνακας 1.5.1. Περιεκτικότητα (% ξηρού βάρους) συστατικών και στοιχείων των κύριων λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια μανιταριών.**

Λιγνοκυτταρινούχο υλικό	Ημικυτταρίνη	Κυτταρίνη	Λιγνίνη	C	N	C/N	Τέφρα	Πηγή
Άχυρο σίτου	21,2–35,5	29–50	5,6–21,0	36,4–46,7	0,40–1,48	48,8–86,0	5,6–11,0	Chandra et al. (2012), Hills and Roberts (1981), Menon and Rao 2012, Saini et al. (2015), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Sánchez (2009), Ward and nee'Nigam (2009) Chandra et al. (2012), Menon and Rao (2012), Obodai et al. (2003), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Richard et al. (1996), and Saini et al. (2015)
Άχυρο ρυζιού	17,7–28,6	22,8–47,0	6,4–24,0	33,6–41,8	0,39–1,15	74,2	8,37–17,80	Anwar et al. (2014), Carneiro et al. (2013), Menon and Rao (2012), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Sánchez (2009), Richard et al. (1996), and Zych (2008)
Σπάδικες καλαμποκιού	31,9–43,0	28,0–45,6	6,1–17,0	57,1	0,48–1,10	64,2–72,0	1,36–4,80	Ioannidou and Zabaniotou (2007), Menon and Rao (2012), and nee'Nigam et al. (2009)
Στελέχη βαμβακιού	11,0–14,4	31,0–58,5	21,5–30,0	41,23	2,63	15,67	13,3	Adenipekun and Dada (2013), Philippoussis (2009), Richard et al. (1996), and Ward and nee'Nigam (2009)
Κελύφη βαμβακιού	5–22	49–90	4–24	47,37	0,3–1,4	40–59	2,6–8,4	Dzung et al. (2013), Menon and Rao (2012), Philippoussis (2009), and Sánchez (2009)
Κελύφη καφέ	15,1–47,5	23,0–36,9	13,0–26,0	50,8	0,9–1,9	40,02–59,40	1,0–6,3	Anwar et al. (2014), Guan et al. (2013), Menon and Rao (2012), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Saini et al. (2015), and Sánchez (2009)
Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου	19,0–37,5	25–45	10–25	65,20	0,2–0,8	120–190	1,5–9	Anwar et al. (2014) and Philippoussis (2009)
Σκληρά ξύλα	22–40	40–55	18–26	45–50	0,1–0,2	150–450	0,2–0,3	Anwar et al. (2014) and Philippoussis (2009)
Μαλακά ξύλα	10,7–35,0	37,5–50,0	25–35	45–50	0,1	310–520	0,4–0,5	Hills and Roberts (1981), Menon and Rao (2012), Philippoussis (2009), and Taylor et al. (1989)
Αγριόχορτα (ζιζάνια)	13–50	25–40	6,4–30,0	40,8	0,81–3,25	11,8–42,0	4,2–8,5	Κεφάλαιο 3.1., Menon and Rao (2012), and Sánchez (2009)
Κελύφη ξηρών καρπών	22–30	25–30	30–40	60–62	0,60–0,75	39,2	1,6	Ioannidou and Zabaniotou (2007) and nee'Nigam et al. (2009)
Στελέχη ηλιανθου	29,7	42,1	13,44	52,9	1,38	38,3	3	nee'Nigam et al. (2009) and Philippoussis (2009)
Κελύφη ηλιόσπορου	24,0–28,6	24,1–49,5	19,0–29,5	42	0,6–0,9	60,0–72,4	3,0–3,3	Dermeche et al. (2013)a
Απόβλητα ελαιοτριβείου δύο φάσεων	6,6	14,54	8,54	49	1,31	37,7	1,4–4,0	

Φύλλα ελιάς	5,4	8,5	39,8	47,5	1,3	35,9	14,2	Garcia-Maraver et al. (2013)
Φύλλα μπανανιάς	14,8–21,8	13,2–29,5	14–15,7	44,4–47,8	0,94	23–43	14,2	Anwar et al. (2014) and Obodai et al. (2003)
Υπολείμματα κλαδέματος αμπέλου	17,0–21,0	34,0–60,8	20,0–22,9	47,6	1,8	26,44	3,8	Ioannidou and Zabaniotou (2007) and Philippoussis (2009)
Στέμφυλα οινοποιίας	10,3	14,5	17,2	46,1	1,49	31,04	4,65	Bayrak (2013)
Πίτουρο σίτου	35,5–39,2	10,5–14,8	3,0–12,5	60,3	2,02–2,74	29,8	7	Carneiro et al. (2013), Menon and Rao (2012) and Richard et al. (1996)
Άλευρο ρυζιού	11	10,7	3,3	48,3	2,08–2,44	20	8,1–10,0	Nakagawa et al. (2003)
Φλοιός ρυζιού	17,4–29,3	28,0–43,0	18,3–22,5	32,9–44,6	0,30–0,76	32,8–136,0	14,6–21,4	Chandra et al. (2012), Hills and Roberts (1981) and Nakagawa et al. (2003)
Κοπριά πουλερικών	87,8	10,4	1,4–3,4	26,47	4,51–6,87	4,4–13,0	0,4	Bernal et al. (2009), Hills and Roberts (1981) and Richard et al. (1996)

## 1.5.2 Διατροφική αξία τωνμανιταριών

Γενικά, τα μανιτάρια αποτελούν τροφή υψηλού πρωτεϊνικού και χαμηλού θερμιδικού περιεχομένου και επίσης περιέχουν μέταλλα, βιταμίνες και σημαντικά βιοδραστικά συστατικά. Το περιεχόμενο νερό είναι αρκετά υψηλό και κυμαίνεται από 86 έως 92%, ενώ το μέσο περιεχόμενο σε ολικές πρωτεΐνες, ολικό λίπος και τέφρα είναι 250, 30 και 80 g kg<sup>-1</sup> ξηρού βάρους αντίστοιχα και το υπόλοιπο καταλαμβάνεται κυρίως από υδατάνθρακες (Kalač 2013). Στον Πίνακα 1.5.2. παρουσιάζεται η βασική σύσταση των πιο κοινών ειδών όπως προέκυψε από πρόσφατες δημοσιεύσεις. Η μεγάλη διακύμανση των βασικών συστατικών φαίνεται ότι οφείλεται τόσο στα διαφορετικά στελέχη από τα οποία προήλθαν οι καρποφορίες όσο και από τις παραλλαγές στη σύσταση του υποστρώματος.

Στο πρωτεϊνικό κλάσμα, το πιο άφθονο αμινοξύ είναι το γλουταμικό οξύ (13-21%) ακολουθούμενο από το ασπαρτικό οξύ (9-12%) και την αργινίνη (4-12%), ενώ τα υπόλοιπα (τυροσίνη, λευκίνη, λυσίνη, βαλίνη και αλανίνη) βρίσκονται συνήθως σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1 mg g<sup>-1</sup> νωπού βάρους (Reis et al., 2012). Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε λιπαρά, περισσότερα από δέκα λιπαρά οξέα έχουν ανιχνευτεί στα μανιτάρια. Τα λινολεϊκό οξύ, ολεϊκό οξύ και παλμιτικό οξύ είναι τα πιο άφθονα. Επιπλέον, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα καλλιεργούμενα μανιτάρια ξεπερνούν το 70% των ολικών (Reis et al., 2012). Η μανιτόλη και η τρεχαλόζη αποτελούν τις πιο κοινές ενώσεις μεταξύ των αλκοολικών σακχάρων και των ολιγοσακχαριτών αντίστοιχα και οι β-γλουκάνες είναι ο πιο άφθονος και καλύτερα μελετημένος πολυσακχαρίτης των μανιταριών (Kalač 2013, Reis et al. 2012). Αναφορικά με τα μεταλλικά στοιχεία (Πίνακας 1.5.3), το κάλιο συσσωρεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις καρποφορίες των μυκήτων ακολουθούμενο από το ασβέστιο και το νάτριο, ενώ τα εδώδιμα μανιτάρια περιέχουν σημαντικές ποσότητες ψευδαργύρου και χαλκού συγκριτικά με άλλα τρόφιμα (Kalač 2013, Mattila et al. 2001). Η συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ειδών, αλλά επίσης επηρεάζεται και από τη συγκέντρωση των υποστρωμάτων στα οποία αναπτύσσονται. Όσον αφορά τις βιταμίνες που περιέχουν, η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) κυμαίνεται από 150 έως 300 mg kg<sup>-1</sup>, η θειαμίνη (B<sub>1</sub>) από 1,7 έως 6,3 mg kg<sup>-1</sup>, η ριβοφλαβίνη (B<sub>2</sub>) 2,6 – 9,0 mg kg<sup>-1</sup>, η νιασίνη (B<sub>3</sub>) 63,8 – 83,7 mg kg<sup>-1</sup> και η πυριδοξίνη (B<sub>6</sub>) 1,4 – 5,6 mg kg<sup>-1</sup>, ενώ η εργοστερόλη (προβιταμίνη της D<sub>2</sub>) κυμαίνεται από 3 έως 7 g kg<sup>-1</sup> ξηράς ουσίας (Kalač 2013).

**Πίνακας 1.5.2. Ενδεικτικές τιμές της βασικής σύστασης (g kg<sup>-1</sup> ξηρού βάρους) και ενέργειας (kcal kg<sup>-1</sup> φρέσκου βάρους) των πιο κοινών καλλιεργούμενων μανιταριών.**

Είδος	Ξηρά ουσία	Πρωτεΐνες	Λίπος	Τέφρα	Υδατάνθρακες	Ενέργεια	Πηγή
<i>Agaricus bisporus</i> (λευκό)	87,3	140,8	21,8	97,4	740,0	352	Reis et al., 2012
<i>Agaricus bisporus</i> (καφέ)	83,6	154,3	16,7	113,6	715,4	303	Reis et al., 2012
<i>Agaricus brasiliensis</i>	-	267,4	26,2	68,1	638,3	-	Tsai et al., 2008
<i>Flammulina velutipes</i>	121,3	38,7	28,9	72,5	859,9	467	Reis et al., 2012
	-	266,5	92,3	75,1	566,1	-	Ulzijjargal and Mau, 2011
<i>Hypsizigus marmoreus</i>		196,0	-	-	-		Lee et al., 2009
<i>Lentinula edodes</i>	202,2	44,0	17,3	67,3	871,4	772	Reis et al., 2012
	-	204,6	63,4	52,7	679,3	-	Ulzijjargal and Mau, 2011
<i>Pleurotus ostreatus</i>	108,3	70,2	14,0	57,2	858,6	416	Reis et al., 2012
	-	238,5	21,6	75,9	664,0	-	Ulzijjargal and Mau, 2011
	100,0	416,0	5,0	60,0	519,0	-	Akyuz and Kirbag, 2010
	88,0	166,9	54,5	67,0	711,6	-	Jaworska et al., 2011
<i>P. eryngii</i>	110,0	110,0	14,5	61,8	813,7	421	Reis et al., 2012
	-	221,5	15,7	57,6	705,2	-	Ulzijjargal and Mau, 2011
<i>P. sajor-caju</i>	100,0	374,0	10,0	63,0	553,0	-	Akyuz and Kirbag, 2010

Ανάμεσα στα πιο ενδιαφέροντα και καλύτερα μελετημένα συστατικά των καλλιεργούμενων μανιταριών (αναφορικά με την περιεκτικότητα τους και την επίδραση σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος) είναι η εργοθειονίνη, τα φαινολικά, τα τριτερπενοειδή (όλα εν δυνάμει αντιοξειδωτικά), οι β-γλουκάνες με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές και πρεβιοτικές ιδιότητες, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών) και η λοβοστατίνη με υποχοληστερολαιμικές και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες. Στον Πίνακα 1.5.4. παρουσιάζεται το



εύρος της συγκέντρωσης κάποιων από αυτά στα πιο κοινά είδη καλλιεργούμενων μανιταριών.

**Πίνακας 1.5.3. Συνήθεις συγκεντρώσεις (g kg<sup>-1</sup> ξηρού βάρους) των κύριων μεταλλικών στοιχείων σε αυτοφυή και καλλιεργούμενα μανιτάρια κατά φθίνουσα σειρά. (ΠΗΓΗ: Kalas, 2013).**

Στοιχείο	Συγκέντρωση (g kg <sup>-1</sup> )
Κάλιο (K)	20 – 40
Φωσφόρος (P)	5 – 10
Χλώριο (Cl)	1 – 6
Θείο (S)	1 – 6
Μαγνήσιο (Mg)	0,8 – 1,8
Ασβέστιο (Ca)	0,1 – 0,5
Νάτριο (Na)	0,1 – 0,4

**Πίνακας 1.5.4. Περιεκτικότητα επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών σε κοινά είδη καλλιεργούμενων μανιταριών.**

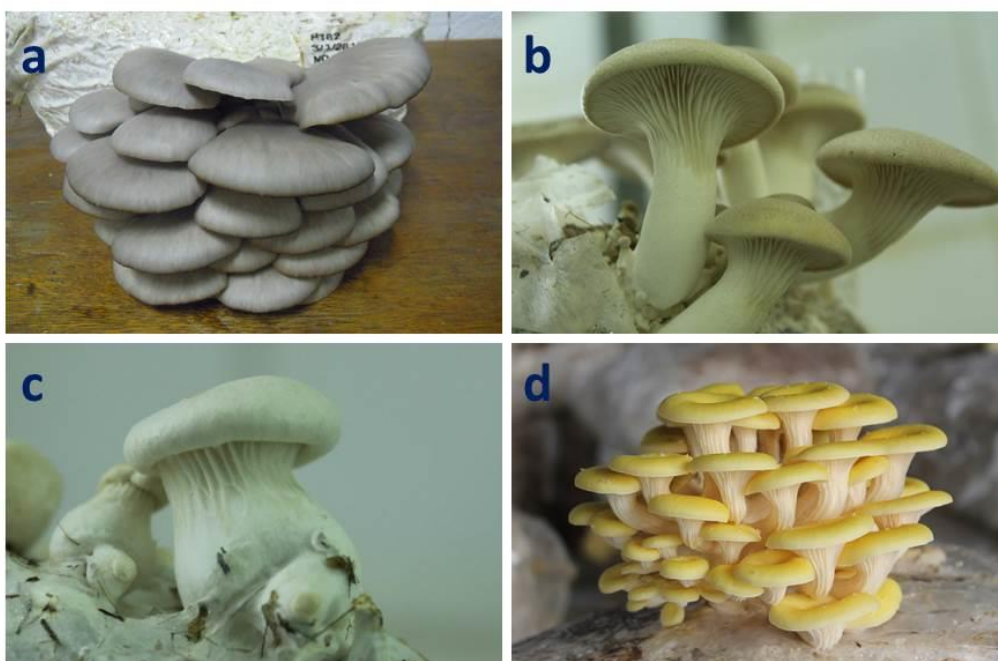
Είδος	Λοβοσοατίνη	β-γλουκάνες	Εργοθειονίνη	γ-αμινοβουτυρικό οξύ	Εργοστερόλη	Πηγή*
	mg/kg	g/100g	mg/kg	mg/kg	(mg/100g)	
<i>Agaricus bisporus</i>	81–565	5.7–12.0	933–1210	125–2400	602-794	[1-9]
<i>Agaricus blazei</i>	184	3.0–13.1	39–85	360–590		[6, 7, 10-13]
<i>Auricularia auricula-judae</i>		8.3–42.0			70-227	[5, 6, 14-16]
<i>Auricularia polytricha</i>	16	18.09	1.4	282		[11, 14]
<i>Flammulina velutipes</i>	40–91	18.3–21.0	57-455	230–339	255-417	[1, 2, 6, 9, 10]
<i>Ganoderma lucidum</i>	68–254	23.5–55.0	14,5–80	17–63	403	[3, 7, 10, 11, 17]
<i>Grifola frondosa</i>	3–12	26.0–32.5	143–553	18–280	692-911	[1, 5, 7, 9, 10, 18-20]
<i>Hericium erinaceus</i>	14	35.3–33.9	960		240-260	[3, 7, 15, 18, 21]
<i>Lentinula edodes</i>	3–37	20.0-27.4	137,7-412,3	351–622	495-1246	[1-3, 5-11, 22-25]
<i>Pholiota nameko</i>	186	-	229	8		[1]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	165–980	10.1-33.3	944–2444	6–25	427-730	[1-3, 6, 8, 9, 18, 25-27]
<i>Trametes versicolor</i>	3	22.2–53.0	68	100		[5-7, 10]
<i>Tremella fuciformis</i>	2–30	14.9–15.6	7–27	372–687	10	[11] [3, 7, 16]
<i>Volvariella volvacea</i>	59	36.37	537	999–1150	159	[11, 17, 28]

\* 1)Chen 2012, 2)Lee et al., 2006, 3)Tsai et al., 2007, 4)Sari et al., 2017, 5)Lee and Kim 2005, 6)McClearly and Draga, 2004, 7)Mattila et al., 2002, 8)Philips et al., 2011, 9)Lin et al., 2013, 10)Lo et al., 2012, 11)Tsai et al., 2008, 12)Toledo et al., 2013, 13)Kim et al., 2012, 14)Banlangsawan and Sanoamuang 2016, 15)Huang et al., 1985, 16) Raina et al., 2014, 17)Cohen et al., 2014, 18)Huang et al., 2011, 19)Dubost et al., 2006, 20)Koutrotsios et al., 2016, 21)Kozarski et al., 2012, 22)Kim et al., 2010, 23)Bak et al., 2014. 25)Teichmann et al., 200, 26)Tsai et al., 2009, 27) Synytsya et al., 2008, 28)Eguchi et al., 2015

Στη συνέχεια παρουσιάζονται στοιχεία για την καλλιέργεια και τη χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων για τα είδη που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή (είδη *Pleurotus*, *Cyclocybe cylindracea*, *Hericium erinaceus* και *Ganoderma lucidum*). Επιπλέον, παρέχονται πληροφορίες για τα κύρια βιοδραστικά συστατικά τα οποία έχουν ανιχνευτεί σε κάθε ένα από αυτά και την επίδραση τους σε συγκεκριμένες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.

### 1.5.3 Είδη του γένους *Pleurotus*

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει είδη που σχηματίζουνμανιτάρια με χαρακτηριστική μορφολογία (γνωστά ως “oyster mushrooms”), τα οποία παρουσιάζουν παγκόσμια εξάπλωση και αναπτύσσονται κυρίως ως σαπρότροφα σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων (κυρίως νεκρό ξύλο και φυτικά υπολείμματα). Τα μανιτάρια του γένους φέρουν ελάσματα και το σχήμα τους χαρακτηρίζεται ως “πλευροτοειδές” (δηλ. με έκκεντρο ή πλευρικό στύπο ή και με υποτυπώδη στύπο). Μαζί με τα είδη του γένους *Hohenbuehelia* είναι τα μοναδικά που έχουν τη δυνατότητα να προσβαλλούν και να τρέφονται από ζωντανούς νηματώδεις



Εικόνα 1.5.2. Καρποφορίες των ειδών *P. ostreatus* (a) και *P. citrinopileatus* (d) ανεπτυγμένες σε υπόστρωμα αχύρου, και των ειδών *P. eryngii* (b) και *P. nebrodensis* (c) σε υποστρώματα που περιέχουν υπολείμματα ελαιουργίας και οινοποιίας αντίστοιχα.

. Ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών νηματοδοτοξικών κατασκευών αποτελεί διαγνωστικό γνώρισμα και χρησιμοποιείται στην ταξινομική των εν λόγω γενών. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, τα δυο παραπάνω μονοφυλετικά γένη απαρτίζουν την οικογένεια Pleurotaceae. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τέσσερα είδη του γένους *Pleurotus*, στα οποία γίνεται ειδικότερη αναφορά στη συνέχεια.

#### 1.5.3.1 *Pleurotus ostreatus*

Το είδος *P. ostreatus* εμφανίζει παγκόσμια εξάπλωση. Πολλά είδη με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, συχνά μπερδεύονται με το *P. ostreatus* δημιουργώντας μια σύγχυση για τους ξενιστές και την γεωγραφική εξάπλωση του (Zervakis and Balis 1996). Το *P. ostreatus* περιγράφηκε για πρώτη φορά από το 1775 από τον γερμανό φυσιολόγο Nikolaus Joseph Freiherr von Jacquin και ονομάστηκε *Agaricus ostreatus*. Περίπου έναν αιώνα αργότερα ο γερμανός μυκητολόγος Paul Kummer μετέφερε το εν λόγω είδος στο γένος *Pleurotus* διατηρώντας μέχρι και σήμερα το ίδιο όνομα.

Όσον αφορά τη μορφολογία του, το χρώμα της επιφανείας του πύλου ποικίλει από λευκό, εκρού έως και σκούρο καφέ ή γκρι. Ο στύπος είναι έκκεντρος, κυλινδρικός, με μήκος 5-18 cm. Τα καρποσώματα εμφανίζονται συνήθως ως επάλληλα γείσα, αλλά οι βάσεις των στύπων εδράζονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη στο υπόστρωμα. Τα ελάσματα είναι κατερχόμενα λευκού έως και απαλού εκρού χρώματος στην ωριμότητα και τα σπόρια ημικυλινδρικά ως νεφροειδή, διαστάσεων 8 - 12,5 × 3 - 4,5 μm. Εκτός από σαπρότροφα, μπορούν να αποτελέσουν ασθενή παράσιτα και συναντώνται συνήθως σε δέντρα ή νεκρό ξύλο λεύκας, ιτιάς, οξιάς και άλλων πλατύφυλλων, όπως επίσης και σε ξυλο ελάτης.

#### 1.5.3.2 *Pleurotus eryngii*

Με από το όνομα *P. eryngii* περιλαμβάνονται διάφορες ποικιλίες οι οποίες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τον ξενιστή τους (Zervakis et al. 2014). Το συγκεκριμένο είδος εξαπλώνεται από την Ευρώπη (κυρίως στις χώρες τις Μεσογείου) ως τη βόρεια Αφρική και τις χώρες της Μέσης Ανατολής, ενώ έχει καταγραφεί και σε άλλες Ασιατικές χώρες. Οι ξενιστές του ανήκουν στην οικογένεια Apiaceae και σε αυτούς συγκαταλέγονται φυτά του γένους *Eryngium* (στα οποία αναπτύσσεται το *P. eryngii* var. *eryngii*), το *Ferula communis* (*P. eryngii* var. *ferulae*), τα είδη φυτών *Elaeoselinum asclepium* και *E. asclepium* subsp. *meioides*

(*P. eryngii* var. *elaeoselini*) και το *Thapsia garganica* (*P. eryngii* var. *thapsiae*). Παράγει μεγάλες καρποφορίες με κυρτό ως χωνιόμορφο πύλο ανοιχτού εκρού έως και σκούρου γκρι ή καφέ χρώματος, ο οποίος συχνά φέρει ραγάδες. Η περίμετρος του πύλου παραμένει συνεστραμμένη προς τα κάτω έως και λίγο πριν την πλήρη ωρίμανση. Τα αναστομωμένα ελάσματα κατέρχονται στον στύπο που είναι κεντρικός ή έκκεντρος. Τα σπόρια του είναι κυλινδρικά έως ελλειπτικά και λεία, μεγέθους 10 - 12,5 × 4,5 - 5,5 μm (Zervakis et al. 2014).

#### 1.5.3.3 *Pleurotus nebrodensis*

Συγγενές με το *P. eryngii* είναι το *P. nebrodensis*, το οποίο όμως αποτελεί ανεξάρτητο είδος (Zervakis et al. 2014). Είναι ενδημικό της Σικελίας και της Ελλάδας και αναπτύσσεται αποκλειστικά στις ρίζες του φυτού *Prangos ferulacea*. Τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά μοιάζουν με του *P. eryngii*. Το μέγεθος του πύλου κυμαίνεται από 5-20 cm, ενώ το χρώμα του είναι λευκό – υπόλευκο. Τα ελάσματα του είναι έντονα κατερχόμενα και η επιφάνεια του πύλου εμφανίζει ραγάδες κατά την ωριμότητα. Ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1866 από τον Ιταλό Βοτανικό Giuseppe Inzenga ως “το πιο νόστιμο μανιτάρι της Σικελικής μυκοχλωρίδας”, ενώ από το 1886 μεταφέρθηκε στο γένος *Pleurotus*. Είναι το μοναδικό είδος μανιταριού που έχει συμπεριληφθεί στη λίστα απειλούμενων ειδών της IUCN (International Union for Conservation of Nature) (Venturella and Zervakis, 2017). Ελάχιστα μόνο καρποσώματα φτάνουν στο στάδιο της ωριμότητας κάθε χρόνο, καθιστώντας επιτακτική την ανάπτυξη της καλλιέργειας του ώστε να αμβλυθθεί η πίεση που ασκείται στους αυτοφυείς πληθυσμούς από την εντατική συλλογή. Σε αντίθεση με άλλα είδη *Pleurotus*, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα πληροφορίες για την επιτυχή *ex situ* καλλιέργεια του.

#### 1.5.3.4 *Pleurotus citrinopileatus*

Το *P. citrinopileatus* γνωστό και ως “golden oyster mushroom” απαντάται ως αυτοφυές στη νοτιοανατολική και ανατολική Ασία (Ανατολική Ρωσία, Κίνα, Κορέα και Ιαπωνία). Μορφολογικά αλλά και φυλογενετικά, παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το *P. cornucopiae*, το οποίο εξαπλώνεται στην Ευρώπη και την Αφρική, με αποτέλεσμα κάποιοι μυκητολόγοι να προτείνουν το χαρακτηρισμό του ως υποείδος του τελευταίου (Zervakis and Balis 1996). Όπως και στο *P. ostreatus*, τα καρποσώματα του *P. citrinopileatus* σχηματίζουν ομάδες από επάλληλα γείσα. Τα μανιτάρια έχουν σχήμα κοίλο έως (συνηθέστερα) έντονα χωνοειδές. Η επιφάνεια του πύλου είναι κίτρινη έως χρυσοκάστανη, με βελούδινη και ξηρή

υφή και μέγεθος 2 - 6,5 cm. Η σάρκα είναι λευκή με πάχος 0,2-0,8 cm. Τα ελάσματα είναι επίσης λευκά και έντονα κατερχόμενα. Τα υαλώδη σπόρια έχουν σχήμα κυλινδρικό έως ελλειπτικό και διαστάσεις 6-9 × 2-3,5 μm. Όπως και τα περισσότερα είδη του γένους, προκειται για ξυλοσηπτικό μύκητα, ο οποίος αναπτύσσεται σε νεκρό ξύλο πλατύφυλλων δέντρων (κυρίως σε φυτά του γένους *Ulmus*).

Όλα τα παραπάνω είδη *Pleurotus* ανήκουν στην κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψης και έχουν τη δυνατότητα να αποικίζουν και να παράγουν μανιτάρια σε πληθώρα λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Αυτό, σε συνδυασμό με την σχετικά εύκολη μεθοδολογία καλλιέργειας και τις ιδιαίτερες διατροφικές/φαρμακευτικές τους ιδιότητες, αποτελούν τους κύριους λόγους της ραγδαίας αύξησης της εμπορικής παραγωγής τους τα τελευταία 20-30 χρόνια. Ειδικότερα όσον αφορά το *P. ostreatus* (Εικόνα 1.5.2.a) αποτελεί το πιο διαδεδομένο καλλιεργούμενο είδος του γένους *Pleurotus* και υπάρχει διαθέσιμη μεγάλη ποικιλία στελεχών προσαρμοσμένα σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης τα οποία παράγουν μανιτάρια με διαφορετικά οργανοληπτικά-ποιοτικά χαρακτηριστικά. Αξίζει να αναφερθεί ότι για το είδος *P. ostreatus* έχουν δημιουργηθεί στελέχη που σχηματίζουν καρποφορίες χωρίς βασιδιοσπόρια. Έτσι αποφεύγονται τα αναπνευστικά προβλήματα στους εργαζόμενους σε μονάδες καλλιέργειας μανιταριών λόγω του τεράστιου αριθμού σπορίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της συλλογής. Τα υποστρώματα στα οποία καλλιεργούνται συνήθως τα είδη *Pleurotus* αποτελούνται από άχυρο σιτηρών, εμπλουτισμένο με πίτουρο σίτου, σογιάλευρο, ή άλευρο από άλλα ψυχανθή για τη μείωση του λόγου C/N και απώτερο στόχο, την επίσπευση της παραγωγής μανιταριών και την αύξηση της συνολικής απόδοσης. Πολλά ακόμη αγροβιομηχανικά παραπροϊόντα έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αξιοποιηθούν στην καλλιέργεια του εν λόγω είδους όπως τα τεμαχίδια ξύλου, ο φλοιός βαμβακόσπορου, τα υπολείμματα ζαχαροκάλαμου και εκκοκκισμού βάμβακος, ο φλοιός καφέ, το ξύλο από κλαδέματα αμπέλου και άλλων δέντρων, το άχυρο μπανάνας, τα στελέχη φυτών σόγιας και τα απόβλητα από τη βιομηχανία χάρτου (Das and Mukherjee 2007, Mandeel et al. 2005, Membrillo et al. 2011, Obodai et al. 2003, Pant et al. 2006, Philippoussis et al. 2001, Salmones et al. 2005, Sánchez et al. 2002, Yildiz et al. 2002, Zervakis et al. 1996, 2013). Τα υποστρώματα συνήθως παστεριώνονται, εμβολιάζονται και συσκευάζονται σε σάκους των 10 – 20 kg. Η βιολογική αποδοτικότητα (εκατοστιαίος λόγος του βάρους του νωπού βάρους των μανιταριών προς το ξηρό βάρος του υποστρώματος) διαφέρει σημαντικά μεταξύ των παραπάνω, κυμαινόμενη από 4 έως 74% σε διάφορους τύπους ροκανιδιού, από 50 έως 97% σε υποστρώματα βασισμένα στο άχυρο σίτου και μέχρι 139% σε στέμφυλα, κλαδέματα αμπέλου και υπολείμματα βάμβακος. Άλλα είδη όπως τα *P. eryngii* (Εικόνα 1.5.2.b) και *P.*

*citrinopileatus* (Εικόνα 1.5.2.c) παράγουν μανιτάρια με διαφορετική εμφάνιση, γεύση και σύσταση αλλά έχουν παρόμοιες απαιτήσεις όσον αφορά τα υποστρώματα ανάπτυξης τους.

Τα μανιτάρια και το μυκήλιο των ειδών *Pleurotus* περιέχουν βιοδραστικά συστατικά όπως πολυσακχαρίτες, λεκτίνες, πεπτίδια, τριτερπενοειδή κ.α. με πληθώρα φαρμακευτικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων αντικαρκινικών, αντιφλεγμονωδών και ανοσορρυθμιστικών. Μεταξύ των πολυσακχαριτών, η πλευράνη (β-γλουκάνη) έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Bobončák et al. 2010). Επιπλέον, δοκιμές σε ανθρώπους, απέδειξαν ότι η πλευράνη συμβάλει στην πρόληψη υποτροπιάζουσας λοίμωξης του αναπνευστικού σωλήνα (Jesenaket al. 2013). Προκαταρκτικά αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι η προσθήκη σκόνης μανιταριών *Pleurotus* στο σιτηρέσιο ζώων (σε αναλογία 4-10%), οδήγησε σε μείωση της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα (Pate et al. 2012). Επιπλέον, συγκρινόμενα με όλα τα υπόλοιπα είδη καλλιεργούμενων μανιταριών, το *P. ostreatus* περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση λοβοστατίνης και εργοθειονίνης (μέχρι 980 mg/kg και 944–2444 mg/kg αντίστοιχα, Πίνακας 1.5.4.).

#### 1.5.4 *Cyclocybe cylindracea*

Το *Cyclocybe cylindracea* (επίσης γνωστό με τα ονόματα *Agrocybe cylindracea* και *Agrocybe aegerita*) είναι ένα εδώδιμο είδος το οποίο εκτιμάται ιδιαίτερα για την ευχάριστη γεύση και το έντονο άρωμα του. Παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση, με παρουσία σε όλες τις ηπείρους, ενώ είναι σχετικά σπάνιο στην Αμερική (Uhart and Alberto, 2007). Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1876 από τον Augustus Pyramis De Candolle, παίρνοντας το όνομα *Pholiota cylindracea*. Το 1938, ο Γάλλος μυκητολόγος René Charles Joseph Ernest Maire πρότεινε τη μεταφορά του στο γένος *Agrocybe*. Πολύ πρόσφατα οι Vizzini and Angelini (2014) βασισμένοι σε αναλύσεις DNA κατέληξαν στην τοποθέτηση του παραπάνω είδους στο γένος *Cyclocybe*, ενώ καθιέρωσαν και σήμερα αποδεκτό επιστημονικό όνομα του (*Cyclocybe cylindracea*). Οι καρποφορίες του είναι μεσαίου μεγέθους με ευδιάκριτο πύλο (διαμέτρου 3-10 cm), αρχικά ημισφαιρικό, ο οποίος με την ωρίμανση γίνεται κυρτός έως και επίπεδος με κυματιστή περιφέρεια, ενώ σε ξηρές συνθήκες συχνά εμφανίζονται σχισμές στην επιφάνεια του. Το χρώμα ποικίλει από ανοιχτό εκρού στην περιφέρεια έως και σκούρο καφέ στο κέντρο του πύλου, το οποίο σκουραίνει με την ωρίμανση των μανιταριών. Ο στύπος (5-10 cm μήκος, έως 1,5 cm πλάτος) είναι λευκός έως εκρού και σκουραίνει με την ωρίμανση λόγω της απελευθέρωσης των σπορίων. Φέρει ευδιάκριτο επίμονο δακτύλιο. Τα ελάσματα είναι

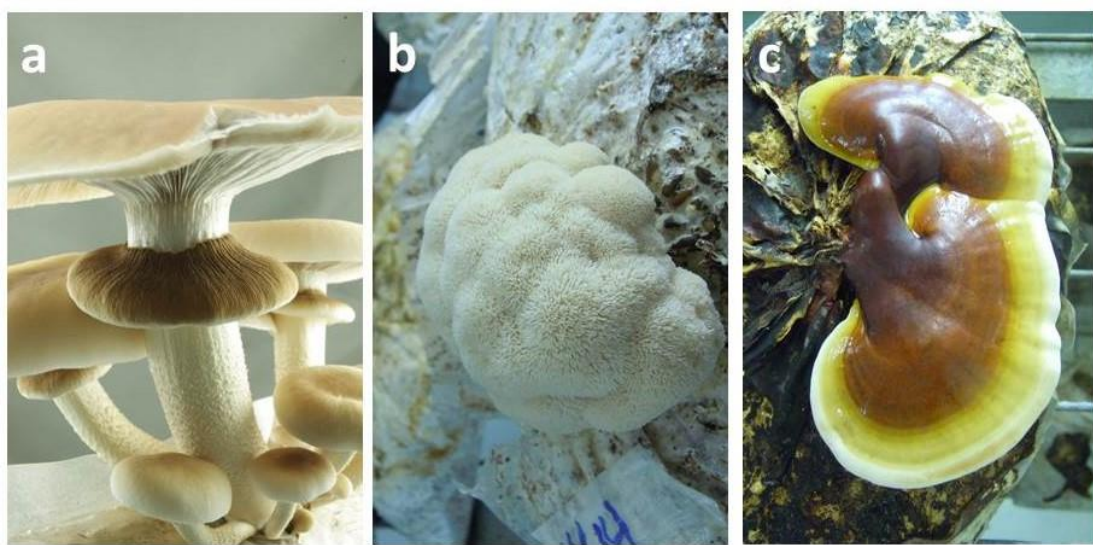
πυκνά, εφαπτόμενα έως ελαφρώς κατερχόμενα, με χρώμα αρχικά υπόλευκο, στη συνέχεια ανοιχτό καφέ και τέλος σκούρο καφέ. Τα σπόρια του είναι ελλειψοειδή, λεία, χρώματος σκούρου καφέ. Πρόκειται για σαπροτροφικό είδος (ανήκει στην κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψης) το οποίο απαντάται κυρίως σε νεκρό ξύλο δέντρων του γένους *Populus* και σπανιότερα σε *Salix* και *Platanus*.

Η υψηλή γαστρονομική του αξία σε συνδυασμό με τα διαπιστωμένα οφέλη για την υγεία, έχουν ωθήσει την έρευνα τα τελευταία χρόνια στη μελέτη των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων αλλά και τη βελτίωση των καλλιεργητικών πρακτικών, συμπεριλαμβανομένης της μελέτης εναλλακτικών υποστρωμάτων. Οι περισσότερες έρευνες για την παραγωγή βιομάζας του *C. cylindracea* εστιάζουν στην παραγωγή μανιταριών, ενώ σημαντικά λιγότερες πραγματεύονται την ανάπτυξη μυκηλίου σε υγρές καλλιέργειες (Kim et al., 2005). Εντατική εμπορική καλλιέργεια του πραγματοποιείται κυρίως στην Κίνα, αλλά τα τελευταία χρόνια εμφανίζει αυξανόμενη τάση και στην Ευρώπη, με την Ιταλία να διατηρεί τα σκήπτρα της μεγαλύτερης ετήσιας παραγωγής. Η καλλιέργεια του υλοποιείται κυρίως σε αποστειρωμένο ξύλο πλατύφυλλων δέντρων ή σε παστεριωμένο άχυρο σίτου, ακολουθώντας την ίδια σχεδόν μεθοδολογία και εξοπλισμό με αυτή του *P. ostreatus*. Η χρήση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους που περιέχουν γεωργικά ή δασικά υπολείμματα, όπως το άχυρο κριθαριού, φλοιούς πορτοκαλιού, μίσχους σταφυλιών, καλάμια, φλοιό ρυζιού, υπολείμματα ηλιάνθου και ξύλα λεύκας ή ιτιάς, έχουν αναφερθεί για την παραγωγή μανιταριών του εν λόγω είδους (Isikhuemhen et al., 2009, Philiproussis et al., 2001, Uhart et al., 2008). Όσον αφορά τη βιολογική αποδοτικότητα, πολύ υψηλές τιμές έχουν προκύψει από υποστρώματα πλούσια σε άζωτο, όπως το άχυρο εμπλουτισμένο με αλεύρι σόγιας, χωνεμένη κοπριά πουλερικών ή απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (97 – 179%, (Isikhuemhen et al., 2009, Uhart et al., 2008, Zervakis et al., 2013), ενώ αρκετά χαμηλότερες τιμές προέκυψαν σε μείγματα ξύλου ιτιάς με άχυρο (4 – 31%, Uhart et al., 2008) ή σε άχυρο σίτου εμπλουτισμένο με μικρή ποσότητα άλευρου σίτου (48 – 61%, Philiproussis et al., 2001).

Τα τελευταία χρόνια, άρχισε να μελετάται η σύσταση των μανιταριών *C. cylindracea* και η επίδραση των συστατικών του στην ανθρώπινη υγεία. Μεταξύ των ευρημάτων, αξιοσημείωτη είναι η αντιοξειδωτική, αντιμεταλλαξιογόνος και αντικαρκινική του δράση (Shon and Nam, 2001, Yang et al., 2005, Zhang et al., 2003), ενώ σε πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε η κατασταλτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων έναντι της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* (Petrovic et al., 2014). Τέλος, η μελέτη των εξω-πολυσακχαριτών που παράγονται κατά την καλλιέργεια του μυκηλίου σε υγρές



καλλιέργειες έδειξε την υπογλυκαιμική τους δράση σε διαβητικούς αρουραίους και ως εκ τούτου την ικανότητα ρύθμισης του σακχαρώδους διαβήτη (Jong-Wonhyun et al., 2001).



Εικόνα 1.5.4. Καρποφορίες σε πλήρη ανάπτυξη των ειδών (a) *Cyclocybe cylindracea*, (b) *Hericium erinaceus* και (c) *Ganoderma lucidum* ανεπτυγμένα σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας.

### 1.5.5 *Hericium erinaceus*

Το *Hericium erinaceus* (γνωστό και ως “lion’s mane” [χαίτη λιονταριού] ή “monkey’s head” [κεφάλι πιθήκου]) λόγω της μορφής του καρποσώματος που παράγει, αναπτύσσεται σε ξύλο πλατύφυλλων δέντρων και παράγει σαρκώδη, λευκά μανιτάρια που φέρουν διακριτές επιμήκεις ακανθώδεις προεξοχές (Εικόνα 1.5.4.b). Αυτές έχουν συχνά ροζ χρώμα (ιδιαίτερα τα υπερώριμα καρποσώματα) και φύονται από το ίδιο σημείο. Το λευκό ή υπόλευκο χρώμα του καρποσώματος σκουραίνει με την ωρίμανση του μανιταριού. Το καρπόσωμα συνδέεται με το υπόστρωμα με ένα πολύ κοντό και πλατύ στύπο, ο οποίος τις περισσότερες φορές δεν είναι ορατός. Συχνά στα ίδια ακριβώς σημεία πρόσφυσης επί του δέντρου μπορεί να εμφανίζονται μανιτάρια επί σειρά ετών. Το μέγεθος των μανιταριών μπορεί να φτάσει (ή και να ξεπεράσει) τα 30 cm αλλά συνήθως κυμαίνεται από 10-20 cm, ενώ το μήκος των ακίδων είναι 1-5 cm. Αν και σύμφωνα με αναλύσεις DNA έχει επιβεβαιωθεί η κατάταξη πολλών μανιταριών που φέρουν ακανθώδεις προεξοχές στην υμενοφόρο επιφάνεια τους στην τάξη *Canthellales* (όπως π.χ. το *Hydnum repandum*), το *Hericium erinaceus* δεν συνδέεται φυλογενετικά με τα υπόλοιπα και κατατάσσεται στην τάξη *Russulales*. Το εν λόγω είδος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Jean Baptiste Francois (Pierre) Bulliard, ο οποίος το ονόμασε *Hydnum erinaceus* (1780), ενώ λίγο αργότερα (1797) μεταφέρθηκε στο γένος *Hericium* και έλαβε το όνομα που διατηρεί μέχρι και σήμερα. Η

εξάπλωση του περιλαμβάνει την Ασία, την Ευρώπη και την Αμερική από το Μεξικό έως τις Η.Π.Α, ενώ αποτελεί ένα μάλλον σπάνιο είδος. Καρποφορεί συνήθως σε γηραιά πλατύφυλλα δέντρα και τις περισσότερες φορές ταμανιτάρια εμφανίζονται σε μεγάλο ύψος από το έδαφος.

Καλλιεργείται παραδοσιακά στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Μαλαισία όπου χρησιμοποιούνται συνήθως ροκανίδια πλατύφυλλων δέντρων ως υπόστρωμα. Ωστόσο πρόσφατες έρευνες (Figlas et al. 2007, Ko et al. 2005) φανερώουν ότι η αντικατάσταση μέρους (ή ολόκληρου) του συμβατικού υποστρώματος από διάφορα γεωργικά παραπροϊόντα όπως οι φλοιοί ηλιόσπορου, τα υπολείμματα σακχαροκάλαμου, ο φλοιός ρυζιού και οι σπόροι σόγιας συμβάλουν σημαντικά στην αύξηση της παραγωγικότητας. Γενικά, οι τιμές βιολογικής αποδοτικότητας που αναφέρονται από διάφορα υποστρώματα κυμαίνονται από 31 έως 70% (Figlas et al. 2007, Ko et al. 2005).

Ένας μεγάλος αριθμός βιοδραστικών συστατικών έχει απομονωθεί από το είδος *H. erinaceus* και έχουν μελετηθεί οι φαρμακευτικές του ιδιότητες σε *in vitro* προκλινικές δοκιμές τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους. Μεταξύ αυτών, συγκαταλέγονται 20 αρωματικά συστατικά που περιέχουν βενζοϊκό δακτύλιο όπως τα hericenone A έως L, erinacine A έως D, και 3-hydroxyhericenones (Ma et al. 2010a, b, Ueda et al. 2008). Οι εν λόγω ενώσεις ρυθμίζουν τη σύνθεση των νευρικών αυξητικών παραγόντων, ενώ εμφάνισαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της άνοιας σε πειράματα με αρουραίους αλλά και ανθρώπους. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα συστατικά αποδείχθηκε ότι διαθέτουν πρόσθετες φαρμακευτικές ιδιότητες, στις οποίες περιλαμβάνονται κυτοτοξικές, αντιβιοτικές και προστατευτικές του ενδοπλασματικού δικτύου έναντι του κυτταρικού θανάτου που οφείλεται στο στρες (Kawagishi et al. 1994a, b, Ma et al. 2010a, Ueda et al. 2008). Άλλα βιοδραστικά συστατικά που έχουν επίσης ανιχνευτεί στο *Hericium erinaceus* περιλαμβάνουν διτερπενοειδή (κάποια από τα οποία όπως τα cyathane terpenoids και erinacine A έως G, προάγουν τη βιοσύνθεση των νευρικών αυξητικών παραγόντων) και πολλές λεκτίνες με αιμοσυγκολλητική δράση (Gong et al. 2004) ή με επίδραση στις συγκολλητικές ιδιότητες των ερυθροκυττάρων (Kawagishi et al. 1994a, b).

### 1.5.6 *Ganoderma lucidum*

Η οικογένεια Ganodermataceae περιλαμβάνει πολύπορους βασιδιομύκητες, που παράγουν βασιδιοσπόρια με διπλά κυτταρικά τοιχώματα. Συνολικά αποτελείται από

περισσότερα από 200 είδη με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση, χαρακτηριστικό των οποίων είναι γυαλιστερή ή θαμπή επιφάνεια του σκληρού («ξυλοποιημένου») πύλου, η οποία συνδέεται με την παρουσία παχύτοιχων πιλοκουστιδίων. Τα είδη του γένους *Ganoderma* εμφανίζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά που επηρεάζονται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη σχετική ποικιλότητα εντός του κάθε είδους. Έτσι η χρήση τους στην ταξινομική οδηγεί συχνά σε μεγάλη σύγχυση λόγω της έντονης φαινοτυπικής πλαστικότητας που εμφανίζουν, με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να γίνεται χρήση των μοριακών δεικτών για τη διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών (Fryssouli et al. 2017).

Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (*G. lucidum* και *G. lingzhi*) έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Σε αντίθεση με όλα τα προαναφερθέντα είδη που σχηματίζουν σαρκώδη μανιτάρια, τα είδη *Ganoderma* παράγουν καρποσώματα με ξυλώδη υφή που δεν επιτρέπει την κατανάλωση τους (ως έχουν) από τον άνθρωπο. Ο πύλος (2-30 cm) είναι γυαλιστερός εμφανίζοντας χρωματικές ζώνες οι οποίες σκουραίνουν από την περιφέρεια προς το εσωτερικό (από λευκό στην περιφέρεια, κίτρινο και πορτοκαλί στη συνέχεια μέχρι και σκούρο κόκκινο στο σημείο επαφής με το στύπο). Η πορώδης στρώση αποτελείται από κυκλικούς πόρους μήκους έως 2 cm, είναι λευκή αρχικά και λαμβάνει σκούρο καφέ χρώμα κατά την ωριμότητα. Το έκκεντρο πόδι είναι επίσης γυαλιστερό, ενώ το μήκος του μπορεί να ξεπεράσει τα 20 cm. Τα σπόρια είναι καφέ χρώματος με διαστάσεις 9-12 × 5,5-8 μm. Όσον αφορά τις οικολογικές τους προσαρμογές, μπορούν να αναπτυχθούν παρασιτώντας αλλά και αποδομώντας το ξύλο πλατύφυλλων δέντρων (κυρίως ειδών *Quercus*) προκαλώντας λευκή σήψη.

Από το *Ganoderma lucidum* (γνωστό και ως reishi mushroom) παράγονται ορισμένα από τα πιο διαδεδομένα φαρμακευτικά σκευάσματα στις Ασιατικές χώρες, όπου το συγκεκριμένο μανιτάρι χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα (Bishop et al. 2015). Λόγω της συνεχούς αύξησης της ζήτησης των μανιταριών *G. lucidum* και των ποιοτικών/ποσοτικών διακυμάνσεων στη χημική σύσταση των αυτοφυών καρποσωμάτων, από το 1970 έχει ξεκινήσει η εμπορική του καλλιέργεια, κυρίως σε εμπλουτισμένο ροκανίδι πλατύφυλλων δέντρων αλλά και σε υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο σιτηρών, φλοιό βαμβακόσπορου, σπάδικες καλαμποκιού και άλευρα σιτηρών (Li et al. 2016, Xia et al. 2003, Zhou et al. 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων οδήγησε σε μεγάλη αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας σε μανιτάρια. Τιμές βιολογικής αποδοτικότητας μεγαλύτερες από 75% έχουν αναφερθεί σε υπόστρωμα από άχυρο

καλαμποκιού εμπλουτισμένο με άλευρα ρυζιού και καλαμποκιού ή σε υπολείμματα σόγιας (Ji et al., 2001). Επιπλέον τα συγκεκριμένα υποστρώματα επηρέασαν και τη σύσταση των παραγόμενων μανιταριών, προκαλώντας αύξηση στην περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες καθώς και στην αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και κυτοτοξική δράση τους σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν στο συμβατικό υπόστρωμα (Ji et al., 2001).

Τα μανιτάρια και το μυκήλιο του είδους *G. lucidum* περιέχουν περισσότερα από 400 διαφορετικά βιοδραστικά συστατικά με κύριους εκπροσώπους τα τριτερπενοειδή και τους πολυσακχαρίτες, όπως επίσης και αρκετά στεροειδή, στερόλες, πρωτεΐνες, πεπτίδια και λιπαρά οξέα (Paterson, 2006). Οι θεραπευτικές του ιδιότητες έχουν μελετηθεί εκτενώς και πολλές εκατοντάδες εργασίες έχουν δει το φως της δημοσιότητας τα τελευταία 30 χρόνια. Σήμερα, η καλλιέργεια του *G. lucidum* σε τεχνητά υποστρώματα έχει οδηγήσει σε ευρεία χρήση των μανιταριών και των σχετικών σκευασμάτων (80 – 85% προέρχονται από καρποσώματα), όχι μόνο ως αφεψήματα και συμπληρώματα διατροφής αλλά και ως φάρμακα για την πρόληψη ή/και την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η ηπατίτιδα, ο διαβήτης, η υπέρταση, και η λευχαιμία. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντιγηραντικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και υπνωρυθμιστικές ιδιότητες (Li et al. 2016, Paterson 2006, Zhou et al. 2012).

## 1.6 Εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών – Δυνατότητες αξιοποίησης

Η συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή των μανιταριών σε παγκόσμιο επίπεδο, αναπόφευκτα οδηγεί στη συσσώρευση του κύριου παραπροϊόντος της καλλιέργειας που ονομάζεται “εξαντλημένο υπόστρωμα” (spent mushroom substrate). Αυτό αποτελείται από το υπόλειμμα του υποστρώματος και τις μυκηλιακές υφές που αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Γενικά κάθε κύκλος καλλιέργειας διαρκεί 2 - 4 μήνες και στο τέλος του, το υπόστρωμα αντικαθίσταται με νέο. Για τα περισσότερα είδη, η παραγωγή 100 τόνων μανιταριών αντιστοιχεί σε 400 – 500 τόνους εξαντλημένου υποστρώματος. Συνήθως, το εν λόγω υλικό καίγεται, διασπείρεται σε αγρούς για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών του εδάφους ή κομποστοποιείται με άλλα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα είναι η έλλειψη κεντρικού σχεδιασμού για την αξιοποίηση του παραπάνω υλικού. Οι υπόλοιπες δυσκολίες που πρέπει να ξεπεραστούν για την ολοκληρωμένη διαχείριση του συνοψίζονται στον Πίνακα 1.6.1.

**Πίνακας 1.6.1. Εμπόδια στην ολοκληρωμένη διαχείριση του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών.**

Εμπόδια στην διαχείριση του εξαντλημένου υποστρώματος	Περιγραφή του προβλήματος	Προτεινόμενη λύση
Μη επιτηρούμενη διαχείριση	Συνήθως δίνεται άδεια λειτουργίας χωρίς να προβλέπεται η βιώσιμη διαχείριση του εξαντλημένου υποστρώματος	Απαίτηση από την πολιτεία για ορθολογική διαχείριση του εξαντλημένου υποστρώματος
Πλαστικές σακούλες υποστρώματος	Η χρήση μη-βιοδιασπώμενου πλαστικού οδηγεί σε αύξηση των απορριμμάτων που οδηγούνται σε χωματερές	Καθιέρωση στρατηγικής ανακύκλωσης
Αποτέφρωση	Οικονομικά ασύμφορο σε μικρή κλίμακα. Απαιτεί κεντρική διαχείριση	Εφαρμογή νέων μεθόδων διαχείρισης:
Καύση	Μη φιλική περιβαλλοντικά πρακτική. Παράγει CO <sub>2</sub> και μικροσωματίδια επιβαρύνοντας την ατμόσφαιρα	Ανάκτηση ενζύμων Βιοεξυγίανση Ζωοτροφές

Έλλειψη γης και χώρων υγειονομικής ταφής	Μικρή διάθεση σε ελεύθερες εκτάσεις. Επίσης θα πρέπει να ελέγχεται η προσθήκη N και P που επιφέρει η προσθήκη του εξ. υποστρώματος	Παραγωγή ενέργειας Εδαφοβελτιωτικά
--	--	---------------------------------------

Αν και σε πολλές περιπτώσεις το παραπάνω παραπροϊόν αναφέρεται σαν απόβλητο, έχει αποδειχθεί ότι πληθώρα εφαρμογών μπορούν να εφαρμοστούν για την πλήρη και ολοκληρωμένη διαχείριση του οδηγώντας ταυτόχρονα στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Οι σημαντικότερες από αυτές αναφέρονται στη συνέχεια.

### 1.5.2 Ανάκτηση ενζύμων και χρήση τους σε εφαρμογές βιοεξυγίανσης

Συνήθως η παραγωγή ενζύμων από μύκητες λευκής σήψης για βιομηχανικούς σκοπούς προέρχεται από καλλιέργειες σε υγρά μέσα. Ωστόσο, τα ίδια ένζυμα μπορούν να εκχυλιστούν και από ζυμώσεις σε στερεά υποστρώματα, όπως αυτή της καλλιέργειας μανιταριών, σε μία διαδικασία που μιμείται τη φύση (Pandey et al. 2000). Μετά το τέλος της συγκομιδής, στο υπόστρωμα υπάρχει αφθονία εξωκυτταρικών ενζύμων. Από αυτά, η λακκάση (EC 1.10.3.2) είναι το πιο άφθονο και καλύτερα διατηρημένο στο εξαντλημένο υλικό της καλλιέργειας των *A. bisporus* (Mayolo-Deloisa et al., 2009), *Pleurotus sajor-caju* (Kumaran et al., 1997, Singh et al. 2003) και *P. ostreatus*, *L. edodes*, *Flammulina velutipes* και *Hericium erinaceum* (Ko et al. 2005). Η παραγωγή της υπεροξειδάσης της λιγνίνης στο εξαντλημένο υπόστρωμα του *P. sajor-caju*, μετρήθηκε μεγαλύτερη κατά 2-, 22-, 30- και 86- φορές συγκριτικά με αυτήν της β-γλυκοσιδάσης, της λακκάσης, της ξυλανάσης και της κυτταρινάσης αντίστοιχα (Singh et al. 2003). Το είδος αλλά και η ποσότητα των ενζύμων που παραμένουν στο εξαντλημένο υπόστρωμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με το είδος του μύκητα αλλά και τη σύσταση του υποστρώματος (Ball and Jackson 1995). Στον Πίνακα 1.6.2. παραθέτονται πληροφορίες για τα ένζυμα που έχουν προσδιοριστεί στο εξαντλημένο υπόστρωμα ορισμένων εκ των πιο διαδεδομένων καλλιεργούμενων μανιταριών.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας στην ανάκτηση των ενζύμων από το εξαντλημένο υπόστρωμα είναι η βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης. Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες μεθοδολογίες όπως η διάλυση, η υπερδιήθηση, η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων και η διήθηση με gel για την περίπτωση της λακκάσης (Chen et al. 2004, Nagai et al. 2002, Quaratino et al. 2007, Ullrich et al. 2005). Ωστόσο, οι περισσότερες δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί σε καρποφορίες ή καθαρό μυκήλιο και όχι σε εξαντλημένο

υπόστρωμα. Η πιθανή χρήση υδατικών συστημάτων δύο φάσεων κερδίζει επίσης έδαφος (Benavides and Rito-Palomares 2008) καθώς έχει οδηγήσει σε ανάκτηση της λακκάσης σε ποσοστό έως και 95% (Mayolo-Deloisa et al. 2009). Συνολικά στους παράγοντες που επηρεάζουν την παραλαβή ενζύμων από το εξαντλημένο υπόστρωμα περιλαμβάνονται το pH, η θερμοκρασία, το μέσο εκχύλισης, ο χρόνος επώασης, η πυκνότητα του εμβολίου και η πηγή αζώτου (Phan and Sabaratnam, 2012).

**Πίνακας 1.6.2. Λιγνοκυτταρινολυτικά ένζυμα που έχουν προσδιοριστεί σε διάφορους τύπους εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών.**

Ένζυμο		Είδος μανιταριού	Υπόστρωμα	ΠΗΓΗ
α- Αμυλάση	EC 3.2.1.1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ροκανίδι ξύλου	Ko et al. (2005)
Κυτταρινάση	EC 3.2.1.4	<i>Lentinula edodes</i>		
β-Γλυκοσιδάση	EC 3.2.1.21			
Λακάση	EC 1.10.3.2	<i>Flammulina velutipes</i>		
Ξυλανάση	EC 3.2.1.8	<i>Hericium erinaceus</i>		
Υπεροξειδάση της λιγνίνης	EC 1.11.1.14	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Ροκανίδι ξύλου, άλερα φοίνικα (Metroxylon sagu)	Kumaran et al. (1997) Singh et al. (2003)
Κυτταρινάση	EC 3.2.1.4			
β-Γλυκοσιδάση	EC 3.2.1.21	Εμπορικό Εξαντλημένο υπόστρωμα	Άχυρο σίτου	Ball and Jackson (1995)
Λακκάση	EC 1.10.3.2			
Ξυλανάση	EC 3.2.1.8			
Ένζυμα αποδόμησης της ξυλάνης	Ενδοξυλανάση			
Ένζυμα αποδόμησης της κυτταρίνης	6-Ξυλοσιδάση			
	Αραβινοφουρανοσιδάση			
	Ακέτυλοεστεράση			
Ένζυμα αποδόμησης της λιγνίνης	Ενδογλουκανάση			
	Κελλομπιοσιδάση			
	β-Γλυκοσιδάση			
Ένζυμα αποδόμησης της λιγνίνης	Περοξειδάση			
	Φαινολ-οξειδάση			
Λακκάση	EC 1.10.3.2	<i>Agaricus bisporus</i>	-	Mayolo-Deloisa et al. (2009)

Η βιοεξυγίανση με ακινητοποιημένα ένζυμα που εξάγονται από εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών αποτελεί μία οικονομική προσέγγιση, η οποία βοηθά επιπλέον και

στην απόκτηση προστιθέμενης αξίας στο κύριο υπόλειμμα της καλλιέργειας των μανιταριών. Οι περιπτώσεις που έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα η αποδόμηση δύσκολα αποδομήσιμων και επικίνδυνων για το περιβάλλον ρύπων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.6.3.

**Πίνακας 1.6.3. Χρήσεις εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών στη βιοαποδόμηση επικίνδυνων ρύπων.**

Τύπος ρύπου	Προέλευση εξαντλημένου υποστρώματος	ΠΗΓΗ
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)	<i>Agaricus bisporus</i>	Li et al. (2010)
	<i>Pleurotus eryngii</i>	
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	
	<i>Coprinus comatus</i>	
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Lau et al. (2003) Eggen (1999)
Φαινολικά συστατικά Βιοκτόνα - Γεωργικά φάρμακα	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i>	Ayotamuno et al. (2010) Trejo-Hernandez et al. (2001) Chiu et al. (1998) Law et al. (2003)
	<i>Agaricus bisporus</i>	Córdova Juarez et al. (2011) Ahlawat et al. (2010) Karanasios et al. (2010) Kadian et al. (2008)
	<i>Agaricus bisporus</i> (75%) και είδη <i>Pleurotus</i> (25%) <i>Agaricus blazei</i>	Gonzalez Matute et al. (2012)
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Pleurotus sajor-caju</i>	Chiu et al. (2009) Chen et al. (2005) Singh et al. (2002)
	<i>Pycnoporus sanguineus</i> <i>Lentinus polychrous</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Singh et al. (2010) Annuar et al. (2009) Khammuang and Sarnthima (2007) Papinutti and Forchiassin (2010) Zhou et al. (2011) Acid mine drainage Not determined Cheong et al. (2010)
Στραγγίσματα ορυχείων	Δεν προσδιορίζεται	Cheong et al. (2010) Newcombe and Brennan (2010)

## 1.6.2 Παρασκευή ζωοτροφών

Το αρχικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μανιταριών, αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, λιγνίνη και μικρό ποσοστό πρωτεϊνών και κρίνεται ακατάλληλο για την διατροφή των οικόσιτων ζώων (Zhu et al. 2012). Μετά το τέλος της



καλλιέργειας όμως, οι ενζυμικές διεργασίες που έχουν προηγηθεί το καθιστούν περισσότερο εύπεπτο και μπορεί να καταναλωθεί κυρίως από μηρυκαστικά ζώα (Adamović et al. 1998, Streeter et al. 1982). Οι μύκητες λευκής σήψης, είναι γνωστό ότι αποδομούν την άπεπτη λιγνίνη και αυξάνουν την *in vivo* δυνατότητα χώνευσης της ξηρής βιομάζας των λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Αντιστοίχως, αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, λίπος και τέφρα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Σύμφωνα με τους Zhu et al. (2012), η πιο αξιοσημείωτη μείωση στο εξαντλημένο υπόστρωμα αφορά την ημικυτταρίνη (17%), την κυτταρίνη (15%), τη λιγνίνη (4%) και την φυσική φαινόλη γκοσσυπόλη (60%). Το γεγονός αυτό, τα καθιστά κατάλληλα για χρήση στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών ζώων. Αυτό εξάλλου έχει επιβεβαιωθεί σε πειράματα που δοκιμάστηκαν τα παραπάνω υλικά στην θρέψη βοοειδών Holstein (Ayala et al., 2011) και προβάτων (Fazaeli and Masoodi 2006). Επιπλέον, το εξαντλημένο υπόστρωμα είναι εμπλουτισμένο σε πολυσακχαρίτες, βιταμίνες και ορισμένα ιχνοστοιχεία όπως Fe, Zn και Mg τα οποία είναι απαραίτητα στην καθημερινή διατροφή των ζώων (Medina et al. 2009, Paredes et al. 2009, Zhu et al. 2012).

Σύμφωνα με τους Zhang et al., (1995), το περιεχόμενο του εξαντλημένου υποστρώματος σε πρωτεΐνες αυξάνεται έως και 70% υπό συνθήκες στερεάς ζύμωσης, γεγονός που το μετατρέπει σε κατάλληλη πηγή αζώτου για πουλερικά και θηλαστικά. Ωστόσο από τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, γίνεται αντιληπτό ότι δεν είναι εύκολα αποδεκτή από όλα τα ζώα η προσθήκη του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών στο σιτηρέσιο τους. Για παράδειγμα, μετρήθηκε μείωση στην πρόσληψη τροφής κατά 10 – 17% όταν προστέθηκε εξαντλημένο υπόστρωμα από καλλιέργεια *P. ostreatus*, σε σύγκριση με το μάρτυρα (Adamović et al., 1998). Αντιστοίχως, η αποδοχή του μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση της περιεκτικότητας του υποστρώματος από *A. bisporus* στο σιτηρέσιο (από 10 ή 20% σε 30%, Fazaeli and Masoodi 2006). Επιπλέον, η παρουσία φαινολικών συστατικών ως αποτέλεσμα της μερικής αποδόμησης της λιγνίνης (ή και η παρουσία αυτούσιας της λιγνίνης) επιδρά αρνητικά στην ευπεπτότητα. Γενικά, η ενσωμάτωση του εξαντλημένου υποστρώματος στο σιτηρέσιο ζώων δεν είναι απλή διαδικασία και απαιτεί πειραματισμό, ενώ θα πρέπει σε κάθε περίπτωση να εκτιμώνται το είδος του μύκητα αλλά και η αποδοχή από το ζώο στο οποίο πρόκειται να χορηγηθεί, η φύση του υποστρώματος, ο βαθμός αποδόμησης και η πεπτικότητα του. Στον Πίνακα 1.6.4. συνοψίζονται οι δοκιμές που έχουν γίνει για την ενσωμάτωση εξαντλημένου υποστρώματος στο σιτηρέσιο οικόσιτων ζώων.

**Πίνακας 1.6.4. Δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί για την ενσωμάτωση εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών ως συστατικού του σιτηρεσίου οικόσιτων ζώων.**

Είδος μανιταριού	Υπόστρωμα	Είδος ζώου που δοκιμάστηκε	ΠΗΓΗ
<i>Pleurotus</i> sp., <i>Cyclocybe cylindracea</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus</i> sp. και <i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου	-	Zadrazil and Puniya (1995)
<i>Lentinula edodes</i> <i>Pleurotus florida</i>	Άχυρο σίτου	- Βουβάλια	Zhang et al. (1995) Kakkar and Dhanda (1998)
<i>Agaricus bisporus</i>	Άχυρο ρυζιού Άχυρο σίτου	Βοοειδή Holstein Αρσενικά πρόβατα	Kakkar et al. (1990) Kim et al. (2011b) Fazaeli and Masoodi (2006)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus</i> sp.	Άχυρο σίτου Ροκανίδι	Βοοειδή Βοοειδή Holstein Μόσχες μετά τον απογαλακτισμό	Ayala et al. (2011) Adamović et al. (1998) Kim et al. (2011a)
<i>Pleurotus eryngii</i> και <i>Pleurotus ostreatus</i>	Άχυρο ρυζιού	Βοοειδή Hanwoo	Oh et al. (2010)

### 1.6.3 Φυτική παραγωγή

Μια από τις συνηθέστερες εφαρμογές του εξαντλημένου υποστρώματος είναι η εφαρμογή του σε καλλιεργούμενα εδάφη. Συγκεκριμένα, το υλικό που προέρχεται από την ανάπτυξη του *A. bisporus* έχει αξιοποιηθεί στην παραγωγή πληθώρας κηπευτικών, συμπεριλαμβανομένων του σπαραγγιού, παντζαριού, κουνουπιδιού, λάχανου σέλινου, αγγουριού, μαρουλιού, κρεμμυδιού, πατάτας, τομάτας κ.α. ( Wang et al., 1984a,b, Schwank, 198, Nguyen et al., 1987, Maynard, 1989, 1991, 1994b, Stephens et al., 1989, Faassen et al., 1992, Pill et al., 1993, Abak et al., 1994, Maher, 1994, Ranganathan and Selvaseelan, 1994, 1997a, Rhoads and Olson, 1995, Sochtig and Grabbe, 1995, Stewart, et al., 1998b, 1998c, Selvi and Selvaseelan, 1999, Maher et al., 2000, Medina et al., 2009, Kwack et al., 2012). Το υπόστρωμα των *Pleurotus* έχει δοκιμαστεί στην συγκαλλιέργεια λάχανων και μελιτζάνας, Abdallah et al., 2000), την παραγωγή μαρουλιών (Batista et al., 2000, Kwack et al., 2012), τομάτας, κολοκυθιών και πιπεριάς (Medina et al., 2009), αγγουριού (Nguyen et al., 1987), καλαμποκιού (Adamović et al., 2007) και πιπεριών (Medina et al., 2009).

Ακόμη, το εξαντλημένο υπόστρωμα του *Lentinula edodes* εφαρμόστηκε στο έδαφος δίνοντας ικανοποιητική παραγωγή τομάτας (Lin and Chuen, 1993), ενώ του *Flammulina velutipes* χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια πεπονιού (Van Tam and Wang, 2015). Το εξαντλημένο υπόστρωμα των *Agaricus bisporus* έχει δοκιμαστεί με επιτυχία στην

καλλιέργεια πυρηνόκαρπων (Robbins et al., 1986), μηλοειδών (Koch, 1980, Delver, 1982, Delver and Wertheim, 1988, AntSaoir et al., 2000) και σταφυλιών (Larrieta et al., 2010, Peregrina et al., 2012). Επίσης η συγκομποστοποίηση του με οινολάσπη φαίνεται ότι οδηγεί στην παραγωγή υψηλής ποιότητας κομπόστ και τη συνεπακόλουθη χρήση του ως εδαφοβελτιωτικό (González-Marcos et al., 2015).

#### 1.6.4 Επαναχρησιμοποίηση στην καλλιέργεια μανιταριών

Η μερική αποδόμηση του υποστρώματος κατά την καλλιέργεια των μανιταριών, έχει αποδειχθεί ότι επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση του, τόσο για την προετοιμασία υποστρωμάτων του ίδιου είδους όσο και για την καλλιέργεια άλλων ειδών. Το εξαντλημένο υπόστρωμα του *A. bisporus* έχει δοκιμαστεί για τον σκοπό αυτό στην καλλιέργεια των *Agaricus bisporus* (Mamiro et al., 2007, Mamiro and Royle, 2008), ειδών *Auricularia* (Sharma and Jandaik, 1994), *Lentinula edodes* (Kilpatrick et al., 2000), ειδών *Pleurotus* (Mueller et al., 1984, Sharma and Jandaik, 1994) και *Volvariella volvacea* (Poppe, 2000).

Επιπροσθέτως, το εξαντλημένο υπόστρωμα ειδών *Pleurotus* έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην παραγωγή μανιταριών ειδών *Pleurotus* (Shashirekha et al., 2002, Pardo-Giménez et al., 2012a,b), του *Agaricus blazei* (Gern et al., 2010, González-Matute et al., 2011) και ειδών *Stropharia* (Poppe, 1995). Τέλος το εξαντλημένο υπόστρωμα του *Lentinula edodes* αλλά και του *Volvariella volvacea* αξιολογήθηκαν στο παρελθόν για την ανάπτυξη ειδών *Pleurotus* (Chang and Miles, 1989, Royle, 1993)

Η καλλιέργεια μανιταριών του γένους *Agaricus* απαιτεί την εφαρμογή ενός στρώματος επικάλυψης του υποστρώματος (casing) για την αύξηση της απόδοσης και την παραγωγή ποιοτικών μανιταριών. Τα εξαντλημένα υποστρώματα που προέρχονται από την παραγωγή τόσο του ίδιου είδους (Pardo-Giménez et al., 2011, 2012a,b) όσο και των *Pleurotus* (Kim et al., 1998) έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αντικαταστήσουν τα υπάρχοντα υλικά, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ολοκληρωμένη διαχείριση του υλικού.

#### 1.6.5 Εφαρμογές φυτοπροστασίας

Μη κομποστοποιημένα υλικά, κομπόστ, κοπριά και εκχυλίσματα από κομπόστ έχουν αναπτυχθεί ως εναλλακτικά σκευάσματα της χρήσης χημικών για την καταπολέμηση εντόμων και ασθενειών στην αγροτική παραγωγή (Litterick et al., 2004). Το εξαντλημένο

υπόστρωμα μανιταριών επίσης έχει δοκιμαστεί για τον ίδιο λόγο, όπως για παράδειγμα αυτό της καλλιέργειας *A. bisporus* για την αντιμετώπιση του σκαθαριού της πατάτας (Stoner et al., 1996; Gent et al., 1998) και ως εναλλακτικό του βρωμομεθανίου στην καλλιέργεια φράουλας (Sances and Ingham, 1997).

Το εξαντλημένο υπόστρωμα του *A. bisporus*, εκχυλίσματα αυτού ή κομπόστ στο οποίο περιέχεται έχουν εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών και εχθρών των καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων ειδών *Pythium* και *Phytophthora* που προσβάλλουν την τομάτα και το αγγούρι (Goonani et al. 2011, Philippoussis et al., 2004, Reigner et al., 2001), του μυκοπαρασίτου *Lecanicillium fungicola* των λευκών μανιταριών (Gea et al., 2012, 2014, Riahi et al., 2012), νηματωδών (Aslam and Saifullah, 2013) κ.α. Επιπλέον, το υπόστρωμα μετά το πέρας της καλλιέργειας *Pleurotus* έχει δοκιμαστεί με επιτυχία εναντίων ασθενειών του αγγουριού και της τομάτας (Parada et al., 2012) και νηματωδών (Hibbett and Thorn, 1994, Aslam and Saifullah, 2013), ενώ αυτό του *Lentinula edodes* εναντίων της *Rhizoctonia* του λάχανου (Huang and Huang, 2000).

### 1.6.6 Παραγωγή ενέργειας και άλλες εφαρμογές

Από την Κίνα προέρχεται το 70% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής μανιταριών, ενώ η μεγαλύτερη μάζα του εξαντλημένου υποστρώματος καίγεται στους τόπους παραγωγής (Zhu et al., 2013). Το υπόστρωμα μετά την συγκομιδή των μανιταριών *A. bisporus* έχει εξεταστεί ως πιθανή πηγή βιοκαυσίμου (Karv et al., 2012), και παραγωγής βιοαερίου (Tumwasorn et al., 1980). Αναλόγως, τα παραπροϊόντα της καλλιέργειας *Pleurotus* και *Lentinula edodes* διερευνήθηκαν στο παρελθόν για την παραγωγή βιοαερίου (Bisaria et al., 1990, Mehta et al., 1990) και εναλλακτικών καυσίμων (Asada et al., 2011, Lin et al., 2015).

Εκτός των παραπάνω, το εξαντλημένο υπόστρωμα των *A. bisporus* έχει δοκιμαστεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως στρωμή γουρουνιών (Beattie et al., 2001), για την παραγωγή ενεργού άνθρακα (Ma et al., 2014), ως υλικό-φορέας για την παραγωγή βιοεμβολίων (Bahl et al., 1989) και ως δομικό υλικό για την μόνωση σε τούβλα (Muñoz Velasco et al., 2014) ή την ενίσχυση του σκυροδέματος (Russell et al., 2005).

Συμπερασματικά η βιομηχανία της παραγωγής μανιταριών, εκτός από τα μανιτάρια που προορίζονται για ανθρώπινη τροφή παράγει επίσης ένα χρήσιμο προϊόν, το οποίο υπό προϋποθέσεις θα μπορούσε να προσφέρει μία ακόμη πηγή εισοδήματος στους καλλιεργητές. Λόγω του τεράστιου όγκου παραγωγής του δεν είναι δυνατή η διάθεση των

σχετικών υπολειμμάτων σε μια συγκεκριμένη κατηγορία εφαρμογής, αλλά θα πρέπει να προσαρμόζεται στην κάθε περίπτωση αναλόγως του τελικού προϊόντος και δυνατοτήτων αξιοποίησης που υπάρχουν σε τοπικό επίπεδο.

## 1.7 Οργάνωση των πεπραγμένων της παρούσας διατριβής

Οι εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διαχωρίστηκαν σε δύο Ενότητες και οκτώ Κεφάλαια, τα οποία πραγματεύονται επιμέρους αντικείμενα που συνδέονται ευθέως με τους στόχους που προαναφέρθηκαν. Κάθε Κεφάλαιο είναι διαρθρωμένο σε Εισαγωγή, Υλικά και Μέθοδοι, Αποτελέσματα και Συζήτηση και Συμπεράσματα.

Η πρώτη Ενότητα αναφέρεται στη βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων με τη χρήση βασιδιομυκήτων για την παραγωγή εδώδιμων – φαρμακευτικών μανιταριών και περιλαμβάνει έξι Κεφάλαια. Το Κεφάλαιο 2.1 αναφέρεται στον προσδιορισμό της ενδοειδικής ποικιλότητας που εμφανίζει το *Pleurotus ostreatus*, όσον αφορά στις καλλιεργητικές παραμέτρους και σε επιλεγμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των μανιταριών που παράγονται υπό όμοιες συνθήκες (υπόστρωμα, περιβαλλοντικές παράμετροι ανάπτυξης). Τα εξαγόμενα της συγκεκριμένης εργασίας συνέβαλαν επίσης στην επιλογή-πρόκριση συγκεκριμένων στελεχών του είδους προς αξιολόγηση στις εργασίες που ακολούθησαν. Στο Κεφάλαιο 2.2 διερευνήθηκε η παραγωγή μανιταριών σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών λιγνοκυτταρινούχων παραπροϊόντων χρησιμοποιώντας δύο είδη βασιδιομυκήτων (*P. ostreatus* και *C. cylindracea*). Επιπλέον, μελετήθηκαν οι μεταβολές που επιφέρει η ανάπτυξη των παραπάνω μυκήτων στη σύσταση του υποστρώματος, καθώς επίσης και η επίδραση που τα συγκεκριμένα παραπροϊόντα παρουσίασαν στη σύσταση των καρποφοριών. Ακολούθως η παρούσα μελέτη εστίασε στην αξιολόγηση υπολειμμάτων οινοποιίας και αποβλήτων-παραπροϊόντων ελαιουργίας και ελαιοκομίας ως προς την καταλληλότητα τους να υποστηρίξουν την καλλιέργεια διαφορετικών ειδών βασιδιομυκήτων (οκτώ είδη από τα γένη *Pleurotus*, *Cyclocybe*, *Hericium* και *Ganoderma*), καθώς και στον προσδιορισμό των επιπτώσεων στη σύσταση και σε επιλεγμένα ποιοτικά-διατροφικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων μανιταριών (Κεφάλαια 2.3 έως 2.6).

Η δεύτερη Ενότητα περιλαμβάνει τη διαχείριση αποβλήτων ελαιοτριβείου με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης. Στο Κεφάλαιο 2.7 εξετάστηκε μεγάλο πλήθος διαφορετικών ειδών βασιδιομυκήτων όσον αφορά στην αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείων και στη συνέχεια τα αποδοτικότερα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των ενζύμων στη διαδικασία αποδόμησης. Τέλος, στο Κεφάλαιο 2.8 πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές αξιοποίησης βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων από επιλεγμένα στελέχη μυκήτων λευκής σήψης για την

παραγωγή οργανικών εδαφοβελτιωτικών και αξιολογήθηκε η εφαρμογή του σε καλλιέργεια κηπευτικών.





---

# Κεφάλαιο 2

---

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



---

# Κεφάλαιο 2.1

---

Διερεύνηση της ενδοειδικής  
ποικιλότητας των καλλιεργητικών  
παραμέτρων και της συγκέντρωσης  
επιλεγμένων βιοδραστικών  
συστατικών σε μανιτάρια του είδους  
*Pleurotus ostreatus*

### 2.1.1 Εισαγωγή

Η επιτυχής καλλιέργεια των μανιταριών εξαρτάται κυρίως από τη χρήση των κατάλληλων υποστρωμάτων και την επιλογή αποδοτικών στελεχών. Βασική προϋπόθεση για το τελευταίο είναι η ύπαρξη ευρείας γενετικής βάσης του βιολογικού υλικού, όπως έχει αποδειχθεί στο παρελθόν για το είδος *Agaricus bisporus* (Callac et al., 2002, Kerrigan, 1995). Το κάθε στέλεχος ανταποκρίνεται διαφορετικά σε διάφορες καλλιεργητικές συνθήκες και στα υποστρώματα ανάπτυξης όσον αφορά την απόδοση, την παραγωγικότητα, τη διάρκεια του κύκλου καλλιέργειας, όπως επίσης και την ποιότητα και σύσταση των παραγόμενων μανιταριών. Στο παρελθόν, έχει εκτενώς εξεταστεί η επίδραση της χρήσης διαφορετικών υποστρωμάτων στις καλλιεργητικές παραμέτρους και τη σύσταση των τελικού προϊόντος. (Curvetto et al., 2002, Largeteau et al., 2011, Llarena-Hernandez et al., 2013, Lechner and Alberto, 2011, Philippoussis et al., 2003, Zied et al., 2016). Ωστόσο, στις περισσότερες των περιπτώσεων εξετάζονται μόνο ένα ή το πολύ δύο - τρία στελέχη του εκάστοτε είδους. Αυτή η τυχαία ή/και περιορισμένη χρήση του βιολογικού υλικού μπορεί να οδηγήσει σε αποτελέσματα που δεν είναι ορθά, δηλαδή ενδεικτικά-αντιπροσωπευτικά του είδους που μελετάται.

Στο παρόν Κεφάλαιο παρουσιάζεται η ενδοειδική ποικιλότητα του είδους *P. ostreatus* μελετώντας ένα μεγάλο αριθμό (16) στελεχών σε σχέση με τις βασικές παραμέτρους καλλιέργειας και την περιεκτικότητα των μανιταριών σε βιοδραστικά συστατικά. Επιπλέον στοχεύει στην παρουσίαση του εύρους των τιμών και της επίδρασης των εγγενών/γενετικών παραγόντων στις υπό μελέτη παραμέτρους. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αναμένεται να συμβάλει σημαντικά στην εκμετάλλευση του αντίστοιχου γενετικού υλικού τόσο όσον αφορά στην παραγωγή υβριδίων όσο και στη διαδικασία καλλιέργειας μανιταριών.

### 2.1.2 Υλικά και μέθοδοι

#### 2.1.2.1 Μυκηλιακά στελέχη

Δεκαέξι στελέχη του *P. ostreatus* εξετάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Μεταξύ αυτών συμπεριλήφθηκαν δεκατρία αυτοφυή καθώς και τρία εμπορικά στελέχη ευρείας χρήσης (CS1, CS2 και CS3). Το εν λόγω βιολογικό υλικό διατηρείται σε θρεπτικό υλικό PDA στη μυκητιακή συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### 2.1.2.2 Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού (“σπόρου”) μανιταριών

Τα υποστρώματα ανάπτυξης και το πολλαπλασιαστικό υλικό (spawn) προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Philiproussis et al. (2001) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, για την παραγωγή του πολλαπλασιαστικού υλικού, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωσικές σακούλες πολυπροπυλενίου, στις οποίες βρασμένοι σπόροι σκληρού σίτου αναμίχθηκαν με ανθρακικό ασβέστιο ( $\text{CaCO}_3$ ) 4% w/w και θειικό ασβέστιο ( $\text{CaSO}_4$ ) 2% w/w για την ρύθμιση του pH και την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων αντίστοιχα και ακολούθησε αποστείρωση για 1 h ( $121^\circ\text{C}$ , 1.1 atm). Μετά την πτώση της θερμοκρασίας ( $<30^\circ\text{C}$ ), οι σπόροι εμβολιάστηκαν με το μυκήλιο (δίσκοι διαμέτρου 6mm) και επώαστηκαν στους  $25\text{-}27^\circ\text{C}$  μέχρι την πλήρη κάλυψη του υποστρώματος από τις μυκηλιακές υφές (15-20 ημέρες ανάλογα με το στέλεχος).

Η καλλιέργεια των μανιταριών πραγματοποιήθηκε σε παστεριωμένο άχυρο σίτου το οποίο παραχωρήθηκε από εταιρία παραγωγής μανιταριών (Δίρφυς, Εύβοια). Σάκοι πολυπροπυλενίου γεμίστηκαν με υπόστρωμα (3Kg) και εμβολιάστηκαν με το πολλαπλασιαστικό υλικό σε αναλογία (3% w/w). Για κάθε στέλεχος εξετάστηκαν έξι επαναλήψεις.

Οι συνθήκες κατά την επώαση του μυκηλίου και την ανάπτυξη των καρποφοριών είναι όμοιες με αυτές που αναφέρονται από τους Zervakis et al. (2013). Ο αποικισμός του υποστρώματος από το μυκήλιο του μύκητα επετεύχθη στους  $25^\circ\text{C}$  στο σκοτάδι. Για τον σχηματισμό των καταβολών των μανιταριών η σχετική υγρασία και η θερμοκρασία στην ατμόσφαιρα ρυθμίστηκαν στο 95% και  $15^\circ\text{C}$  και η ένταση του φωτός στα  $700\text{ lux m}^{-2}$ . Κατά την ανάπτυξη των μανιταριών η συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  διατηρήθηκε σε επίπεδα μικρότερα των 1200 ppm, η σχετική υγρασία ήταν 80% και η ένταση του φωτός αυξήθηκε στα  $1000\text{ lux m}^{-2}$ , ενώ η θερμοκρασία αυξήθηκε στους  $18^\circ\text{C}$ .

### 2.1.2.3 Προσδιορισμός των καλλιεργητικών παραμέτρων

Για την αξιολόγηση της καταλληλότητας των διάφορων υποστρωμάτων να υποστηρίξουν την παραγωγή μανιταριών μελετήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

- Η διάρκεια επώασης (χρόνος σε ημέρες μεταξύ του εμβολιασμού του υποστρώματος με τον μύκητα και του πλήρους αποικισμού του υποστρώματος από το μυκήλιο).
- Η πρωιμότητα (χρόνος σε ημέρες μεταξύ του εμβολιασμού του υποστρώματος με τον μύκητα και της εμφάνισης των πρώτων καταβολών μανιταριών).

- Καλλιεργητική περίοδος (χρόνος σε ημέρες μεταξύ της εμφάνισης των πρώτων μανιταριών και της συλλογής του τρίτου κύματος (“flush”) παραγωγής μανιταριών)
- Απόδοση ανά κύμα καρποφορίας (το νωπό βάρος των μανιταριών που συλλέχθηκαν σε κάθε κύμα παραγωγής)
- Μέσο βάρος καρποφοριών (ο λόγος του συνολικού βάρους των μανιταριών προς τον συνολικό αριθμό τους)
- Βιολογική αποδοτικότητα (ο εκατοστιαίος λόγος του συνολικού νωπού βάρους των μανιταριών προς το ξηρό βάρος του υποστρώματος από το οποίο προήλθαν)
- Παραγωγικότητα (ο λόγος της βιολογικής αποδοτικότητας προς την καλλιεργητική περίοδο).

#### 2.1.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων μανιταριών

Των χημικών αναλύσεων προηγήθηκε λυοφιλίωση (-50 °C, 0.05-0.1 mbar) των δειγμάτων και κονιορτοποίηση σε εργαστηριακό μύλο ώστε το μέγιστο μέγεθος των σωματιδίων σε κάθε δείγμα να μην υπερβαίνει τα 0.5 mm. Στη συνέχεια τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C έως την πραγματοποίηση της ανάλυσης.

#### 2.1.2.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών

Τα λιπαρά οξέα προσδιορίστηκαν μέσω της μετατροπής τους σε μεθυλεστέρες (FAME) μετά από σαπωνοποίηση των λυοφιλιωμένων δειγμάτων (100-200 mg) με 0,5M KOH σε μεθανόλη (2ml) για 15 min στους 90 °C. Ακολούθησε αντίδραση με 14% BF<sub>3</sub> σε μεθανόλη (1,5ml) για 2 min στους 90 °C. Οι τελικοί μεθυλεστέρες προσδιορίστηκαν με GC-MS χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο (HP Agilent 6890 Plus Gas Chromatograph, Wallborn, Germany) εξοπλισμένο με επιλεκτικό ανιχνευτή μάζας (MSD-5972) και διαχωρίστηκαν σε τριχοειδή στήλη BPX 70 όπως περιγράφεται από τους Kalogeropoulos et al. (2010). Η αναγνώριση των κορυφών έγινε με βάση το μίγμα 37 γνωστών μεθυλεστέρων (Supelco) και ελέγχθηκε μέσω της NIST05 βιβλιοθήκης φάσματος μάζας.

Οι στερόλες προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται από τους Saprozhnikova et al. (2014). Για το σκοπό αυτό, 100-200 mg λυοφιλιωμένου δείγματος εμπλουτίστηκαν με χοληστερόλη (100 μg/mL, εσωτερικό πρότυπο) και το μείγμα σαπωνοποιήθηκε με 2 mL 3M KOH σε μεθανόλη υπό την επίδραση υπερήχων (10 min) και θέρμανσης (60 °C για 60 min).

Για την αποφυγή της φωτομετατροπής της εργοστερόλης σε βιταμίνη D<sub>2</sub> όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό χαμηλό φωτισμό. Το ασαπνοποιητό κλάσμα εκχυλίστηκε με εξάνιο (2×3 mL), φυγοκεντρήθηκε και τα εκχυλίσματα εξανίου αναμίχθηκαν. Έπειτα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού βάρους (Speed Vac, Labconco Corp.) και οι στερόλες παραγωγοποιήθηκαν σε τριμέθυλ-σιλυλεθέρους (TMS) με BSTFA στους 70 °C για 20 min. Ακολούθως, 1 mL εκχυλίσματος εγχύθηκε στον αέριο χρωματογράφο σε αναλογία (Split ratio) 5:1. Η ανάλυση των παράγωγων TMS στερολών, πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο HP Agilent 6890 σε συνδυασμό με εκλεκτικό ανιχνευτή μάζας HP 5973. Ο διαχωρισμός των στερολών επετεύχθη σε τριχοειδή στήλη HP-5 MS (30 m × 0.25 mm × 250 μm). Χρησιμοποιήθηκε αέριο μεταφοράς (He) υψηλής καθαρότητας με ρυθμό ροής 0,6 mL/min, ενώ ο εγχυτήρας και η γραμμή μεταφοράς του ανιχνευτή MS διατηρήθηκαν στους 220 και 300 °C. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου ρυθμίστηκε σε αρχική θερμοκρασία 210 °C και τελική 300 °C με ρυθμό 5,5 °C/min. Η ταυτοποίηση των κορυφών της χοληστερόλης και της εργοστερόλης βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης (retention time) των πρότυπων ενώσεων, ενώ η ταυτότητα των μεταβολιτών της εργοστερόλης βασίστηκε στην παρουσία των αναμενόμενων θραυσμάτων ιόντων στις κατάλληλες αναλογίες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Phillips et al., 2011, Teichmann et al. 2007). Οι ανιχνεύσιμες στερόλες ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση καμπύλης αναφοράς της εργοστερόλης, η οποία κάλυπτε το εύρος 0-600 μg και με χρήση χοληστερόλης ως εσωτερικό πρότυπο.

#### 2.1.2.6 Εκχύλιση φαινολικών και προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών

Η εκχύλιση των φαινολικών έγινε με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Kalogeropoulos et al. (2013) με μικρές τροποποιήσεις. Λυοφιλωμένα δείγματα (0,5 g) εκχυλίστηκαν με 10 mL μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 48 ώρες στο σκοτάδι. Ο διαχωρισμός των εκχυλισμάτων επετεύχθη με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min και το ίζημα επανεκχυλίστηκε με 2 mL μεθανόλη για 2 h. Έπειτα τα εκχυλίσματα αναμίχθηκαν, η μεθανόλη συμπυκνώθηκε έως τελικού όγκου 2 mL με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστή (Büchi Rotarvacor-R) και 0,5 mL δείγματος αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια GC στους -20 °C.

Το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά στα μεθανολικά εκχυλίσματα μανιταριών και υποστρωμάτων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Folin-Ciocalteu τροποποιημένη σε μικροκλίμακα από τους Arpous et al. (2002). Η απορρόφηση μετρήθηκε

στα 750 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου (U-2001, Hitachi Instruments Inc., USA), ενώ για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέως (mg GAE) ανά 100g νωπών μανιταριών.

### 2.1.2.7 Προσδιορισμός επιμέρους φαινολικών συστατικών και τερπενικών οξέων

Για την ανίχνευση 19 φαινολικών συστατικών, ενός στυλβενίου (ρεσβερατρόλη) και 5 τερπενικών οξέων και διαλκοολών εφαρμόστηκε μια επιλεκτική μέθοδος παρακολούθησης ιόντων (SIM GC-MS method) με τη χρήση της ένωσης 3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol ως εσωτερικό πρότυπο. Τα ιόντα στόχοι και προσδιορισμού προήλθαν από εμπορικά πρότυπα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.1.

**Πίνακας 2.1.1. Ιόντα στόχοι και προσδιορισμού των τριμέθυλο-σιλυλαιθέρων (TMS) απλών πολυφαινολών, στυλβενίων, τερπενικών οξέων και του εσωτερικού προτύπου.**

Χημική ένωση	Target ion (m/z)	Qualifier ions (m/z)
Vanillin	194	209
Cinnamic acid	205	220
Tyrosol	179	267, 282
p-Hydroxybenzoic acid	267	223, 193
p-Hydroxyphenylacetic acid	252	296, 281
3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol (I.S.)	206	191, 179
Phloretic acid	192	310
Vanillic acid	297	267, 312
Homovanillic acid	326	267, 311
Protocatechuic acid	193	355, 370
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	384	267, 179
Syringic acid	327	342, 312
Gallic acid	281	458, 443
Ferulic acid	338	323, 308
Caffeic acid	396	219, 381
Sinapic acid	368	353, 338
Resveratrol	444	445, 443
Chrysin	383	384
Kaempferol	559	560
Chlorogenic acid	345	307, 324
Quercetin	647	559, 575
Oleanolic acid	203	320, 482
Ursolic acid	203	320, 482

Η αναγνώριση των χρωματογραφικών κορυφών έγινε μέσω της σύγκρισης του χρόνου κατακράτησης (retention time) και του λόγου δύο ή τριών θραυσμάτων ιόντων κάθε πολυφαινολικού και τερπενικού συστατικού με αυτό των καθαρών προτύπων. Η



ποσοτικοποίηση επετεύχθη με τη χρήση 3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol ως εσωτερικού προτύπου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του μασλινικού οξέως και των τριτερπενικών διαλκοολών ουβάολη και ερυθροδιόλη βασίστηκε στους συντελεστές απόκρισης του ολεανολικού οξέως.

#### 2.1.2.8 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων μανιταριών

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων υπολογίστηκε από τη μέτρηση της ικανότητας σάρωσης ριζών (radical scavenging activity) και της μείωσης του αντιοξειδωτικού δυναμικού μέσω της χρήσης της “σταθερής” ρίζας DPPH (AAR) και της μείωσης της ισχύος ιόντων σιδήρου (FRAP) αντίστοιχα (Arnous et al., 2002). Στις δύο μεθόδους που προαναφέρθηκαν, για τις καμπύλες αναφοράς χρησιμοποιήθηκε Trolox και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα mmol Trolox (TEs) ανά 100 g νωπών μανιταριών.

Επιπλέον, αξιολογήθηκε η αναστολή της οξείδωσης λιπιδίων επαγόμενων από χαλκό σε ορό αίματος (TSO), σαν μία πιο βιολογικά αποδεκτή μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μεθανολικών εκχυλισμάτων των μανιταριών σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline, PBS). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος υστέρησης σαν κριτήριο για το αντιοξειδωτικό δυναμικό (Aurrekoetxea et al. 2010). Φλεβικό αίμα συλλέχθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες από υγιή ενήλικα άτομα και ο ορός απομονώθηκε μέσω φυγοκέντρησης στις 300 rpm (14 °C, 10 min) αμέσως μετά τη συλλογή. Η κινητική της επαγόμενης από χαλκό οξείδωσης σε αραιωμένο ορό (12 φορές αραιώση) μελετήθηκε μέσω της καταγραφής της απορρόφησης των προϊόντων της οξείδωσης του λίπους στα 245 nm με τη χρήση ELISA reader (PowerWaveXS2, Microplate Spectrophotometer, BioTek). Τη χρονική στιγμή t:0, προστέθηκαν 20 μL CuSO<sub>4</sub> στον ορό, σε τελική συγκέντρωση 10<sup>-5</sup> M σε PBS. Διαφορετικές δόσεις των υπό εξέταση εκχυλισμάτων προστέθηκαν στο μείγμα του 1 μL PBS. Η επαγόμενη από χαλκό οξείδωση των λιπιδίων στον ορό οδηγεί σε συζευγμένα διενικά υδροϋπεροξειδία τα οποία απορροφούν στα 245 nm. Η αντίσταση στην οξείδωση μετρήθηκε μέσω του χρόνου υστέρησης πριν την εμφάνιση οξειδωμένων προϊόντων και εκφράστηκε σε δευτερόλεπτα.

#### 2.1.2.9 Προσδιορισμός β- γλουκανών

Οι ολικές και οι α-γλουκάνες μετρήθηκαν στα δείγματα μανιταριών με τη βοήθεια εμπορικού κιτ (Megazyme Int., Ireland). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι 1,3:1,6-β-D-γκουκάνες, οι 1,3-β-D-γλουκάνες και οι α-γλουκάνες, αρχικά διαλυτοποιούνται σε 12M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και στη συνέχεια υδρολύονται σε 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τα υπολείμματα των γλουκανών υδρολύονται ποσοτικά σε γλυκόζη με τη βοήθεια ενός μείγματος υψηλής καθαρότητας έξω-1,3-β-γλουκανάσης και β-γλυκοσιδάσης. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μέτρηση των ολικών γλουκανών στο δείγμα. Ο προσδιορισμός των α-γλουκανών, γίνεται μέσω της ειδικής υδρόλυσης των γλουκανών σε γλυκόζη με τη χρήση αμυλογλυκοσιδάσης και α-αμυλάσης και η μέτρηση πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου GOPOD. Η περιεκτικότητα σε β-γλουκάνες υπολογίζεται αφαιρώντας το κλάσμα των α-γλουκανών από τις ολικές γλουκάνες.

#### **2.1.2.10 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Στο πείραμα της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις για κάθε στέλεχος. Όλες οι χημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τετραπλούν. Τα αποτελέσματα στους πίνακες παρουσιάζονται ως μέση όροι ± τυπική απόκλιση. Την ανάλυση της διακύμανσης, ακολούθησαν Duncan t- test για την εκτίμηση των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (SPSS version 19). Ο συντελεστής Pearson χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των διάφορων μεταβλητών (για επίπεδα σημαντικότητας 0,05 και 0,01) και η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal component analysis) διεξήχθη με το ίδιο λογισμικό για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ των διάφορων μεταβλητών και την οπτικοποίηση του αποτελέσματος στο επίπεδο των δύο κύριων συνιστωσών. Επιπροσθέτως, ειδικά γραφήματα τύπου “box plot” δημιουργήθηκαν για την απεικόνιση των ακραίων τιμών και τη σύγκριση της κατανομής των εξεταζόμενων παραμέτρων.

### **2.1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση**

#### **2.1.3.1 Αξιολόγηση των καλλιεργητικών παραμέτρων**

Όλα τα υπό εξέταση στελέχη *P. ostreatus* ολοκλήρωσαν το στάδιο της επώασης σε διάστημα 18 ημερών, ενώ ο χρόνος εμφάνισης των πρώτων καρποφοριών διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ του βιολογικού υλικού που αξιολογήθηκε. Πέντε στελέχη χρειάστηκαν

διάστημα μικρότερο των 4 εβδομάδων από την ημέρα του εμβολιασμού μέχρι τη δημιουργία των καταβολών μανιταριών και ως εκ τούτου η πρωιμότητα ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα στελέχη (στα οποία απαιτήθηκαν 28 έως 71 ημέρες, Πίνακας 2.1.2.). Ομοίως, η συνολική καλλιεργητική περίοδος κυμάνθηκε από 12 έως και 44 ημέρες. Αξιοσημείωτο είναι ότι το στέλεχος LGM22 ήταν σημαντικά ταχύτερο συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα, ολοκληρώνοντας τον κύκλο καλλιέργειας σε διάστημα δύο εβδομάδων από την εμφάνιση των πρώτων καρποφοριών.

Η μελέτη μεγάλου αριθμού στελεχών όσον αφορά τις καλλιεργητικές παραμέτρους παρέχει τη δυνατότητα για την ασφαλή διερεύνηση της ενδοειδικής ποικιλότητας. Η πρωιμότητα των μισών περίπου στελεχών που μελετήθηκαν δεν ξεπέρασε τις 4 εβδομάδες και ήταν παρόμοια με αυτή των περισσότερων διαδεδομένων εμπορικών στελεχών. Σε προηγούμενες εργασίες με τη χρήση άχυρου σιτηρών ως βασικού υποστρώματος (Gaitán-Hernández and Salmones, 2008, Obodai et al., 2003, Philippoussis et al., 2001) έχουν αναφερθεί τιμές πρωιμότητας από 2 έως 5 εβδομάδες. Ωστόσο ο εμπλουτισμός του υποστρώματος και η ποσότητα του εμβολίου επηρεάζουν σημαντικά την εν λόγω παράμετρο, ενώ η χρήση εναλλακτικών γεωργικών υπολειμμάτων στο υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διακύμανση στις τιμές της πρωιμότητας (4-10 εβδομάδες), (Rizki and Tamai, 2011, Zervakis et al., 2013). Επομένως, η πρωιμότητα εξαρτάται σημαντικά τόσο από ενδογενείς/γενετικούς παράγοντες όσο και από τη φύση του υποστρώματος.

Η συνολική απόδοση κυμάνθηκε από 161 έως 361 g/kg νωπού υποστρώματος και τα περισσότερα από τα αυτοφυή στελέχη δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα τρία εμπορικά που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2.1.2.). Η κατανομή της παραγωγής μανιταριών ανά κύμα καρποφορίας (flush) ήταν παρόμοια για όλα τα στελέχη αποδίδοντας περισσότερο από το 80% της συνολικής παραγωγής στα δύο πρώτα κύματα, κάτι που είναι επιθυμητό στην εμπορική καλλιέργεια του *P. ostreatus*, καθώς μειώνει σημαντικά τη διάρκεια του κύκλου παραγωγής. Επιπλέον, η βιολογική αποδοτικότητα ξεπέρασε το 65% σε όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν με μόνη εξαίρεση το P443 (44%). Τα στελέχη CS1 και P104 παρουσίασαν την υψηλότερη βιολογική αποδοτικότητα (BA, 109 και 107% αντίστοιχα) η οποία ωστόσο δεν διέφερε σημαντικά από τις τιμές BA των περισσότερων από τα υπόλοιπα στελέχη (65-98%, Πίνακας 2.1.2.).

Η BA ήταν σχετικά υψηλή στα στελέχη που εξετάστηκαν συγκρινόμενη με αντίστοιχες τιμές που αναφέρονται από καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε άχυρο σιτηρών (50-97%) (Carabajal et al., 2012, Gaitán-Hernández and Salmones, 2008, Philippoussis et al., 2001).

Λόγω του γεγονότος ότι η συγκεκριμένη παράμετρος εξαρτάται σημαντικά από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο υπόστρωμα, έχουν αναφερθεί τιμές μέχρι 140%

**Πίνακας 2.1.2. Καλλιεργητικοί παράμετροι 16 στελεχών *P. ostreatus* κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε υπόστρωμα με βάση το άχυρο σίτου. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (n=6). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t- test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφόρων στελεχών.**

Στέλεχος	Γεωγραφική προέλευση	Πρωιμότητα (ημέρες)	Καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	Απόδοση 1 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 2 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 3 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Συνολική απόδοση (g)	Βιολογική αποδοτικότητα (%)	Παραγωγικότητα	Μέσο βάρος μανιταριών (g)
CS1	Εμπορικό στέλεχος	26,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	29,33 ± 2,16 <sup>abcd</sup>	214,14 ± 51,86 <sup>ab</sup>	106,06 ± 44,75 <sup>abcd</sup>	40,77 ± 7,83 <sup>ab</sup>	360,96 ± 58,89 <sup>a</sup>	109,38 ± 17,85 <sup>a</sup>	3,74 ± 0,61 <sup>bc</sup>	25,01 ± 6,53 <sup>ab</sup>
CS2	Εμπορικό στέλεχος	25,67 ± 0,52 <sup>c</sup>	28,50 ± 1,05 <sup>abcd</sup>	116,35 ± 104,51 <sup>ab</sup>	92,86 ± 28,49 <sup>abcd</sup>	21,07 ± 10,14 <sup>ab</sup>	230,28 ± 92,31 <sup>ab</sup>	69,78 ± 27,97 <sup>abc</sup>	2,43 ± 0,93 <sup>bc</sup>	37,65 ± 10,81 <sup>a</sup>
CS3	Εμπορικό στέλεχος	49,80 ± 3,27 <sup>b</sup>	43,60 ± 5,46 <sup>a</sup>	256,50 ± 130,46 <sup>a</sup>	36,33 ± 23,33 <sup>d</sup>	31,17 ± 3,14 <sup>ab</sup>	324,00 ± 151,57 <sup>a</sup>	83,90 ± 33,27 <sup>abc</sup>	1,71 ± 0,71 <sup>bc</sup>	23,74 ± 9,46 <sup>abc</sup>
443	Τσεχία	68,17 ± 9,15 <sup>a</sup>	29,40 ± 7,02 <sup>abcd</sup>	127,36 ± 45,65 <sup>ab</sup>	34,80 ± 14,74 <sup>d</sup>	4,67 ± 0,78 <sup>ab</sup>	161,03 ± 48,19 <sup>b</sup>	43,89 ± 9,27 <sup>c</sup>	1,50 ± 0,44 <sup>c</sup>	14,49 ± 4,44 <sup>bcd</sup>
LGM 22	Γαλλία	20,50 ± 0,55 <sup>c</sup>	11,83 ± 2,32 <sup>d</sup>	120,38 ± 43,42 <sup>ab</sup>	147,95 ± 50,14 <sup>ab</sup>	54,34 ± 20,55 <sup>ab</sup>	322,66 ± 39,36 <sup>a</sup>	97,98 ± 11,93 <sup>ab</sup>	8,51 ± 1,94 <sup>a</sup>	7,16 ± 2,20 <sup>cd</sup>
P 15	Ελλάδα; <i>Fagus sylvatica</i>	28,33 ± 1,21 <sup>c</sup>	29,83 ± 1,83 <sup>abcd</sup>	115,36 ± 22,58 <sup>a</sup>	155,58 ± 29,59 <sup>a</sup>	17,99 ± 6,72 <sup>ab</sup>	288,93 ± 27,66 <sup>ab</sup>	87,55 ± 8,38 <sup>ab</sup>	2,94 ± 0,34 <sup>bc</sup>	10,86 ± 1,94 <sup>bcd</sup>
P 57	Ελλάδα; <i>Castanea sativa</i>	42,50 ± 9,01 <sup>b</sup>	28,00 ± 6,60 <sup>abcd</sup>	205,95 ± 110,90 <sup>ab</sup>	60,63 ± 38,01 <sup>cd</sup>	32,25 ± 14,26 <sup>ab</sup>	299,12 ± 81,31 <sup>ab</sup>	90,64 ± 24,64 <sup>ab</sup>	3,40 ± 0,95 <sup>bc</sup>	11,85 ± 0,55 <sup>bcd</sup>
P 59	Ελλάδα; <i>Populus alba</i>	22,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	28,60 ± 5,73 <sup>abcd</sup>	75,98 ± 30,53 <sup>b</sup>	88,97 ± 25,49 <sup>abcd</sup>	62,19 ± 35,07 <sup>a</sup>	214,48 ± 39,88 <sup>ab</sup>	64,99 ± 12,09 <sup>bc</sup>	2,43 ± 0,73 <sup>bc</sup>	7,60 ± 1,46 <sup>cd</sup>
P 69	Ελλάδα; <i>Salix babylonica</i>	50,50 ± 2,26 <sup>b</sup>	40,00 ± 19,40 <sup>ab</sup>	192,98 ± 28,31 <sup>ab</sup>	56,10 ± 21,65 <sup>d</sup>	12,33 ± 3,21 <sup>ab</sup>	261,41 ± 53,54 <sup>ab</sup>	79,22 ± 16,22 <sup>abc</sup>	1,99 ± 1,08 <sup>bc</sup>	15,76 ± 5,26 <sup>bcd</sup>
P 104	Ελλάδα; <i>Abies cephalonica</i>	27,17 ± 1,33 <sup>c</sup>	27,50 ± 1,52 <sup>abcd</sup>	168,11 ± 48,51 <sup>ab</sup>	141,94 ± 34,46 <sup>abc</sup>	43,47 ± 27,69 <sup>ab</sup>	353,53 ± 51,50 <sup>a</sup>	107,13 ± 15,61 <sup>a</sup>	3,91 ± 0,63 <sup>bc</sup>	12,56 ± 1,79 <sup>bcd</sup>
P 112	Ελλάδα; <i>Fagus sylvatica</i>	26,00 ± 2,00 <sup>c</sup>	31,40 ± 4,93 <sup>abc</sup>	182,85 ± 30,66 <sup>ab</sup>	93,49 ± 64,52 <sup>abcd</sup>	28,23 ± 6,02 <sup>b</sup>	320,79 ± 65,00 <sup>a</sup>	97,21 ± 19,70 <sup>ab</sup>	3,23 ± 1,10 <sup>bc</sup>	5,90 ± 1,40 <sup>d</sup>
P 146	Ελλάδα; <i>Populus alba</i>	45,83 ± 1,72 <sup>b</sup>	22,20 ± 4,49 <sup>abcd</sup>	202,78 ± 52,80 <sup>ab</sup>	68,47 ± 75,01 <sup>abcd</sup>	50,00 ± 16,45 <sup>ab</sup>	287,46 ± 59,27 <sup>ab</sup>	87,11 ± 17,96 <sup>ab</sup>	4,18 ± 1,46 <sup>b</sup>	11,30 ± 1,79 <sup>bcd</sup>
P 149	Ελλάδα; <i>Populus alba</i>	45,83 ± 2,04 <sup>b</sup>	36,17 ± 19,45 <sup>abc</sup>	207,52 ± 84,73 <sup>ab</sup>	52,74 ± 21,72 <sup>d</sup>	26,92 ± 6,23 <sup>ab</sup>	287,18 ± 77,25 <sup>ab</sup>	87,02 ± 23,41 <sup>ab</sup>	3,27 ± 1,20 <sup>bc</sup>	17,49 ± 3,99 <sup>bcd</sup>
P 179	Ελλάδα; <i>Abies cephalonica</i>	45,67 ± 1,86 <sup>b</sup>	21,60 ± 4,62 <sup>bcd</sup>	200,60 ± 54,22 <sup>ab</sup>	36,96 ± 14,39 <sup>d</sup>	32,33 ± 19,01 <sup>ab</sup>	269,89 ± 69,59 <sup>ab</sup>	81,79 ± 21,09 <sup>abc</sup>	4,29 ± 1,70 <sup>b</sup>	9,17 ± 2,42 <sup>bcd</sup>
P 182	<i>Brachyichiton populneus</i>	71,33 ± 3,27 <sup>a</sup>	28,50 ± 1,00 <sup>abcd</sup>	247,90 ± 39,76 <sup>ab</sup>	45,50 ± 28,94 <sup>d</sup>	1,17 ± 0,86 <sup>b</sup>	280,90 ± 51,88 <sup>ab</sup>	85,12 ± 15,72 <sup>abc</sup>	3,19 ± 0,55 <sup>bc</sup>	14,00 ± 4,78 <sup>bcd</sup>
P 1123	Ελλάδα	44,80 ± 0,84 <sup>b</sup>	20,20 ± 2,59 <sup>cd</sup>	163,17 ± 35,38 <sup>ab</sup>	75,66 ± 43,32 <sup>abcd</sup>	40,00 ± 8,48 <sup>ab</sup>	251,63 ± 42,48 <sup>ab</sup>	76,25 ± 12,87 <sup>abc</sup>	3,90 ± 1,09 <sup>bc</sup>	9,12 ± 3,19 <sup>bcd</sup>

με την αξιοποίηση πλούσιων πρώτων υλών, όπως τα στέμφυλα οινοποιίας και τα παραπροϊόντα ελαιοτριβείων ή μετά την προσθήκη κατάλληλων συμπληρωμάτων (π.χ. υλικών αναερόβιας χώνευσης) στο βασικό υπόστρωμα καλλιέργειας (Isikhuemhen and Mikiashvilli, 2009, Zervakis et al., 2013).

Στον υπολογισμό της παραγωγικότητας συνδυάζεται τόσο η διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου όσο και η ΒΑ και ως εκ τούτου αυτή αντιπροσωπεύει μια πιο “ολιστική” παράμετρο για την αξιολόγηση της καλλιεργητικής συμπεριφοράς των υπό διερεύνηση στελεχών. Επομένως, ο υπολογισμός της παραγωγικότητας αποδεικνύει την υπεροχή του στελέχους LGM22 (8,5 ημέρες<sup>-1</sup>), καθώς παρουσιάζει στατιστικά υψηλότερη μέση τιμή συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα στελέχη. Επιπλέον, αρκετά ακόμη στελέχη (π.χ. τα P104, P146, P179 και P1123) παρουσίασαν ικανοποιητικές τιμές παραγωγικότητας (από 3,9 έως 4,3 ημέρες<sup>-1</sup>) οι οποίες αποτελούν τις μεγαλύτερες τιμές που έχουν αναφερθεί για το είδος *P. ostreatus* καθώς σε παλαιότερες εργασίες αναφέρονται τιμές από 2.1 έως 3.0 ημέρες<sup>-1</sup> (Curvetto et al., 2002). Η υψηλή τιμή παραγωγικότητας που εμφάνισαν τα προαναφερθέντα αυτοφυή (ελληνικά) στελέχη αποτέλεσε και το βασικό κριτήριο επιλογής ενός από αυτά (IK1123) για την αξιολόγηση ενός μεγάλου εύρους διαφορετικών υποστρωμάτων που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2. Ιδιαίτερο επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση της παραγωγικότητας των 16 στελεχών με τις τιμές που προέκυψαν όταν ένα μόνο στέλεχος καλλιεργήθηκε σε 9 διαφορετικά υποστρώματα (1.50 - 8.51 και 0,27 - 2,05 ημέρες<sup>-1</sup> αντίστοιχα) υποδεικνύοντας το σημαντικό γενετικό δυναμικό και τις δυνατότητες εκμετάλλευσης του, όπως και τη σημαντική επίδραση του υποστρώματος όπως αναλυτικά θα παρουσιαστεί στα πλαίσια των εργασιών του Κεφαλαίου 2.2.

Αναφορικά με το μέσο βάρος των μανιταριών, επίσης παρατηρήθηκε μεγάλο εύρος τιμών μεταξύ των στελεχών (Πίνακας 2.1.2.). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα τρία εμπορικά στελέχη παρήγαγαν μανιτάρια μεγαλύτερου μεγέθους/βάρους (23,74 – 37,65 g) σε σύγκριση με τα αυτοφυή (5,90 - 17,49 g), πιθανόν λόγω της γενετικής βελτίωσης μέσω κατευθυνόμενων διασταυρώσεων για την επιλογή του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού, το οποίο είναι επιθυμητό από τους καταναλωτές.

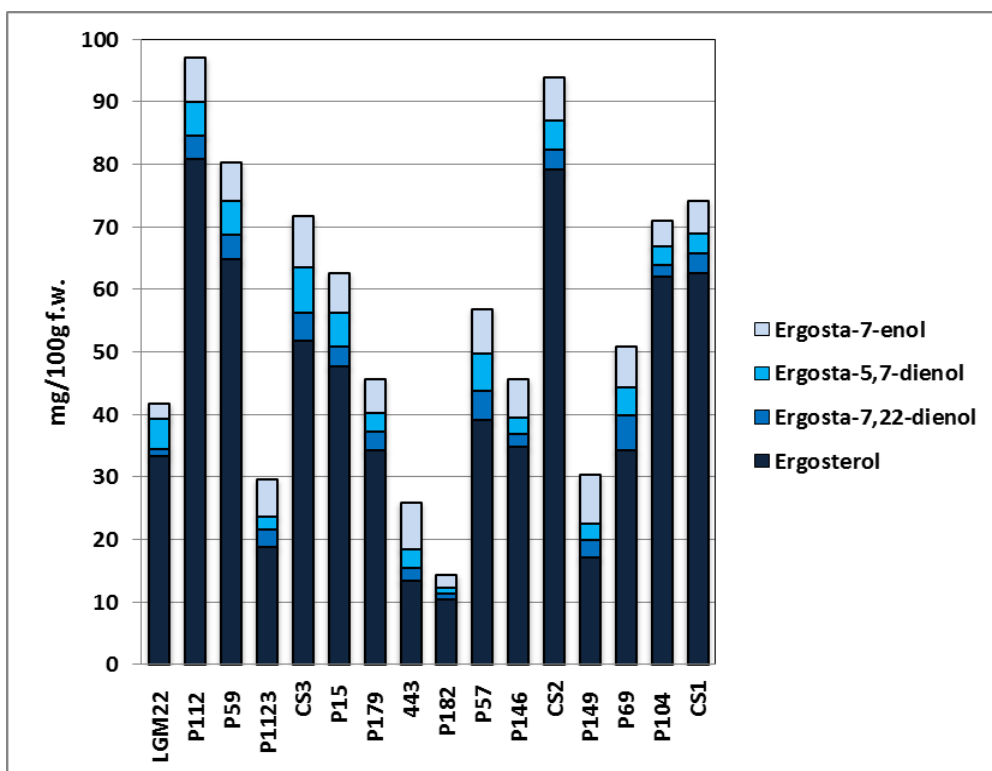
### 2.1.3.2 Λιπαρά οξέα και στερόλες στα μανιτάρια

Τα κλάσματα των λιπαρών οξέων συμπεριλαμβανομένων των κορεσμένων λιπαρών οξέων (saturated fatty acids, SFA), μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (monounsaturated fatty acids,

Πίνακας 2.1.3. Περιεκτικότητα μανιταριών σε εργοστερόλη και μεταβολιτών αυτής (mg / 100 g ν.β.), κλάσματα των κύριων λιπαρών οξέων (εκφρασμένα ως % των ολικών λιπαρών οξέων) και δείκτης αφορεστότητας (U.I.) σε μανιτάρια *P. ostreatus* προερχόμενα από 16 διαφορετικά στελέχη. Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t- test) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφόρων στελεχών.

Στέλεχος	Εργοστερόλη	Εργοστα-7,22- διενόλη	Εργοστα-5,7- διενόλη	Εργοστα-7- ενόλη	SFA	MUFA	PUFA	ω-6	ω-3	U.I.
LGM 22	33.28±18.78	1.16±0.51	4.85±0.78	2.41±0.98	8.77±1.18 <sup>b</sup>	6.76±1.42 <sup>b</sup>	80.63±2.69 <sup>a</sup>	80.60±2.69 <sup>a</sup>	0.03±0.02 <sup>a</sup>	168.1±4.6 <sup>a</sup>
P112	80.81±6.76	3.67±0.44	5.51±1.19	6.97±1.72	15.25±1.40 <sup>ab</sup>	20.29±4.33 <sup>a</sup>	60.56±7.37 <sup>ab</sup>	60.54±7.40 <sup>ab</sup>	0.10±0.04 <sup>a</sup>	141.7±10.4 <sup>ab</sup>
P59	64.71±17.97	4.05±0.67	5.43±1.32	6.03±1.82	12.73±3.43 <sup>ab</sup>	7.50±1.47 <sup>b</sup>	74.85±7.78 <sup>ab</sup>	74.70±7.90 <sup>ab</sup>	0.16±0.12 <sup>a</sup>	157.4±14.1 <sup>ab</sup>
P1123	18.75±6.65	2.74±0.73	2.12±1.15	5.96±0.24	14.12±1.03 <sup>ab</sup>	10.85±3.80 <sup>ab</sup>	68.91±4.66 <sup>ab</sup>	68.75±4.53 <sup>ab</sup>	0.17±0.11 <sup>a</sup>	148.8±5.7 <sup>ab</sup>
CS3	51.77±9.64	4.41±2.13	7.39±0.07	8.06±2.38	13.44±1.52 <sup>ab</sup>	13.07±1.03 <sup>ab</sup>	67.07±3.64 <sup>ab</sup>	66.99±3.61 <sup>ab</sup>	0.08±0.06 <sup>a</sup>	147.3±7.6 <sup>ab</sup>
P15	47.58±4.19	3.25±0.91	5.36±1.37	6.44±1.05	12.85±0.55 <sup>ab</sup>	9.81±2.52 <sup>ab</sup>	74.33±2.99 <sup>ab</sup>	74.22±3.03 <sup>ab</sup>	0.12±0.10 <sup>a</sup>	158.6±3.5 <sup>ab</sup>
P179	34.19±11.50	3.03±0.80	2.97±0.51	5.50±1.15	14.71±1.17 <sup>ab</sup>	14.35±1.61 <sup>ab</sup>	65.66±3.39 <sup>ab</sup>	65.63±3.39 <sup>ab</sup>	0.3±0.02 <sup>a</sup>	145.7±5.2 <sup>ab</sup>
443	13.45±3.10	1.98±0.58	2.95±0.92	7.53±1.65	17.07±4.14 <sup>a</sup>	15.09±7.18 <sup>ab</sup>	58.84±13.62 <sup>b</sup>	58.13±14.60 <sup>b</sup>	0.71±0.54 <sup>a</sup>	133.5±19.3 <sup>b</sup>
P182	10.42±5.13	0.85±0.43	0.93±0.59	2.14±1.58	13.25±4.09 <sup>ab</sup>	13.22±2.69 <sup>ab</sup>	67.11±10.00 <sup>ab</sup>	67.05±9.92 <sup>ab</sup>	0.07±0.06 <sup>a</sup>	147.5±17.9 <sup>ab</sup>
P57	39.10±12.09	4.72±2.34	5.85±0.64	7.16±0.94	11.85±1.89 <sup>ab</sup>	8.93±3.63 <sup>b</sup>	75.89±5.34 <sup>ab</sup>	75.84±5.35 <sup>ab</sup>	0.05±0.04 <sup>a</sup>	160.8±7.3 <sup>ab</sup>
P146	34.86±9.85	1.90±0.64	2.63±0.48	6.21±1.44	12.02±0.68 <sup>ab</sup>	11.38±6.44 <sup>ab</sup>	71.80±5.12 <sup>ab</sup>	71.58±5.17 <sup>ab</sup>	0.22±0.17 <sup>a</sup>	155.2±4.0 <sup>ab</sup>
CS2	79.08±6.89	3.18±0.47	4.69±0.45	6.91±0.89	13.53±1.61 <sup>ab</sup>	9.45±2.98 <sup>ab</sup>	71.21±6.81 <sup>ab</sup>	71.11±6.67 <sup>ab</sup>	0.10±0.07 <sup>a</sup>	152.0±10.8 <sup>ab</sup>
P149	17.03±0.84	2.90±0.06	2.57±0.07	7.77±0.61	11.30±2.95 <sup>ab</sup>	10.39±5.53 <sup>ab</sup>	72.29±11.56 <sup>ab</sup>	72.08±11.67 <sup>ab</sup>	0.21±0.14 <sup>a</sup>	155.2±18.9 <sup>ab</sup>
P69	34.25±10.13	5.49±0.97	4.59±1.10	6.48±2.01	10.78±2.16 <sup>ab</sup>	9.36±3.20 <sup>ab</sup>	77.23±6.14 <sup>ab</sup>	77.10±6.13 <sup>ab</sup>	0.13±0.11 <sup>a</sup>	164.0±9.1 <sup>ab</sup>
P104	61.98±19.22	1.81±0.10	3.13±1.48	4.01±0.69	12.85±0.36 <sup>ab</sup>	10.50±2.10 <sup>ab</sup>	73.87±1.02 <sup>ab</sup>	73.86±1.02 <sup>ab</sup>	0.01±0.01 <sup>a</sup>	158.2±1.6 <sup>ab</sup>
CS1	62.53±12.32	3.28±0.51	3.01±0.68	5.35±0.87	12.84±2.92 <sup>ab</sup>	11.17±1.70 <sup>ab</sup>	71.53±7.07 <sup>ab</sup>	71.53±7.07 <sup>ab</sup>	0.01±0.01 <sup>a</sup>	154.2±12.5 <sup>ab</sup>

MUFA), πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFA), καθώς και των  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 λιπαρών οξέων των μανιταριών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.3. Συνολικά, μέχρι και 28 λιπαρά οξέα, όπως και τα δικαρβοξυλικά οξέα φουμαρικό και σουκινικό (ή ηλεκτρικό) ανιχνεύτηκαν στα μανιτάρια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το μεγαλύτερο κλάσμα των λιπιδίων αποτελούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ ο δείκτης ακορεστότητας (unsaturation index) κυμάνθηκε από 141,7 έως 168,1 (Πίνακας 2.1.3.). Το λινολεϊκό οξύ αποτελεί πρόδρομη ένωση του 1-octen-3-ol (γνωστό και ως αλκοόλη των μανιταριών), το οποίο είναι το κύριο αρωματικό συστατικό των μανιταριών και το πιο άφθονο ανάμεσα στα επιμέρους λιπαρά οξέα (56,8-80,5%), ακολουθούμενο από το ολεϊκό και το παλμιτικό οξύ (6,3-19,5 και 7,5-12,1% αντίστοιχα, Πίνακας 2.1.3.). Η παρατηρούμενη κατανομή των λιπαρών οξέων στο είδος *P. ostreatus* είναι παρόμοια με προηγούμενες αναφορές τόσο για καλλιεργούμενα όσο και για αυτοφυή μανιτάρια (Fernandes et al., 2015, Güny Ergönül et al., 2013). Όσον αφορά την επίδραση των καλλιεργητικών παραμέτρων στη σύσταση των λιπιδίων, φαίνεται ότι η πρωιμότητα επιδρά αρνητικά στη συγκέντρωση του λινολεϊκού οξέος ( $r = -0,382$ ), ενώ το ποσοστό των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων εμφανίζει θετική συσχέτιση με την πρωιμότητα ( $r = 0,507$ ,  $p < 0,05$ ) και αρνητική με τη βιολογική αποδοτικότητα ( $r = -0,781$ ,  $p < 0,05$ ).



Γράφημα 2.1.1. Περιεκτικότητα εργοστερόλης και μεταβολιτών της σε μανιτάρια *P. ostreatus* προερχόμενα από 16 διαφορετικά στελέχη.



Η εργοστερόλη και οι μεταβολίτες της εργοστα-7,22-διενόλη (5,6-διυδροεργοστερόλη), εργοστα-5,7-διενόλη (22,23 διυδροεργοστερόλη) και εργοστα-7-ενόλη (μυκοστερόλη) ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα μανιταριών που μελετήθηκαν και το άθροισμα της συγκέντρωσης τους κυμάνθηκε από 10,42 έως 80,81 mg/100g v.β. (Πίνακας 2.1.3., Γράφημα 2.1.1.). Σε όλες τις περιπτώσεις η εργοστερόλη κυριάρχησε, καταλαμβάνοντας ποσοστό 51,9 – 87,4% της συνολικής συγκέντρωσης των στερολών (μέση τιμή 73,7%), ακολουθούμενη από την εργοστα-7-ενόλη (12,7%), την εργοστα-5,7-διενόλη (7,6%) και την εργοστα-7,22-διενόλη (6%). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα εμπορικά στελέχη CS1 και CS2 καθώς και το P112 περιείχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εργοστερόλης. Παρόμοια συγκέντρωση έχει αναφερθεί και σε άλλα είδη (Phillips et al., 2011, Teichmann et al., 2007), ενώ το εύρος των τιμών (10,4 - 80,8 mg/100g v.β) υπερκαλύπτει προηγούμενες μετρήσεις σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* (29,0 - 68,3 mg/100g v.β), (Jasinghe and Perera, 2005, Mattila et al., 2002, Phillips et al., 2011, Sapozhnikova et al., 2014, Teichmann et al., 2007).

Η εργοστερόλη αποτελεί συστατικό του κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων και έχει ρόλο παρόμοιο με αυτόν της χοληστερόλης στους ζωικούς ιστούς, η οποία μετατρέπεται σε βιταμίνη D<sub>2</sub> (μορφή της βιταμίνης D στα μη ζωικά προϊόντα γνωστή και ως εργοκαλσιφερόλη). Η συγκέντρωση της εργοστερόλης στα καλλιεργούμενα μανιτάρια είναι υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή των αυτοφυών μανιταριών (Mattila et al., 2002, Teichmann et al., 2007), καθιστώντας τα σημαντική πηγή βιταμίνης D ιδιαίτερα μετά την έκθεση τους σε UV ακτινοβολία.

### 2.1.3.3 Ολικά και επιμέρους φαινολικά συστατικά και τερπενικά οξέα στα μανιτάρια

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα μανιτάρια των 16 στελεχών του *P. ostreatus* που μελετήθηκαν κυμάνθηκε από 1,27 έως 8,62 mg GAE/100 g v.β. Έντεκα απλές φαινόλες, το στυλβένιο ρεσβερατρόλη και δύο τερπενικά οξέα ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα των μανιταριών και τα αποτελέσματα τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.4. Το άθροισμα των επιμέρους φαινολικών κυμάνθηκε από 1,5 έως 44,1 mg/100 g v.β. και η συγκέντρωσή τους διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Ανάμεσα στα υδροξυβενζοϊκά οξέα, το π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ και το π-υδρόξυ-φαινοξικό οξύ ήταν αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ( 1,03-42,47 και 1,03-12,09 mg/100 g v.β. αντίστοιχα), ενώ το κινναμικό οξύ είχε την υψηλότερη τιμή μεταξύ των υδροξυ-

**Πίνακας 2.1.4. Επιμέρους φαινολικά συστατικά, τερπενικά οξέα και ολικά φαινολικά σε μανιτάρια που παρήχθησαν από 16 στελέχη *P. ostreatus*. TPC: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, GAE: ισοδύναμα γαλλικού οξέος.**

Συστατικά	LGM 22	P112	P59	P1123	CS3	P15	P179	443	P182	P 57	P146	CS2	P149	P 69	P104	CS1
<i>Φαινολικά οξέα</i>																
<i>(μg/100 g fw)</i>																
<i>i. Υδρόξυ-βενζοϊκά οξέα</i>																
ρ-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	8,66±2,94 <sup>a</sup>	7,29±4,80 <sup>a</sup>	2,63±0,80 <sup>a</sup>	1,14±0,98 <sup>a</sup>	-	3,43±1,53 <sup>a</sup>	1,03±0,78 <sup>a</sup>	2,99±1,27 <sup>a</sup>	2,37±0,55 <sup>a</sup>	1,43±0,41 <sup>a</sup>	5,08±4,10 <sup>a</sup>	7,26±2,20 <sup>a</sup>	2,08±0,7 <sup>a</sup>	4,55±0,28 <sup>a</sup>	42,47±25,75 <sup>a</sup>	27,66±3,41 <sup>a</sup>
ρ-υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ	12,09±5,98 <sup>a</sup>	7,51±1,92 <sup>ab</sup>	3,73±1,88 <sup>b</sup>	1,45±0,65 <sup>b</sup>	1,11±0,38 <sup>b</sup>	2,79±2,61 <sup>b</sup>	1,03±0,94 <sup>b</sup>	2,70±0,82 <sup>b</sup>	2,42±1,64 <sup>b</sup>	1,31±0,75 <sup>b</sup>	1,27±0,43 <sup>b</sup>	6,92±4,05 <sup>ab</sup>	1,33±0,46 <sup>b</sup>	2,06±0,50 <sup>b</sup>	3,94±2,30 <sup>b</sup>	11,26±4,23 <sup>b</sup>
3-4-διυδρόξυ-φαινυλακετικό οξύ	1,85±1,54 <sup>ab</sup>	3,54±1,35 <sup>a</sup>	0,98±0,51 <sup>ab</sup>	-	-	1,11±0,22 <sup>ab</sup>	-	-	-	0,16±0,08 <sup>b</sup>	-	2,15±1,38 <sup>ab</sup>	-	-	-	-
Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	3,23±0,96 <sup>a</sup>	2,16±1,09 <sup>ab</sup>	1,38±0,45 <sup>bc</sup>	-	-	0,36±0,18 <sup>c</sup>	0,12±0,11 <sup>c</sup>	-	0,14±0,11 <sup>c</sup>	0,24±0,21 <sup>c</sup>	0,56±0,08 <sup>c</sup>	0,79±0,43 <sup>bc</sup>	-	-	-	-
Συριγγικό οξύ	1,44±1,11 <sup>a</sup>	1,00±0,59 <sup>ab</sup>	0,01±0,02 <sup>b</sup>	-	0,20±0,13 <sup>b</sup>	0,11±0,10 <sup>b</sup>	0,32±0,22 <sup>b</sup>	-	-	0,07±0,05 <sup>ab</sup>	0,31±0,17 <sup>a</sup>	0,19±0,14 <sup>ab</sup>	-	-	0,07±0,06 <sup>b</sup>	0,89±0,08 <sup>ab</sup>
Βανιλικό οξύ	1,29±0,61 <sup>a</sup>	0,64±0,30 <sup>ab</sup>	-	-	0,06±0,03 <sup>a</sup>	0,11±0,05 <sup>ab</sup>	0,24±0,12 <sup>a</sup>	0,15±0,07 <sup>a</sup>	0,24±0,16 <sup>a</sup>	-	0,27±0,08 <sup>a</sup>	0,20±0,18 <sup>ab</sup>	-	0,06±0,04 <sup>a</sup>	-	0,30±0,11 <sup>ab</sup>
<i>ii. Υδροξυκινναμικά οξέα</i>																
Καφεϊκό οξύ	0,46±0,19 <sup>ab</sup>	0,54±0,08 <sup>a</sup>	0,24±0,03 <sup>ab</sup>	0,21±0,04 <sup>ab</sup>	0,08±0,05 <sup>c</sup>	0,39±0,11 <sup>ab</sup>	0,17±0,15 <sup>bc</sup>	0,12±0,11 <sup>bc</sup>	0,05±0,04 <sup>c</sup>	0,35±0,04 <sup>ab</sup>	0,14±0,06 <sup>bc</sup>	0,28±0,05 <sup>ab</sup>	0,18±0,08 <sup>b</sup>	0,16±0,03 <sup>bc</sup>	0,33±0,17 <sup>abc</sup>	0,32±0,09 <sup>ab</sup>
Κινναμικό οξύ	11,0±5,68 <sup>a</sup>	1,41±0,85 <sup>b</sup>	-	3,18±1,50 <sup>b</sup>	-	4,48±3,84 <sup>ab</sup>	2,02±1,02 <sup>b</sup>	2,86±1,52 <sup>b</sup>	1,83±1,17 <sup>b</sup>	1,29±0,79 <sup>b</sup>	5,02±1,41 <sup>b</sup>	0,89±0,62 <sup>b</sup>	1,31±0,61 <sup>b</sup>	2,53±1,58 <sup>b</sup>	0,82±0,63 <sup>b</sup>	-
Φερούλικό οξύ	0,22±0,11 <sup>a</sup>	0,08±0,04 <sup>a</sup>	0,11±0,06 <sup>a</sup>	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,12 <sup>a</sup>	-	0,09±0,06 <sup>a</sup>	-	-	-	-	0,07±0,03 <sup>a</sup>	-	-	0,04±0,03 <sup>a</sup>	-
<i>Φαινόλες</i>																
<i>(μg/100 g fw)</i>																
Τυροσόλη	0,86±0,52 <sup>a</sup>	0,81±0,31 <sup>a</sup>	0,07±0,04 <sup>a</sup>	-	-	0,37±0,24 <sup>a</sup>	0,03±0,02 <sup>a</sup>	-	-	0,11±0,06 <sup>a</sup>	-	0,21±0,12 <sup>a</sup>	-	-	0,07±0,05 <sup>a</sup>	-
Βανιλίνη	0,42±0,22 <sup>a</sup>	0,22±0,19 <sup>a</sup>	0,13±0,05 <sup>b</sup>	-	0,07±0,06 <sup>b</sup>	3,02±1,89 <sup>ab</sup>	-	-	0,17±0,12 <sup>b</sup>	0,04±0,04 <sup>b</sup>	-	0,23±0,12 <sup>b</sup>	-	-	0,24±0,21 <sup>b</sup>	-
<i>Στυλθένια</i>																
<i>(μg/100 g fw)</i>																
Ρεσβερατρόλη	0,90±0,43 <sup>a</sup>	2,37±1,15 <sup>a</sup>	0,54±0,44 <sup>a</sup>	2,04±0,17 <sup>a</sup>	2,82±0,84 <sup>a</sup>	1,06±0,92 <sup>a</sup>	4,61±2,71 <sup>a</sup>	2,94±0,54 <sup>a</sup>	9,58±6,34 <sup>a</sup>	2,78±1,68 <sup>a</sup>	2,00±0,82 <sup>a</sup>	1,36±0,81 <sup>a</sup>	3,10±1,22 <sup>a</sup>	5,00±2,53 <sup>a</sup>	1,05±0,59 <sup>a</sup>	1,39±0,34 <sup>a</sup>
<i>Τερπενικά οξέα</i>																
<i>(μg/100 g fw)</i>																
Ουροσλικό οξύ	16,32±10,46 <sup>a</sup>	7,32±2,72 <sup>b</sup>	0,02±0,02 <sup>b</sup>	-	-	-	0,58±0,50 <sup>b</sup>	-	-	0,52±0,48 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-
Ursolic acid	14,37±12,18 <sup>a</sup>	12,23±9,31 <sup>a</sup>	0,02±0,02 <sup>b</sup>	-	-	-	0,60±0,54 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά (mg GAE <sup>g</sup> /100g fw)	7,01±2,01 <sup>ab</sup>	8,62±2,05 <sup>a</sup>	6,69±2,36 <sup>ab</sup>	3,65±1,14 <sup>ab</sup>	3,32±1,95 <sup>a</sup>	6,81±1,39 <sup>ab</sup>	3,53±3,04 <sup>a</sup>	3,67±1,58 <sup>a</sup>	5,32±3,75 <sup>a</sup>	3,66±1,88 <sup>ab</sup>	2,54±0,51 <sup>a</sup>	5,16±1,79 <sup>ab</sup>	1,27±1,25 <sup>b</sup>	3,58±2,02 <sup>a</sup>	5,26±2,91 <sup>ab</sup>	7,79±1,94 <sup>ab</sup>

κιναμικών οξέων (0,89-11,05 μg/100g ν.β.). Η ρεσβερατρόλη ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα και η συγκέντρωση της κυμάνθηκε από 0,54 έως 9,58 μg/100g ν.β. Μεταξύ των στελεχών που μελετήθηκαν, το LGM22 περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση υδροξυβενζοϊκών οξέων, τερπενικών οξέων και κιναμικού οξέως. Αξίζει να αναφερθεί ότι η πρωιμότητα εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του π-υδρόξυ-φαινυλοξικού οξέως ( $r = -0,455, p < 0,05$ ) και των ολικών φαινολικών ( $r = -0,698, p < 0,05$ ).

Παρόμοιες εργασίες στις οποίες έχει μελετηθεί η συγκέντρωση των επιμέρους φαινολικών συστατικών σε καλλιεργούμενα είδη μανιταριών είναι ελάχιστες στη διεθνή βιβλιογραφία (Mattila et al., 2001, Palacios et al., 2011) και οι τιμές που παρουσιάζονται είναι παρόμοιες με αυτές που προέκυψαν για τα 16 στελέχη που μελετήθηκαν, ενώ τα περισσότερα από αυτά τα συστατικά έχουν ανιχνευτεί επίσης και σε αυτοφυή μανιτάρια (Kalogeropoulos et al., 2013, Yildiz et al., 2015). Επιπλέον, η παρατηρούμενη συσχέτιση των φαινολικών συστατικών με την αντιοξειδωτική ικανότητα, συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις σε αυτοφυή μανιτάρια υπογραμμίζοντας έτσι τη σημασία της παρουσίας των εν λόγω συστατικών στα μανιτάρια του είδους *P. ostreatus*.

#### 2.1.3.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων μανιταριών

Η ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν την “σταθερή” ελεύθερη ρίζα DPPH κυμάνθηκε από 0,82 mmol TE/100 g ν.β. στο στέλεχος P57 έως 4,07 mmol TE/100 g ν.β. στο LGM22, ενώ οι τιμές της αναγωγικής ισχύος (reducing power) κυμάνθηκαν από 1,38 έως 2,69 mmol TE/100 g ν.β. (Πίνακας 2.1.5). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε τη σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αναγωγικής ισχύος και της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ( $r = 0,868, p < 0,05$ ), τα οποία επίσης συσχετίζονται θετικά με τα π-υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ, καφεϊκό οξύ και τυροσόλη ( $r = 0,660, 0,747$  και  $0,620, p < 0,05$  αντίστοιχα). Αντίθετα, καμία σημαντική συσχέτιση δεν προέκυψε μεταξύ της αναγωγικής ισχύος και των επιμέρους φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν.

Η επιμήκυνση της φάσης υστέρησης και η παρατηρούμενη αύξηση της αντίστασης οξείδωσης των λιπιδίων στον ορό αίματος παρατηρήθηκε σε όλα τα εκχυλίσματα των μανιταριών σε σύγκριση με τον μάρτυρα (περιείχε μόνο μεθανόλη), με εξαίρεση το στέλεχος P149 (Πίνακας 2.1.5.). Η επιμήκυνση παρουσίασε μεγάλο εύρος ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη (από 150 έως 6290s). Συνολικά η αντιοξειδωτική δράση ήταν ασθενέστερη στην

περίπτωση του στελέχους 443 και σημαντικά υψηλότερη στα στελέχη CS1, P104 και P182 (6290, 3477 και 2253s αντίστοιχα). Οι τιμές της ολικής οξειδωσιμότητας στον ορό αίματος (TSO) αποδείχθηκε ότι συσχετίζονται σημαντικά τόσο με το βενζοϊκό οξύ και το π-υδροξυφαινολοξικό οξύ όσο και με το άθροισμα της συγκέντρωσης των επιμέρους φαινολικών συστατικών ( $r = 0,844, 0,661$  και  $0,791, p < 0,05$  αντίστοιχα).

**Πίνακας 2.1.5.** Τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας (ικανότητας σάρωσης ριζών, μείωσης αντιοξειδωτικού δυναμικού και αναστολής της οξείδωσης λιπιδίων σε ορό αίματος), και περιεκτικότητες εργοστερόλης και α- και β-γλουκανών σε μανιτάρια που προήλθαν από 16 στελέχη *P. ostreatus*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=4$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφόρων στελεχών.

Στέλεχος	Ικανότητα σάρωσης ριζών [DPPH] (mmol TE / 100 g φ.β.)	Μείωση αντιοξειδωτικού δυναμικού [FRAP] mmol TE / 100 g φ.β)	Ολική οξειδωσιμότητα λιπιδίων (επιμήκυνση χρόνου υστέρησης, sec)	Εργοστερόλη (mg/100g φ.β )	α-γλουκάνες (% ξ.β. )	β-γλουκάνες (% ξ.β )
LGM 22	4,07 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	2,69 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	492,5 $\pm$ 128,0 <sup>b</sup>	37,68 $\pm$ 18,78 <sup>cd</sup> ef	1,77 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>	13,94 $\pm$ 0,74 <sup>efg</sup>
P112	3,24 $\pm$ 0,38 <sup>abc</sup>	2,40 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	943,3 $\pm$ 334,5 <sup>ab</sup>	80,81 $\pm$ 6,76 <sup>a</sup>	2,94 $\pm$ 0,25 <sup>de</sup>	11,53 $\pm$ 0,79 <sup>gh</sup>
P59	2,30 $\pm$ 0,47 <sup>bcd</sup>	1,86 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	649,8 $\pm$ 319,0 <sup>a</sup>	64,71 $\pm$ 17,97 <sup>ab</sup>	4,03 $\pm$ 0,49 <sup>bc</sup>	10,94 $\pm$ 0,04 <sup>h</sup>
P1123	1,94 $\pm$ 0,30 <sup>bcde</sup>	2,30 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	375,0 $\pm$ 72,9 <sup>a</sup>	18,75 $\pm$ 6,65 <sup>def</sup>	4,73 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	14,87 $\pm$ 0,94 <sup>de</sup>
CS3	1,31 $\pm$ 0,54 <sup>cde</sup>	2,23 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	529,0 $\pm$ 282,8 <sup>a</sup>	51,77 $\pm$ 9,64 <sup>bc</sup>	2,24 $\pm$ 0,03 <sup>ef</sup>	22,92 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>
P15	3,45 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	1,85 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	1043,0 $\pm$ 307,2 <sup>ab</sup>	47,58 $\pm$ 4,19 <sup>bc</sup>	2,26 $\pm$ 0,05 <sup>ef</sup>	21,73 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>
P179	1,20 $\pm$ 0,28 <sup>de</sup>	2,11 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	1105,0 $\pm$ 28,3 <sup>ab</sup>	34,19 $\pm$ 11,50 <sup>cde</sup>	4,54 $\pm$ 0,11 <sup>abc</sup>	12,72 $\pm$ 0,69 <sup>efgh</sup>
443	1,02 $\pm$ 0,17 <sup>de</sup>	2,55 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	149,5 $\pm$ 9,2 <sup>a</sup>	13,45 $\pm$ 3,10 <sup>ef</sup>	5,23 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	16,90 $\pm$ 0,41 <sup>bc</sup>
P182	0,91 $\pm$ 0,63 <sup>de</sup>	1,60 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	2252,5 $\pm$ 376,9 <sup>ab</sup>	10,42 $\pm$ 5,13 <sup>f</sup>	4,84 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	16,65 $\pm$ 0,19 <sup>bcd</sup>
P57	0,82 $\pm$ 0,45 <sup>e</sup>	2,32 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	450,0 $\pm$ 45,3 <sup>a</sup>	39,10 $\pm$ 12,09 <sup>cd</sup>	4,13 $\pm$ 0,13 <sup>bc</sup>	15,28 $\pm$ 0,97 <sup>bcd</sup>
P146	1,18 $\pm$ 0,27 <sup>de</sup>	1,74 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	187,5 $\pm$ 53,0 <sup>a</sup>	34,86 $\pm$ 9,85 <sup>cde</sup>	4,05 $\pm$ 0,02 <sup>bc</sup>	11,61 $\pm$ 0,32 <sup>gh</sup>
CS2	1,73 $\pm$ 0,88 <sup>bcde</sup>	1,88 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	1203,0 $\pm$ 311,1 <sup>ab</sup>	79,08 $\pm$ 6,89 <sup>a</sup>	1,67 $\pm$ 0,16 <sup>f</sup>	17,82 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
P149	0,92 $\pm$ 0,36 <sup>de</sup>	1,82 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	-	17,03 $\pm$ 0,84 <sup>def</sup>	4,99 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	14,19 $\pm$ 0,05 <sup>def</sup>
P69	1,00 $\pm$ 0,64 <sup>de</sup>	2,51 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	572,5 $\pm$ 174,7 <sup>a</sup>	34,25 $\pm$ 10,13 <sup>cde</sup>	3,80 $\pm$ 0,23 <sup>cd</sup>	15,25 $\pm$ 0,50 <sup>bcd</sup>
P104	1,69 $\pm$ 1,13 <sup>cde</sup>	1,69 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	3477,2 $\pm$ 1512,0 <sup>b</sup>	61,98 $\pm$ 19,22 <sup>ab</sup>	3,08 $\pm$ 0,75 <sup>de</sup>	14,78 $\pm$ 1,48 <sup>cde</sup>
CS1	2,65 $\pm$ 0,45 <sup>abcd</sup>	1,38 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	6290,3 $\pm$ 2584,9 <sup>c</sup>	62,53 $\pm$ 12,32 <sup>ab</sup>	1,67 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	16,93 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>

Σε αρκετές εργασίες έχει αποδειχθεί ότι τα φαινολικά συστατικά δρουν ως αντιγηραντικοί παράγοντες με μηχανισμό που φαίνεται να είναι εν μέρει αντιφλεγμονώδης (González et al., 2011) και εν μέρει αντιοξειδωτικός σε μόρια λιπιδίων όπως η LDL (Scalbert et al., 2005). Τα προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων αναγνωρίζονται σε αρτηριοσκληρωτικές πλάκες και είναι ικανά να διεγείρουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και κατ' επέκταση να συνδέονται με μονοκύτταρα και να εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ειδικότερα το μόριο oxLDL διεγείρει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και πυροδοτεί την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών σε μακροφάγα (Kaliora et al., 2016). Στην παρούσα έρευνα, μόρια LDL που υπάρχουν στον ορό του αίματος υποβλήθηκαν σε επαγόμενη από χαλκό οξείδωση και τα περισσότερα εκχυλίσματα μανιταριών αποδείχθηκαν ότι αυξάνουν την αντίσταση στην οξείδωση.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων μανιταριών σε λιποπρωτεΐνες του ορού δεν ήταν ανάλογα με αυτά που προέκυψαν με βάση τον προσδιορισμό σε DPPH και FRAP. Φυσικά, το προφίλ των διαφόρων εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά και διάφορους μεταβολίτες τους επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα, αφού έχει αποδειχθεί η ικανότητα τους στην αναγωγή ελεύθερων ριζών (Gülçin, 2012). Ωστόσο, η χρήση της “σταθερής” ρίζας DPPH αποτελεί λιπόφιλη ένωση με περιορισμένη ικανότητα πρόσβασης στα υδρόφιλα συστατικά. Επιπλέον ο συγκεκριμένος προσδιορισμός μπορεί να μην σχετίζεται με ελεύθερες ρίζες που έχουν φυσιολογική σημασία όπως το OH<sup>·</sup>. Η χρήση του FRAP είναι καταλληλότερη όταν εφαρμόζεται για υδατοδιαλυτά συστατικά τα οποία αντιδρούν σε υδατικά διαλύματα, ενώ δεν προσμετρά αντιοξειδωτικά που περιέχουν ομάδες θειόλης λόγω του υψηλού ορίου ανίχνευσης. Ως εκ τούτου οι μέθοδοι DPPH και FRAP έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων μανιταριών, ενώ η μέθοδος TSO φαίνεται να αποτελεί μια πιο “βιολογική” (και συνεπώς καταλληλότερη) μέθοδο προσδιορισμού.

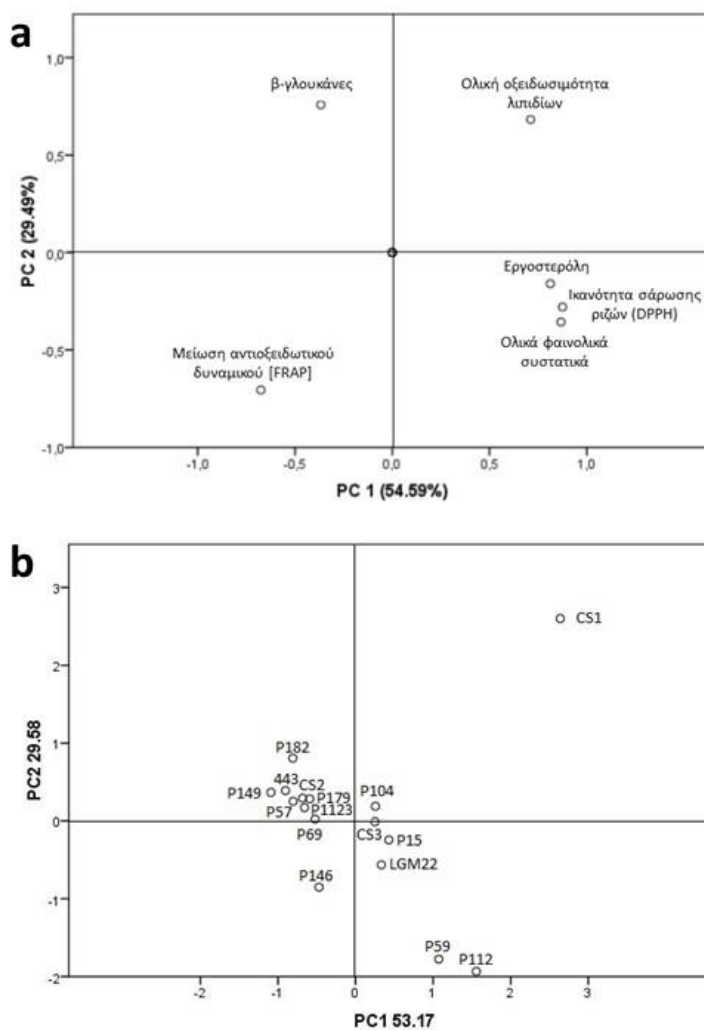
#### 2.1.3.5 Γλουκάνες

Η περιεκτικότητα των διαφόρων στελεχών σε γλουκάνες υπολογίστηκε σε 14-25% ξ.β., το δε κλάσμα των β-γλουκανών αποτελεί το 73,1-91,4% των ολικών γλουκανών αντιστοιχώντας στο 10,9-22,9% του ξηρού βάρους των μανιταριών και παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (Πίνακας 2.1.5.). Επιπλέον, σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της περιεκτικότητας σε α-γλουκάνες και της πρωιμότητας ( $r = 0,706$ ,  $p < 0,05$ ) καθώς επίσης και ανάμεσα στις β-γλουκάνες και το μέσο βάρος των μανιταριών ( $r = 0,531$ ,  $p < 0,05$ ). Πρόσφατη εργασία αναφέρει ότι η περιεκτικότητά των μανιταριών σε β-γλουκάνες επηρεάζεται σημαντικά και από την φύση του υποστρώματος (Avni et al., 2017). Ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση είναι προφανές ότι οι γενετικοί/ενδογενείς παράγοντες ευθύνονται για τις παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις.

#### 2.1.3.6 Διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των κύριων ποιοτικών παραμέτρων που μελετήθηκαν στα μανιτάρια

Προκειμένου να παραληφθεί μια γενική εικόνα των πιθανών σχέσεων που υπάρχουν μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAR, FRAP και TSO), της εργοστερόλης, των β-

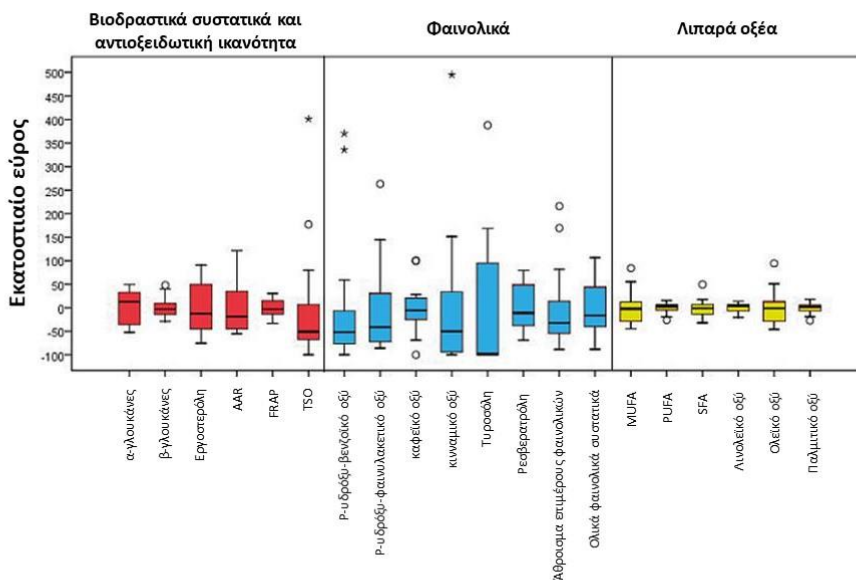
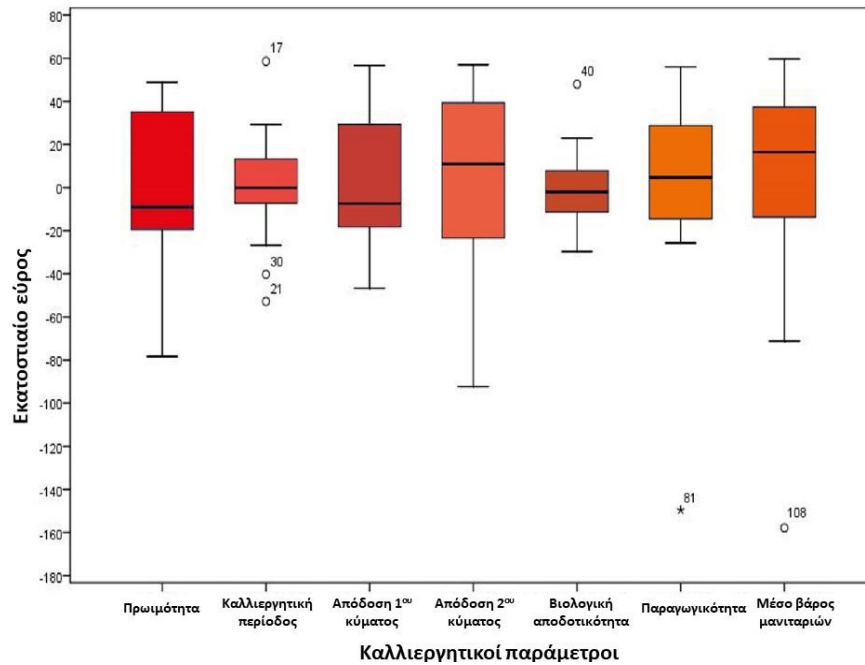
γλουκανών και των ολικών φαινολικών, διενεργήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν εξηγούν το 84,1% της ολικής διακύμανσης των δεδομένων όπως φαίνεται στην Γράφημα 2.1.2.α. Όπως προκύπτει από το σχετικό γράφημα και για τις δύο κύριες συνιστώσες οι παράμετροι εργοστερόλη, AAR και ολικά φαινολικά εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Αντίθετα οι β-γλουκάνες



Γράφημα 2.1.2. PCA score plot για α) αντιοξειδωτική ικανότητα, εργοστερόλη και β-γλουκάνες σε μανιτάρια τα οποία προήλθαν από 16 στελέχη *P. ostreatus* και β) ομαδοποίηση αυτών των 16 στελεχών με βάση τις παραπάνω παραμέτρους

και η παράμετρος TSO όπως επίσης και η FRAP τοποθετούνται στην αντίθετη πλευρά των κυρίων συνιστωσών PC1 και PC2 αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι δεν εξαρτώνται από τους προηγούμενους παράγοντες. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των επιμέρους συστατικών των μανιταριών.

Επιπλέον, παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι με τη χρήση των παραπάνω ποιοτικών παραμέτρων για την ομαδοποίηση και την διάκριση των στελεχών τα 13 από αυτά τοποθετήθηκαν παραπλεύρως των δύο κύριων συνιστωσών Γράφημα 2.1.2.b). Αντίθετα τα υπόλοιπα τρία στελέχη που εξετάστηκαν (CS1, P59, P112) παρουσίασαν σημαντική διαφορο-



Γράφημα 2.1.3..Ποσοστιαίο εύρος (%) των τιμών για τις καλλιεργητικές παραμέτρους (πάνω) και για διάφορα συστατικά μανιταριών (κάτω) *P. ostreatus* τα οποία μετρήθηκαν σε 16 διαφορετικά στελέχη. Το μέγεθος κάθε στήλης αντιπροσωπεύει το 50% των τιμών, η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε μπάρα τον διάμεσο, οι γραμμές σφάλματος τη μεγαλύτερη και μικρότερη τιμή, οι κύκλοι τιμές που είναι μεγαλύτερες ή μικρότερες κατά 1,5-3 φορές από το συνολικό εύρος και οι αστερίσκοι τιμές που είναι μεγαλύτερες κατά 3 φορές ή και περισσότερο από το συνολικό εύρος.

ποίηση. Παρομοίως, όταν χρησιμοποιήθηκαν άλλοι παράμετροι (καλλιεργητικές ιδιότητες σε συνδυασμό ή όχι με την αντιοξειδωτική ικανότητα και τα επιμέρους συστατικά) λίγα μόνο στελέχη διαφοροποιήθηκαν σημαντικά (για παράδειγμα τα LGM 22, P59, CS3, 443 και P112 όταν εξετάστηκαν μόνο οι καλλιεργητικές παράμετροι). Τελικά συμπεραίνεται ότι σημαντικό μέρος της υψηλής διακύμανσης σε πολλές παραμέτρους μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση λίγων μόνο στελεχών. Στο παρόν πείραμα η καλλιέργεια όλων των στελεχών πραγματοποιήθηκε στο ίδιο υπόστρωμα και κάτω από όμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες και ως εκ τούτου η διακύμανση στις διάφορες παραμέτρους που μελετήθηκαν οφείλεται αποκλειστικά σε γενετικούς-ενδογενείς παράγοντες (Γράφημα 2.1.2.). Συνεπώς, η βιολογική αποδοτικότητα, η οποία αποτελεί βασική παράμετρο στην αξιολόγηση της συνολικής διαδικασίας καλλιέργειας, παραμένει σχετικά σταθερή μεταξύ των διαφορετικών στελεχών για το συγκεκριμένο υπόστρωμα, ενώ η παραγωγικότητα εμφανίζει μεγαλύτερη διακύμανση λόγω του ότι συνεκτιμάται το εύρος της καλλιεργητικής περιόδου.

Υψηλή διακύμανση μεταξύ των υπό εξέταση στελεχών επίσης εμφάνισε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών όπως επίσης και η περιεκτικότητα σε διάφορα μικροσυστατικά με πιο χαρακτηριστικά την τυροσόλη, το κινναμικό οξύ, το π-υδροξυφαινολοξικό οξύ, την ρεσβερατρόλη και την εργοστερόλη, σε αντίθεση με τις β-γλουκάνες και την συγκέντρωση των λιπαρών οξέων (Γράφημα 2.1.3.).

#### 2.1.4 Συμπεράσματα

Συνολικά ο μεγάλος αριθμός στελεχών του είδους *P. ostreatus* που εξετάστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα παρουσίασαν ευρεία διακύμανση στις τιμές των περισσότερων από τις καλλιεργητικές παραμέτρους που εξετάστηκαν. Μεταξύ αυτών, η βιολογική αποδοτικότητα και η διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου έδειξαν τη μικρότερη διακύμανση σε αντίθεση με τις τιμές της πρωιμότητας, της απόδοσης κάθε κύματος σε μανιτάρια και του μέσου βάρους των καρποφοριών τα οποία διέφεραν σημαντικά μεταξύ των στελεχών. Αρκετά από τα στελέχη τα οποία είχαν απομονωθεί από αυτοφυείς καρποφορίες έδειξαν πολύ καλά καλλιεργητικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά συγκρινόμενα με διαδεδομένα εμπορικά υβρίδια, καθιστώντας τα κατάλληλα για καλλιέργεια σε εμπορική κλίμακα. Όσον αφορά τη συγκέντρωση των συστατικών, η εργοστερόλη, οι γλουκάνες και αρκετά από τα απλά φαινολικά συστατικά παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη. Τα ευρήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των κύριων



συνιστωσών, ενισχύουν την άποψη ότι τα ολικά φαινολικά και η εργοστερόλη συνδέονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών. Επιπροσθέτως, οι γενετικοί/ενδογενείς παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την σύσταση των μανιταριών του είδους *P. ostreatus*. Η υψηλή ενδοειδική ετερογένεια η οποία παρατηρήθηκε στο παρόν πείραμα ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη θεωρείται απαραίτητη για την επιτυχή παραγωγή υβριδίων και την περαιτέρω αξιοποίηση αυτών σε εμπορική κλίμακα. Τέλος, τα αποτελέσματα του εν λόγω πειράματος αποκαλύπτουν ότι η χρήση μικρού αριθμού στελεχών ανά είδος σε σχετικές μελέτες οδηγεί σε αποτελέσματα που σπάνια είναι ενδεικτικά του πραγματικού σχετικού δυναμικού του είδους.



---

## Κεφάλαιο 2.2

---

**Βιομετατροπή γεωργικών  
παραπροϊόντων από στελέχη των  
μυκήτων *Pleurotus ostreatus* και  
*Cyclocybe cylindracea*. Αξιολόγηση  
της επίδρασης τους στο τελικό  
προϊόν και το εξαντλημένο  
υπόστρωμα**

## 2.2.1 Εισαγωγή

Τα μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* αποτελούν το τρίτο σε παραγόμενη ποσότητα παγκοσμίως ενώ στην Ελλάδα σχεδόν ολόκληρη η παραγωγή καλλιεργούμενων εδώδιμων μανιταριών καλύπτεται από το συγκεκριμένο είδος. Παρόλο που το άχυρο των σιτηρών αποτελεί το πιο διαδεδομένο υπόστρωμα, έχουν μελετηθεί στο παρελθόν πληθώρα άλλων αγροβιομηχανικών και δασικών υπολειμμάτων ως προς την ικανότητα τους να αποτελέσουν υπόστρωμα για την παραγωγή μανιταριών *P. ostreatus*. Ωστόσο οι περισσότερες έρευνες αποσκοπούν στη διερεύνηση της επίδρασης των εναλλακτικών υποστρωμάτων στις καλλιεργητικές παραμέτρους, ενώ σε ελάχιστες συναξιολογείται η σύσταση των τελικών προϊόντων. Επιπλέον και ειδικά για το είδος *C. cylindracea*, η καλλιέργεια του πραγματοποιείται κυρίως σε άχυρο σίτου ή σε πριονίδια, ενώ έχει ελάχιστα μελετηθεί η διαδικασία βιομετατροπής άλλων οργανικών υπολειμμάτων όπως και η επίδραση της χρήσης τους στη σύσταση των μανιταριών.

Στο παρόν Κεφάλαιο διερευνάται η καταλληλότητα διάφορων παραπροϊόντων (πολλά από τα οποία εξετάζονται για πρώτη φορά) ως πιθανά υποστρώματα για την παραγωγή μανιταριών *P. ostreatus* και *C. cylindracea*. Επιπλέον μελετάται η επίδραση αυτών στην τελική σύσταση των μανιταριών και των εξαντλημένων υποστρωμάτων και διερευνάται η ύπαρξη πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των επιμέρους ανόργανων και οργανικών συστατικών.

## 2.2.2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.2.2.1 Βιολογικό υλικό

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *C. cylindracea* LGAM 445 και *P. osteratus* LGAM IK1123. Και τα δύο προέρχονται από απομονώσεις αυτοφυών μανιταριών και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στη συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.

#### 2.2.2.2 Προετοιμασία υποστρωμάτων και διαδικασία καλλιέργειας μανιταριών

Συνολικά δώδεκα υπολείμματα και παραπροϊόντα προερχόμενα από γεωργικές, δασικές και αγροβιομηχανικές δραστηριότητες αξιολογήθηκαν αυτούσια ή σε μείγματα - μέσω της δημιουργίας εννέα υποστρωμάτων- για την καλλιέργεια επιλεγμένων στελεχών *C. cylindracea* και *P. ostreatus*: (i) AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), (ii) BS: πριονίδια οξιάς, (iii) CC: σπάδικες καλαμποκιού, (iv) GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), (v) OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), (vi) OS: πυρηνόξυλο, (vii) PN: πευκοβελόνες, (viii) PL: φύλλα φοίνικα και (ix) WS: άχυρο σίτου. Τα υποστρώματα καλλιέργειας αφού τεμαχίστηκαν (μέγιστο μήκος 2-3 cm) εμβαπτίστηκαν σε νερό για 24h. Μετά την απομάκρυνση του πλεονάζοντος ύδατος, τα υποστρώματα με υγρασία (50-75%) αναμίχθηκαν με ανθρακικό ασβέστιο (CaCO<sub>3</sub>) 2% w/w για την ρύθμιση του pH, ενώ για τον εμπλουτισμό σε άζωτο και άλλα ιχνοστοιχεία χρησιμοποιήθηκε πίτουρο σε αναλογία 5%. Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις (βάρους 2 kg η κάθε μία).

Η προετοιμασία του πολλαπλασιαστικού υλικού, ο εμβολιασμός οι συνθήκες καλλιέργειας καθώς και οι καλλιεργητικές παράμετροι που μελετήθηκαν είναι όμοιες με αυτές που περιγράφονται στις Παραγράφους 2.1.2.2 και 2.1.2.3.

#### 2.2.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Των χημικών αναλύσεων προηγήθηκε λυοφιλίωση (-50 °C, 0.05-0.1 mbar) των δειγμάτων μανιταριών και υποστρωμάτων και κονιορτοποίηση σε εργαστηριακό μύλο ώστε το μέγιστο μέγεθος των σωματιδίων σε κάθε δείγμα να μην υπερβαίνει τα 0.5 mm. Στη συνέχεια τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C έως την πραγματοποίηση της ανάλυσης.

#### 2.2.2.4 Προσδιορισμός της βασικής σύστασης (“proximate composition”) των μανιταριών

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε τέφρα, φυτικές ίνες και ολικό λίπος προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από την AOAC (1995). Ο ολικός άνθρακας (C) και το άζωτο (N) μετρήθηκαν με τη βοήθεια CHN στοιχειακού αναλυτή (Carlo Erba, EA1108). Αντίστοιχες μετρήσεις για την επιβεβαίωση της ακρίβειας της μεθόδου (περιεκτικότητα σε άζωτο υποστρωμάτων και μανιταριών) έγιναν και με τη μέθοδο Kjeldahl

και χρήση συσκευής Kjeltac (Foss Tecator AB, Honganas Sweden). Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε ολικές πρωτεΐνες (crude protein) υπολογίστηκε από το γινόμενο του ολικού αζώτου με τον συντελεστή 4,38 (Barros et al., 2008) λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των μανιταριών σε οργανικές ενώσεις πλούσιες σε άζωτο (κυρίως χιτίνη). Οι ολικοί υδατάνθρακες (Nitrogen-free extracts) υπολογίστηκαν από τη σχέση: 100- (υγρασία + πρωτεΐνες + λίπος + τέφρα) και το ενεργειακό περιεχόμενο (kcal 100g<sup>-1</sup> v.β.) από την εξίσωση: ενέργεια = 4 × (g πρωτεΐνης + g υδατανθράκων) + 9 × (g λιπους) (Manzi et al. 2004).

#### 2.2.2.5 Προσδιορισμός καλίου (K), φωσφόρου (P) και νατρίου (Na) σε μανιτάρια

Για τον προσδιορισμό των μετάλλων K, P και Na, 0,5 g δείγματος αποτεφρώθηκαν στους 500 °C για 4 ώρες και η τέφρα υποβλήθηκε σε υγρή χώνευση με πυκνό νιτρικό οξύ (HNO<sub>3</sub>). Η συγκέντρωση των K και Na προσδιορίστηκε με τη χρήση φωτόμετρου φλόγας (Flame Photometer, Corning 410) και η συγκέντρωση του P με τη χρήση οπτικού φασματοφωτόμετρου (T60 UV-Visible Spectrophotometer, PG Instruments).

#### 2.2.2.6 Προσδιορισμός της βασικής σύστασης (“proximate composition”) των υποστρωμάτων καλλιέργειας

Για τον προσδιορισμό της βασικής χημικής σύστασης του υποστρώματος πριν και μετά την παραγωγή μανιταριών, δείγματα αρχικού και εξαντλημένου υποστρώματος αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης τέφρας, των στοιχείων C, N, K, P, Na, των ολικών ινωδών συστατικών, της ολικής πρωτεΐνης και του ολικού λίπους, όπως περιεγράφηκαν προηγουμένως για την περίπτωση των μανιταριών. Ειδικά η περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε ολικές πρωτεΐνες (crude protein) υπολογίστηκε από το γινόμενο του ολικού αζώτου επί τον συντελεστή 6,25. Τα κλάσματα των ινωδών συστατικών neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) και acid detergent lignin (ADL), προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Goering and Van Soest (1970). Η περιεκτικότητα σε λιγνίνη υπολογίστηκε όσο το κλάσμα ADL, ενώ οι ημικυτταρίνες και η κυτταρίνη από τη διαφορά των NDF-ADF και ADF-ADL αντίστοιχα. Τα ολικά ινώδη συστατικά υπολογίστηκαν από το άθροισμα λιγνίνη + κυτταρίνη + ημικυτταρίνη.

#### 2.2.2.7 Προσδιορισμός pH των υποστρωμάτων καλλιέργειας

Οι τιμές του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας ελήφθησαν με τη χρήση πεχάμετρου-αγωγιμόμετρου Schott-Geräte GmbH TR156 μετρώντας υδατικά εκχυλίσματα τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη νερού στα υποστρώματα (1:9 w/v, 100 rpm για 24 ώρες).

#### 2.2.2.8 Προσδιορισμός της μυκηλιακής βιομάζας στα υποστρώματα καλλιέργειας

Η εκτίμηση της περιεχόμενης μυκηλιακής βιομάζας στα υποστρώματα καλλιέργειας, έγινε μέσω της υδρόλυσης της μυκηλιακής χιτίνης σε N-ακετυλογλουκοζαμίνη (Scotti et al., 2001). Αρχικά τα δείγματα υδρολύθηκαν με συμπυκνωμένο KOH (120g KOH σε 100 ml H<sub>2</sub>O) σε συσκευή αποστείρωσης (15 min στους 121 °C). Το αιώρημα N-ακετυλογλουκοζαμίνης που προέκυψε, καταβυθίστηκε και καθαρίστηκε με μείγμα αιθανόλης-νερού 1:1 (v/v) και στη συνέχεια απομακρύνθηκε με νιτρικό οξύ που σχηματίστηκε από την προσθήκη NaNO<sub>2</sub> και KHSO<sub>4</sub>. Ακολούθησε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της τελευταίας μέσω της ποσοτικοποίησης με τη χρήση MBTH και FeCl<sub>3</sub>, ενώ η καμπύλη αναφοράς έγινε με διαλύματα γλουκοζαμίνης σε HCL (Ride and Drysdale, 1972).

#### 2.2.2.9 Προσδιορισμός μετάλλων, λανθανίδων και ακτινίδων σε δείγματα υποστρωμάτων καλλιέργειας και μανιταριών με χρήση ICP-MS

Το στοιχειακό περιεχόμενο προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας φασματόμετρο μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα, ICP-MS (9000 Series, Perkin Elmer, SCIEX, Καναδάς). Οι συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS ήταν οι ακόλουθες: ροή αερίου στον εκνεφωτή 0,75 l min<sup>-1</sup>, ισχύς του ICP RF 950 W, τάση των ιοντικών φακών 7 V, τάση στο παλμικό στάδιο 950 V και 26 rpm ο ρυθμός πρόσληψης δείγματος από την περισταλτική αντλία. Οι καμπύλες αναφοράς των σπάνιων γαιών ελήφθησαν σε συγκεντρώσεις από 1 ppt έως 10 ppb και των ιχνοστοιχείων από 0,1 ppb έως 1 ppm. Τα στοιχεία In και Ge χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα για τις σπάνιες γαίες και τα ιχνοστοιχεία, αντίστοιχα. Όλες οι μετρήσεις των δειγμάτων συμπεριλαμβανομένων των προτύπων υλικών αναφοράς έγιναν εις τριπλούν για όλα τα στοιχεία που αναλύθηκαν.

##### 2.2.2.9.1 Χημικά αντιδραστήρια και πρότυπα διαλύματα

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τουλάχιστον αναλυτικής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ήταν υπερκάθαρο νιτρικό οξύ (65% w/v, Merck, Darmstadt, Γερμανία), ICP εσωτερικά πρότυπα Ge και In (Inorganic Ventures, New Jersey, USA), ICP-MS πιστοποιημένα πολύ-στοιχειακά πρότυπα για τα ιχνοστοιχεία (Inorganic Ventures, New Jersey, USA) και ICP-MS πολύ-στοιχειακά πρότυπα σπάνιων γαιών (Inorganic Ventures, New Jersey, USA). Ακόμη χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό με αντίσταση 18,2 ΜΩ cm<sup>-1</sup> προερχόμενο από συσκευή MilliQ plus system (Millipore, Saint Quentin Yvelines, France).

**Πίνακας 2.2.1. Πιστοποιημένες συγκεντρώσεις και μετρηθείσες τιμές σπάνιων γαιών και ακτινίδων στα πρότυπα υλικά αναφοράς BCR 668 και RM 8414.**

	BCR 668			RM 8414		
	Πιστοποιημένες τιμές (μg/kg)	Τιμές που μετρήθηκαν (μg/kg)	Ανάκτηση (%)	Πιστοποιημένες τιμές (μg/kg)	Τιμές που μετρήθηκαν (μg/kg)	Ανάκτηση (%)
Ce	89±7	83±3	93,3%	50 <sup>a</sup>	3,3±0,3	6,6%
Dy	8,9±0,6	8,0±0,7	89,9%	NA	0,13±0,02	NA
Er	4,5±0,5	3,9±0,4	86,7%	NA	0,14±0,02	NA
Eu	2,79±0,16	2,6±0,10	93,2%	NA	0,14±0,02	NA
Gd	13,0±0,6	12,4±0,7	95,4%	NA	0,74±0,17	NA
Ho	1,8±0,6a	1,2±0,2	66,7%	NA	0,04±0,01	NA
La	80±6	74±5	92,5%	NA	7,9±0,4	NA
Lu	0,389±0,024	0,383±0,010	98,5%	NA	0,040±0,010	NA
Nd	54±4	50±1	92,6%	NA	1,8±0,2	NA
Pr	12,3±1,1	11,2±0,2	91,1%	NA	0,34±0,04	NA
Sc	8,5±1,8a	10,3±1,5	121,2%	NA	11,7±3,7	NA
Sm	11,2±0,8	10,7±0,4	95,5%	NA	2,57±0,04	NA
Tb	1,62±0,12	1,63±0,07	100,6%	NA	0,04±0,01	NA
Tm	0,48±0,08	0,569±0,03	118,5%	NA	0,031±0,009	NA
Y	59±5	54±3	91,5%	NA	0,77±0,02	NA
Yb	2,8±0,5 <sup>a</sup>	2,3±0,1	82,1%	NA	0,13±0,04	NA
Th	10,7±1,2	9,5±0,4	88,8%	NA	2,5±0,7	NA
U	56±5	50,8±3	90,7%	NA	5,4±0,9	NA

<sup>a</sup> ενδεικτικές τιμές, NA μη διαθέσιμες

Για τον έλεγχο της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα υλικά αναφοράς: RM 8414 (bovine muscle powder), RM 8415 (whole egg powder), καθώς και ERM-BB186 (pig kidney) για τα ιχνοστοιχεία και BCR-668 (mussel tissue) για τις σπάνιες γαίες (Πίνακες 2.2.1, 2.2.2 και 2.2.3.). Τα RM 8414 και RM 8415 ελήφθησαν από το Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας (NIST, ΗΠΑ), ενώ τα ERM-BB186 και BCR-668 ελήφθησαν από το Ινστιτούτο Υλικών Αναφοράς και Μετρήσεων (IRMM, Βέλγιο). Επιπλέον, μετρήθηκαν και στοιχεία εκτός



του πάνελ των σπάνιων γαιών (Rare Earth Elements, REEs) στο RM 8414 και των ιχνοστοιχείων (Trace Elements, TREs) στο BCR-668 για τις ανάγκες της ανάλυσης δεδομένων.

**Πίνακας 2.2.2 Πιστοποιημένες συγκεντρώσεις και μετρηθείσες τιμές των ιχνοστοιχείων στα πρότυπα υλικά αναφοράς BCR 668 και RM 8414.**

	BCR 668			RM 8414		
	Πιστοποιημένες Τιμές (μg/kg)	Ευρεθείσες τιμές (μg/kg)	Ανάκτηση (%)	Πιστοποιημένες Τιμές (μg/kg)	Ευρεθείσες τιμές (μg/kg)	Ανάκτηση (%)
As	7100±500 <sup>a</sup>	5003±453	70,5%	9±3	9,7±0,1	107,8%
Cd	275±11 <sup>a</sup>	409±37	148,7%	13±11	20±10	153,9%
Co	335 <sup>b</sup>	196±9	58,5%	7±3	9±2	128,6%
Cr	370±60 <sup>a</sup>	730±67	197,3%	71±38	93±5	131,0%
Cu	NA	9874±889	NA	2840±450	2670±127	94,0%
Fe	89100 <sup>b</sup>	36157±3257	66,7%	71200±9200	50952±5400	71,6%
Mn	NA	3670±331	NA	370±90	514±127	138,9%
Mo	1990±150 <sup>a</sup>	1539±139	77,3%	80±60	86±41	107,5%
Ni	NA	397±37	NA	50±40	36±20	72,0%
Pb	NA	1054±97	NA	380±240	186±14	48,9%
Se	NA	5170±469	NA	76±10	63±3	82,9%
Sr	NA	31781±2867	NA	52±15	39±20	75,0%
V	NA	2634±237	NA	5 <sup>a</sup>	101±27	2020,0%
Zn	70700±400 <sup>a</sup>	98937±8904	139,9%	142000±14000	141909±2000	99,9%
Sb	NA	9,9±1,7	NA	10 <sup>a</sup>	7,0±1,7	70,0%
Li	NA	864±131	NA	NA	30,7±5,3	NA
Be	NA	11172±1003	NA	NA	351±54	NA
Ti	NA	56914±5401	NA	NA	54937±5040	NA
Tl	NA	20,3±3,4	NA	NA	7,7±1,9	NA
Ca	NA	1548557±139367	NA	145000±20000	137421±13400	94,8%
Mg	NA	3833041±344974	NA	960000±95000	1026877±131000	107,0%

<sup>a</sup>ενδεικτικές τιμές, <sup>b</sup> μέσος όρος του εύρους, Μη διαθέσιμες

**Πίνακας 2.2.3. Απόλυτες τιμές των ιχνοστοιχείων στα πρότυπα υλικά αναφοράς RM 8415 και ERM BB186.**

	RM 8415			ERM BB186		
	Πιστοποιημένες Τιμές (μg/kg)	Τιμές που μετρήθηκαν (μg/kg)	Ανάκτηση (%)	Πιστοποιημένες Τιμές (μg/kg)	Τιμές που μετρήθηκαν (μg/kg)	Ανάκτηση (%)
As	10 <sup>a</sup>	NA	NA	8±6 <sup>a</sup>	13±5	162,5%
Cd	5 <sup>a</sup>	NA	NA	1,09±0.1	2,0±0,7	183,5%
Co	12±5	20±4	166,7%	106 <sup>a</sup>	NA	NA
Cr	370±180	263±43	71,1%	133 <sup>a</sup>	NA	NA
Cu	2700±350	3112±200	115,3%	36500±1800	35382±2400	96,9%
Fe	112000±16000	159202±4400	142,1%	255000±13000	280912±6900	110,2%
Mn	1780±380	1695±477	95,2%	7260±250	6818±944	93,9%
Mo	247±23	230±31	93,1%	NA	NA	NA
Ni	NA	NA	NA	203,5 <sup>a</sup>	NA	NA
Pb	61±12	53±21	86,9%	40±5	44±8	110,00%
Se	1390±170	1039±110	74,7%	10300±900	9300±90	90,3%
Sr	5630±460	5790±700	102,8%	NA	NA	NA
V	459±81	355,9±30	77,3%	NA	NA	NA
Zn	67500±7600	60889±7400	90,2%	134000±5000	129531±11000	96,7%
Sb	2 <sup>a</sup>	NA	NA	NA	NA	NA
Li	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Be	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ti	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tl	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ca	NA	NA	NA	288000 <sup>a</sup>	NA	NA
Mg	305000±27400	462032±7400	151,5%	6021000 <sup>a</sup>	NA	NA

<sup>a</sup>ενδεικτικές τιμές

#### 2.2.2.9.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Η πλήρης χώνευση των δειγμάτων επετεύχθη με τη χρήση συσκευής χώνευσης μικροκυμάτων (CEM, Mars X-Press, Matthews, NC, USA). Τα δείγματα (0,25 g) διαλύθηκαν σε 5 ml συμπυκνωμένου HNO<sub>3</sub> και στη συνέχεια θερμάνθηκαν με τη βοήθεια μικροκυμάτων σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα: Η ισχύς αυξήθηκε από 0 έως 960 W σε διάρκεια 5 min και παρέμεινε για 15 min, η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε τους 175°C και ακολούθησε πρόγραμμα ψύξης των δειγμάτων για 15 min, ενώ το ερμητικό κλείσιμο των φιαλών απέτρεψε την απώλεια πτητικών στοιχείων. Στη συνέχεια τα δείγματα διηθήθηκαν με τη βοήθεια φίλτρων σύριγγας μίας χρήσεως 0,20 μm/15mm (Chromafil, Macherey-Nagel, Duren, Germany) και αραιώθηκαν πέντε φορές με υπερκάρθαρο νερό πριν εισαχθούν στη συσκευή ICP-MS.

#### 2.2.2.9.3 Εκτίμηση επικινδυνότητας από την πρόσληψη μετάλλων μέσω της κατανάλωσης μανιταριών

Η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη των στοιχείων μέσω της κατανάλωσης μανιταριών υπολογίστηκε από την ακόλουθη σχέση (EPA, 2000):

$$EDI = \frac{CM * CR}{BW}$$

όπου ο δείκτης EDI ( $\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) αντιπροσωπεύει την ημερήσια πρόσληψη των στοιχείων, το CM τη συγκέντρωση των στοιχείων στα μανιτάρια (βασιζόμενη στο ξηρό βάρος), το CR το βάρος μιας μερίδας μανιταριών (υπολογίζεται σε 300 g νωπού βάρους που ισοδυναμεί με 30 g ξηρού βάρους, Kalač and Svoboda, 2000), και το BW το βάρος ενός ενήλικου ατόμου (60 kg σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιστημονική Επιτροπή για το βάρος και τη διατροφή των ενηλίκων, Aloupi et al., 2012). Η προσλαμβάνουσα δόση των σπάνιων γαιών πάνω από την οποία έχουν αναφερθεί αρνητικές για την ανθρώπινη υγεία επιπτώσεις θεωρήθηκε τα 100 – 110  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Li et al., 2013b).

#### 2.2.2.10 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στο πείραμα της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε στέλεχος και υποστρώμα, ενώ και όλες οι χημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τετραπλούν. Τα αποτελέσματα στους πίνακες παρουσιάζονται ως μέση όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση. Την ανάλυση της διακύμανσης, ακολούθησαν Duncan t- test για την εκτίμηση των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (SPSS version 19). Ο συντελεστής Pearson χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των διάφορων μεταβλητών (για επίπεδα σημαντικότητας 0,05 και 0,01) και η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal component analysis) διεξήχθη με το ίδιο λογισμικό για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ των διάφορων μεταβλητών και την οπτικοποίηση του αποτελέσματος στο επίπεδο των δύο κύριων συνιστωσών. Επιπροσθέτως, ειδικά γραφήματα box plots δημιουργήθηκαν για τον εντοπισμό των ακραίων τιμών και για την σύγκριση της κατανομής διαφόρων παραμέτρων. Επιπλέον, το λογισμικό Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Virginia, USA) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση της διακριτικής ανάλυσης (discriminant analysis) και τις στατιστικές προβλέψεις του υποστρώματος προέλευσης και του είδους του μανιταριού με βάση τη συγκέντρωση των σπάνιων γαιών και την κύρια σύσταση τους.

## 2.2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

### 2.2.3.1 Σύσταση των αρχικών υποστρώματων

Τα κυριότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αρχικών υποστρώματων (πριν τον εμβολιασμό τους με τους μύκητες που εξετάστηκαν) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.1. Καταρχήν αξίζει να σημειωθεί το μεγάλο εύρος της περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνες, λίπος, και τέφρα (1 - 16%, 0 - 12% και 1 - 21% αντίστοιχα). Τα υποστρώματα PL και GM περιείχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων Κ, Ρ και Να συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα. Αναφορικά με τα κλάσματα των ινωδών συστατικών, το υπόστρωμα CC παρουσίασε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη (42%) και κυτταρίνη (40%) και τη χαμηλότερη σε λιγνίνη (4%) ακολουθούμενο από τα WS και BS (είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε κυτταρίνη (47%). Αντίθετα τα PN και OL χαρακτηρίζονται από σχετικά χαμηλές τιμές ημικυτταρίνης και κυτταρίνης (10-18% και 13-15% αντίστοιχα) και πολύ υψηλή περιεκτικότητα λιγνίνης (19% και 29% αντίστοιχα). Η περιεκτικότητα των δύο σημαντικότερων στοιχείων (C και N) και ειδικότερα ο λόγος C/N έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αποδοτικότητα σε μανιτάρια (Philippoussis et al., 2001). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, με διαφορά τη μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου περιείχε το GM (2,3%), ακολουθούμενο από τα PN (1,7%) και OL (1,3%) και κατά συνέπεια ο λόγος C/N εμφανίστηκε αρκετά χαμηλός (18,8 - 38,2) στα συγκεκριμένα υποστρώματα ανάπτυξης.

### 2.2.3.2 Συγκέντρωση ιχνοστοιχείων και σπάνιων γαιών στα υποστρώματα ανάπτυξης

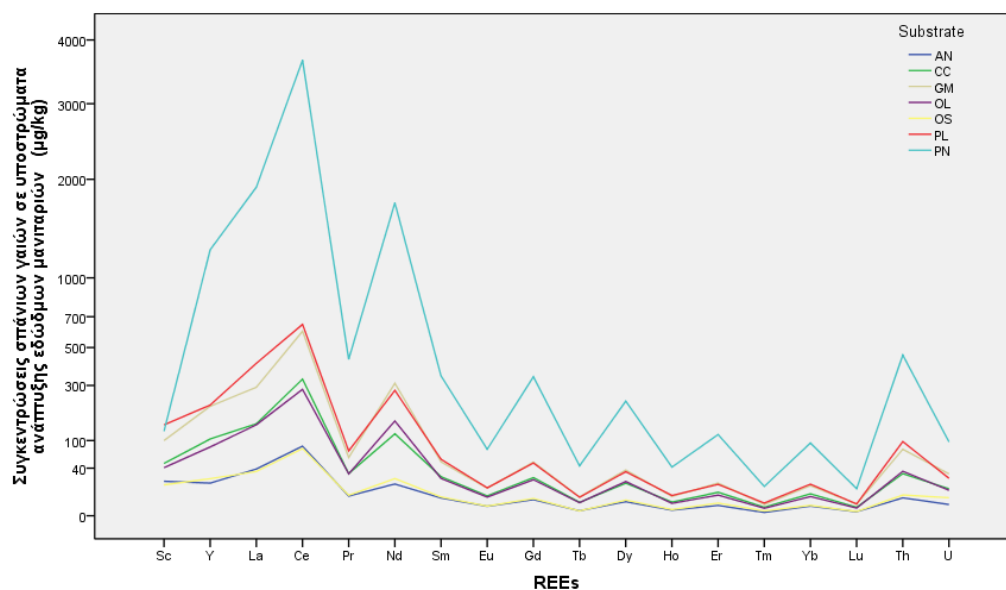
Για τα επτά από τα εννέα διαφορετικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των ιχνοστοιχείων και των σπάνιων γαιών με τη βοήθεια φασματομετρίας ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-

Πίνακας 2.2.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες των εννέα υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μανιταριών *P. ostreatus* και *C. cylindracea* (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου). Οι τιμές (% ξ.β. εκτός από τις τρεις πρώτες παραμέτρους) αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

	AN	BS	CC	GM	OL	OS	PL	PN	WS
Υγρασία	32.3 ± 2.1 <sup>d</sup>	63 ± 1.8 <sup>b</sup>	64.6 ± 3.0 <sup>b</sup>	74 ± 1.1 <sup>ab</sup>	65 ± 0.3 <sup>b</sup>	44 ± 0.8 <sup>c</sup>	61.6 ± 2.0 <sup>b</sup>	73 ± 1.9 <sup>ab</sup>	77.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
pH	5.2 ± 0.0 <sup>c</sup>	6 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.0 <sup>e</sup>	5.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.1 <sup>d</sup>	4.9 ± 0.0 <sup>d</sup>	5.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.1 <sup>d</sup>
C/N	39,2 ± 3,0 <sup>d</sup>	427,2 ± 24,2 <sup>a</sup>	112,4 ± 21,2 <sup>bc</sup>	18,8 ± 0,9 <sup>d</sup>	38,2 ± 3,9 <sup>d</sup>	56,8 ± 12,0 <sup>cd</sup>	57,1 ± 2,6 <sup>cd</sup>	25,4 ± 1,8 <sup>d</sup>	123,0 ± 7,1 <sup>b</sup>
N	0,6 ± 0,1 <sup>cd</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>cd</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>bc</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>bcd</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>bcd</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>d</sup>
K	376 ± 12 <sup>d</sup>	-	433 ± 5 <sup>d</sup>	1049 ± 33 <sup>b</sup>	657 ± 19 <sup>c</sup>	459 ± 17 <sup>d</sup>	1167 ± 11 <sup>a</sup>	246 ± 6 <sup>e</sup>	170 ± 18 <sup>e</sup>
Na	7,1 ± 0,6 <sup>cd</sup>	-	13,6 ± 1,1 <sup>c</sup>	42,1 ± 1,6 <sup>a</sup>	28,7 ± 5,3 <sup>b</sup>	7,0 ± 1,7 <sup>cd</sup>	43,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,0 <sup>cd</sup>	4,2 ± 0,0 <sup>cd</sup>
P	116,3 ± 9,9 <sup>bc</sup>	28,7 ± 4,5 <sup>d</sup>	67,3 ± 13,3 <sup>cd</sup>	172,4 ± 16,1 <sup>ab</sup>	77,0 ± 2,6 <sup>cd</sup>	30,1 ± 0,1 <sup>d</sup>	192,4 ± 24,9 <sup>a</sup>	185,5 ± 20,9 <sup>ab</sup>	25,4 ± 1,7 <sup>d</sup>
Τέφρα	1.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>c</sup>	8.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	8.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>c</sup>	7.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	21.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>b</sup>
Ολικές πρωτεΐνες	6,9 ± 1,3 <sup>ef</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>f</sup>	3,8 ± 0,5 <sup>def</sup>	15,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,8 <sup>bc</sup>	5,4 ± 0,1 <sup>cde</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>de</sup>	11,3 ± 0,9 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>ef</sup>
Ολικό λίπος	6.1 ± 2.1 <sup>bc</sup>	-	0.6 ± 0.2 <sup>d</sup>	2.7 ± 0.4 <sup>cd</sup>	7.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	12.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.77 ± 0.1 <sup>d</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>cd</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>d</sup>
Ολικοί υδατάνθρακες	85,5 ± 3,1 <sup>bc</sup>	98,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	93,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	73,1 ± 1,6 <sup>d</sup>	75,4 ± 0,7 <sup>d</sup>	79,9 ± 0,9 <sup>cd</sup>	85,3 ± 0,3 <sup>bc</sup>	64,9 ± 2,1 <sup>e</sup>	90,4 ± 0,3 <sup>ab</sup>
Ινώδη συστατικά	41.4 ± 1.2 <sup>c</sup>	59.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	34.6 ± 0.2 <sup>d</sup>	30.8 ± 1.2 <sup>de</sup>	26.9 ± 0.5 <sup>ef</sup>	47.2 ± 21.4 <sup>b</sup>	40.4 ± 0.5 <sup>c</sup>	25.0 ± 1.9 <sup>f</sup>	43.2 ± 0.3 <sup>bc</sup>
Ημικυτταρίνη	22,4 ± 1,1 <sup>cde</sup>	31,7 ± 5,4 <sup>abc</sup>	41,6 ± 1,5 <sup>a</sup>	17,3 ± 0,3 <sup>ef</sup>	18,4 ± 1,5 <sup>def</sup>	27,4 ± 2,1 <sup>bcd</sup>	28,9 ± 0,8 <sup>bcd</sup>	10,1 ± 0,3 <sup>f</sup>	37,6 ± 0,7 <sup>ab</sup>
Κυτταρίνη	35,2 ± 3,1 <sup>abc</sup>	47 ± 6,6 <sup>a</sup>	39,6 ± 2,0 <sup>ab</sup>	29,5 ± 2,5 <sup>bcd</sup>	15,4 ± 1,0 <sup>de</sup>	23,4 ± 3,4 <sup>cde</sup>	37,4 ± 0,9 <sup>abc</sup>	12,8 ± 2,4 <sup>e</sup>	38,4 ± 1,4 <sup>abc</sup>
Λιγνίνη	14,1 ± 1,2 <sup>cd</sup>	15,7 ± 0,7 <sup>cd</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>e</sup>	25,3 ± 1,4 <sup>ab</sup>	19,2 ± 0,1 <sup>bc</sup>	25,1 ± 2,6 <sup>ab</sup>	17,6 ± 1,5 <sup>cd</sup>	29,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	11,6 ± 1,5 <sup>d</sup>

MS), ενώ για δύο από αυτά (WS και BS) δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση λόγω μη επαρκούς ποσότητας δείγματος. Ο σκοπός των εν λόγω αναλύσεων δεν ήταν μόνο ο ακριβής προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στα διάφορα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν αλλά –σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες αναλύσεις στα μανιτάρια που παρήχθησαν- να διερευνηθεί για πρώτη φορά η πιθανή απορρόφηση τους από τα *P. Ostreatus* και *C. cylindracea*, να μελετηθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ τους και να εξακριβωθεί η πιθανή επίδραση τους τόσο στις καλλιεργητικές παραμέτρους όσο και στη σύσταση των μανιταριών.

Για την επιβεβαίωση της ποιότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το υλικό αναφοράς BCR 668 με πιστοποιημένες ή ενδεικτικές τιμές για λανθανίδες και ακτινίδες. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε τρεις παρτίδες, σε καθεμιά από τις οποίες συμπεριλήφθηκε το BCR 668. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.4 και το ποσοστό απόκλισης των μετρήσεων από τις ενδεικτικές τιμές κυμάνθηκε από 0,6% έως 33,3%.



**Γράφημα 2.2.1.** Κανονική κατανομή των συγκεντρώσεων ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) των REEs εφτά υποστρωμάτων καλλιεργείας μανιταριών (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα), Το προμήθειο (Pm) δεν παρουσιάζεται λόγω μη ανίχνευσης του στα δείγματα που μετρήθηκαν.

Συνολικά ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 21 ιχνοστοιχεία εκ των οποίων τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφάνισε το Ca (2920-22037 ppm), ακολουθούμενο από το Mg (432-3270 ppm) και Fe (110-2969 ppm) για όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν (Πίνακας 2.2.4.). Παρόμοιες τιμές έχουν προσδιοριστεί στο παρελθόν και στα υποστρώματα ανάπτου-

**Πίνακας 2.2.5. Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων των επτά υπό μελέτη υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μανιταριών *Cyclocybe cylindracea* και *Pleurotus ostreatus* (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, , CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οينوποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα), Οι τιμές [ppm, εκτός από τα Sb και Tl τα οποία εκφράζονται σε ppb και επισημειώνονται με αστερίσκο (\*) αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση, n = 4}. Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Trace elements	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
As	2,12±0,21 <sup>d</sup>	3,38±0,95 <sup>bcd</sup>	7,41±2,96 <sup>ab</sup>	3,04±0,40 <sup>cd</sup>	1,97±0,27 <sup>d</sup>	7,80±1,71 <sup>a</sup>	6,89±0,38 <sup>abc</sup>
Be	7,65±3,40 <sup>bc</sup>	2,49±0,01 <sup>c</sup>	27,41±9,11 <sup>a</sup>	10,22±0,98 <sup>bc</sup>	8,40±1,53 <sup>bc</sup>	8,23±1,18 <sup>bc</sup>	18,30±1,17 <sup>ab</sup>
Ca	5664,67±750,18 <sup>b</sup>	2919,67±364,17 <sup>b</sup>	15798,86±5018,60 <sup>ab</sup>	13891,15±2198,26 <sup>ab</sup>	8722,01±7705,27 <sup>ab</sup>	7790,23±1385,72 <sup>b</sup>	22036,60±1260,03 <sup>a</sup>
Cd	1,20±0,13 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>bc</sup>	0,27±0,02 <sup>bc</sup>	0,24±0,02 <sup>c</sup>	0,23±0,01 <sup>c</sup>	0,25±0,01 <sup>bc</sup>	0,37±0,01 <sup>b</sup>
Co	0,06±0,03 <sup>c</sup>	1,58±0,05 <sup>a</sup>	0,82±0,34 <sup>b</sup>	0,38±0,14 <sup>bc</sup>	0,21±0,12 <sup>bc</sup>	0,73±0,02 <sup>bc</sup>	1,95±0,26 <sup>a</sup>
Cr	3,09±1,87 <sup>c</sup>	220,70±8,30 <sup>a</sup>	84,72±8,30 <sup>b</sup>	6,00±0,07 <sup>bc</sup>	6,35±1,74 <sup>bc</sup>	66,57±6,97 <sup>bc</sup>	68,03±6,32 <sup>bc</sup>
Cu	9,97±3,29 <sup>b</sup>	9,15±0,71 <sup>b</sup>	12,08±3,25 <sup>b</sup>	6,72±0,49 <sup>b</sup>	7,87±1,73 <sup>b</sup>	9,76±1,16 <sup>b</sup>	29,29±3,05 <sup>a</sup>
Fe	110,17±6,43 <sup>b</sup>	1244,67±7,44 <sup>ab</sup>	1787,44±927,06 <sup>ab</sup>	378,98±29,76 <sup>b</sup>	268,44±150,63 <sup>b</sup>	1197,72±342,18 <sup>ab</sup>	2969,33±455,92 <sup>a</sup>
Li	0,69±0,01 <sup>b</sup>	0,77±0,04 <sup>b</sup>	1,80±0,22 <sup>a</sup>	0,71±0,13 <sup>b</sup>	0,49±0,21 <sup>b</sup>	0,83±0,05 <sup>b</sup>	2,04±0,25 <sup>a</sup>
Mg	1348,15±868,13 <sup>ab</sup>	432,00±73,00 <sup>b</sup>	3270,12±1082,82 <sup>a</sup>	1615,77±161,82 <sup>ab</sup>	905,36±870,63 <sup>ab</sup>	1780,75±46,56 <sup>ab</sup>	2220,45±281,87 <sup>ab</sup>
Mn	8,68±5,03 <sup>b</sup>	21,46±1,45 <sup>ab</sup>	46,23±10,45 <sup>ab</sup>	37,07±2,90 <sup>ab</sup>	23,11±11,47 <sup>ab</sup>	36,83±6,07 <sup>ab</sup>	57,66±16,74 <sup>a</sup>
Mo	2,34±1,88 <sup>a</sup>	2,71±0,09 <sup>a</sup>	1,97±0,23 <sup>a</sup>	0,25±0,05 <sup>a</sup>	0,24±0,01 <sup>a</sup>	2,00±0,22 <sup>a</sup>	1,89±0,19 <sup>a</sup>
Ni	1,56±0,53 <sup>d</sup>	93,71±2,11 <sup>a</sup>	66,70±1,20 <sup>b</sup>	8,01±0,14 <sup>d</sup>	6,06±3,51 <sup>d</sup>	35,08±2,56 <sup>c</sup>	40,05±2,24 <sup>c</sup>
Pb	0,58±0,11 <sup>b</sup>	1,33±0,34 <sup>b</sup>	1,09±0,07 <sup>b</sup>	1,23±0,02 <sup>b</sup>	0,23±0,07 <sup>b</sup>	2,21±0,30 <sup>b</sup>	19,66±4,33 <sup>a</sup>
Sb*	1,92±0,08 <sup>c</sup>	4,11±1,52 <sup>bc</sup>	2,60±0,25 <sup>bc</sup>	2,49±0,22 <sup>bc</sup>	2,41±0,83 <sup>bc</sup>	4,53±0,49 <sup>b</sup>	7,47±1,03 <sup>a</sup>
Se	0,08±0,06 <sup>a</sup>	0,05±0,04 <sup>a</sup>	0,10±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,05 <sup>a</sup>	0,13±0,00 <sup>a</sup>
Sr	4,86±0,73 <sup>c</sup>	2,61±0,21 <sup>c</sup>	34,10±12,17 <sup>a</sup>	28,11±3,52 <sup>ab</sup>	2,11±0,91 <sup>c</sup>	8,44±0,38 <sup>bc</sup>	48,85±1,03 <sup>a</sup>
Ti	8,66±4,38 <sup>c</sup>	7,40±0,86 <sup>c</sup>	35,77±11,41 <sup>b</sup>	18,50±6,43 <sup>bc</sup>	6,53±3,71 <sup>c</sup>	16,22±3,69 <sup>bc</sup>	67,82±5,83 <sup>a</sup>
Tl*	8,30±1,13 <sup>b</sup>	7,93±0,35 <sup>b</sup>	19,90±12,42 <sup>ab</sup>	12,03±2,66 <sup>b</sup>	5,15±1,06 <sup>b</sup>	11,15±0,07 <sup>b</sup>	40,40±3,82 <sup>a</sup>
V	1,51±0,29 <sup>b</sup>	1,71±0,34 <sup>b</sup>	1,81±0,18 <sup>b</sup>	1,67±0,04 <sup>b</sup>	1,53±0,13 <sup>b</sup>	1,74±0,25 <sup>b</sup>	5,20±0,62 <sup>a</sup>
Zn	18,00±5,66 <sup>b</sup>	34,50±2,12 <sup>ab</sup>	29,33±5,69 <sup>b</sup>	19,67±1,53 <sup>b</sup>	14,00±5,66 <sup>b</sup>	37,50±7,78 <sup>ab</sup>	68,00±21,66 <sup>a</sup>

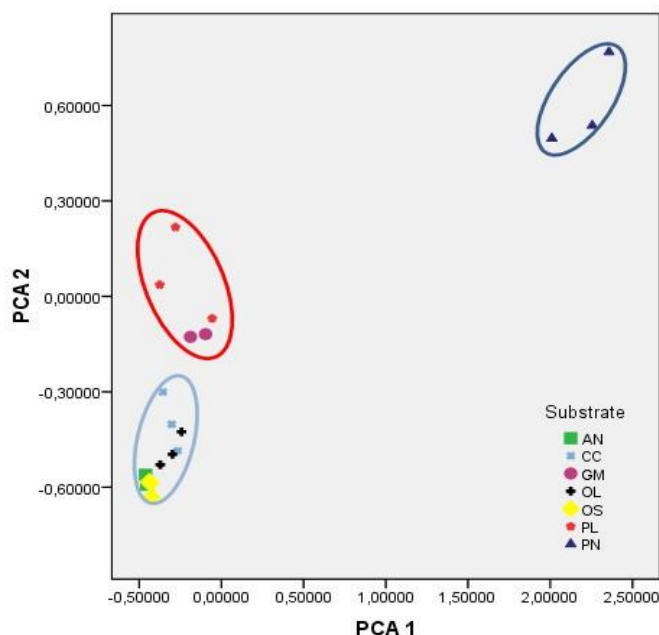
ξης μανιταριών *H. marmoreus*, *F. velutipes* και *P. eryngii* (Lee et al., 2009). Οι τιμές των συγκεντρώσεων παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση, εμφανίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επτά υποστρωμάτων, αποδεικνύοντας ότι η απορρόφηση των μετάλλων εξαρτάται τόσο από το είδους όσο και από το τμήμα του φυτού.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των σπάνιων γαιών (Rare Earth Elements, REEs), έχει αποδειχθεί ότι στον γήινο φλοιό ακολουθούν τον κανόνα των Oddon-Harkin, σύμφωνα με τον οποίο η αφθονία ενός στοιχείου που ανήκει στις σπάνιες γαίες με περιττό ατομικό αριθμό είναι μικρότερη συγκριτικά με το προηγούμενο και το επόμενο στοιχείο με ζυγό ατομικό αριθμό (Cotton, 2006). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τις παρούσας έρευνας (Γράφημα 2.2.1, Πίνακας Π1 [Παράρτημα]) φαίνεται ότι ο εν λόγω κανόνας βρίσκει εφαρμογή και στην περίπτωση των φυτικών ιστών από τους οποίους προήλθαν τα επτά υποστρώματα που αναλύθηκαν. Σύμφωνα με την παραπάνω παρατήρηση αποδεικνύεται ότι στα φυτά δεν απαντάται κάποιος εκλεκτικός μηχανισμός απορρόφησης των REEs και ακολουθούν την ίδια τάση με το έδαφος στο οποίο αναπτύσσονται. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι η συγκέντρωση των σπάνιων γαιών δύναται να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης γεωγραφικής προέλευσης διαφόρων φυτικών προϊόντων, π.χ. φάβα και ντομάτες Σαντορίνης (Drivelos et al., 2014, 2016).

Αναφορικά με την αφθονία των σπάνιων γαιών όπως φαίνεται στην Γράφημα 2.2.1., το στοιχείο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι το Ce ακολουθούμενο κατά σειρά από τα La και Nd, ενώ το στοιχείο με τη μικρότερη συγκέντρωση αποτελεί το Tm. Τα παραπάνω αποτελούν παρατηρήσεις οι οποίες προήλθαν και από τα επτά υποστρώματα που μελετήθηκαν ενώ η ίδια ακριβώς σειρά έχει βρεθεί και σε εδάφη αναφοράς (Govindaraju, 1994). Τα στοιχεία Sc και Y επίσης ανιχνεύτηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υπό εξέταση υποστρώματα σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα μέταλλα τα οποία προσδιορίστηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα. Τα περισσότερα από τα στοιχεία των σπάνιων γαιών παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση στις συγκεντρώσεις τους και για τις περισσότερες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρόμοιο εύρος τιμών στις συγκεντρώσεις των σπάνιων γαιών με αυτές που βρέθηκαν στα υποστρώματα ανάπτυξης των μανιταριών έχουν επίσης προσδιοριστεί σε δασικά δέντρα, πόες και λαχανικά (Bibak et al., 1999, Tyler and Olsson, 2001, 2005). Επιπλέον, σε παλιότερες έρευνες έχει δειχθεί ότι η συγκεντρώσεις τους διαφοροποιούνται μεταξύ διαφορετικών φυτών αλλά και μεταξύ διαφορετικών τμημάτων/οργάνων των φυτών (Liang et al., 2005, Tyler, 2004).



Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το υπόστρωμα που αποτελείται από πευκοβελόνες (PN), του οποίου οι συγκεντρώσεις τόσο των ιχνοστοιχείων όσο και των σπάνιων γαιών ήταν στατιστικά υψηλότερες συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα. Το παραπάνω εύρημα συμφωνεί με παλαιότερες αναφορές για υψηλή βιοσυσσώρευση ιχνοστοιχείων και σπάνιων γαιών στις πευκοβελόνες (Al-Alawi & Mandiwana, 2007, Kord et al., 2010, Lehndorff and Schwark, 2008). Συνεπώς, ο συγκεκριμένος φυτικός ιστός φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη περιβαλλοντικής ρύπανσης από ιχνοστοιχεία ή/και σπάνιες γαίες.



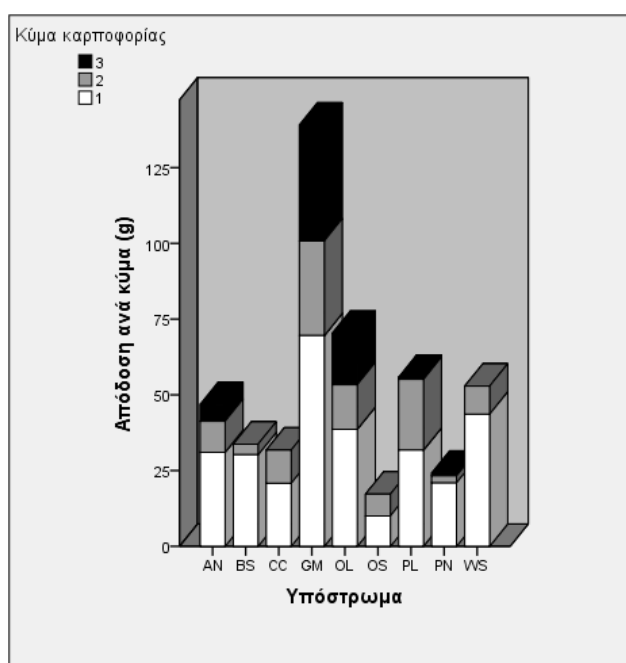
**Γράφημα 2.2.2.** Διάκριση των επτά υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών με ανάλυση πολλαπλών συνιστωσών (PCA) μέσω της χρήσης των συγκεντρώσεων όλων των σπάνιων γαιών που μετρήθηκαν. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, , CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα).

Εξαιρουμένου του PN, τα υπόλοιπα υποστρώματα ανάπτυξης ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των σπάνιων γαιών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCA. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα PL και GM και η δεύτερη τα υπόλοιπα τέσσερα (Γράφημα 2.2.2). Αξίζει να αναφερθεί ότι μεταξύ των συγκεντρώσεων όλων των σπάνιων γαιών εμφανίζεται πολύ υψηλή συσχέτιση ( $r = 0,984 - 1,000$ ,  $p < 0.01$ ) με εξαίρεση το Sc. Παρόμοια συσχέτιση έχει παρατηρηθεί εξάλλου σε πληθώρα περιβαλλοντικών δειγμάτων (Tyler, 2004). Αντίθετα στην περίπτωση των ιχνοστοιχείων παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στις μεταξύ τους συσχετίσεις (από -0,365 έως και 0,981). Τελικά, φαίνεται ότι και στα επτά φυτικά υποστρώματα που εξετάστηκαν δεν υπάρχει κάποιος επιλεκτικός μηχανισμός απορρόφησης σπάνιων γαιών

από το περιβάλλον και ως εκ τούτου δεν παρατηρείται εμπλουτισμός για κάποιο συγκεκριμένο στοιχείο.

### 2.2.3.3 Αξιολόγηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή μανιταριών *P. ostreatus*

Για την αξιολόγηση της καταλληλότητας των υπό μελέτη φυτικών παραπροϊόντων ως υποστρώματα για την παραγωγή μανιταριών του είδους *P. ostreatus*, καταγράφηκαν διάφοροι καλλιεργητικοί παράμετροι που σχετίζονται με την απόδοση σε μανιτάρια και με τη διάρκεια των επιμέρους σταδίων της καλλιέργειας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το διάστημα της επώασης διήρκησε 3-4 εβδομάδες για τα περισσότερα υποστρώματα με εξαίρεση τα PN και OS στα οποία απαιτήθηκε σημαντικά περισσότερος χρόνος (Πίνακας 2.2.6.). Συνολικά, στο επιλεγμένο στέλεχος ο καλλιεργητικός κύκλος διήρκησε 8 εβδομάδες στα υποστρώματα WS και BS, ενώ ξεπέρασε τις 11 εβδομάδες στο OS.



Γράφημα 2.2.3.. Απόδοση (g) ανά κύμα καρποφορίας του *P. ostreatus* ανεπτυγμένο σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου).

Κατά τον υπολογισμό της βιολογικής αποδοτικότητας (BA), το υπόστρωμα GM ήταν μακράν το πιο αποδοτικό (137%) και ακολουθεί το OL (72%), ενώ όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές χωρίς να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους

(Πίνακας 2.2.6.). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανομή της απόδοσης στα “κύματα” καρποφορίας για την οποία σημειώνονται μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων (Γράφημα 2.2.3.). Στο πρώτο “κύμα” παράχθηκε περισσότερο από το 50 % της συνολικής απόδοσης για όλα τα υποστρώματα, ενώ στα πιο αποδοτικά (GM, OL) υψηλή ήταν η συμβολή και του τρίτου “κύματος” στη συνολική απόδοση. Τέλος, τα υποστρώματα WS και BS υποστήριξαν την παραγωγή των μεγαλύτερων σε μέγεθος και βάρος μανιταριών (65 g και 61 g κατά μέσο όρο αντίστοιχα, Πίνακας 2.2.6.).

Το άχυρο σιταριού και διάφορα ροκανίδια ξύλου είναι τα μοναδικά υποστρώματα από αυτά που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα έρευνα, τα οποία έχουν μελετηθεί στο παρελθόν από άλλους ερευνητές ως υποστρώματα για την παραγωγή μανιταριών του είδους *P. ostreatus*. Ωστόσο η BA διαφέρει σημαντικά στα αποτελέσματα των εργασιών, κυμαινόμενη από 4% έως 74% σε διάφορα υπολείμματα ξύλου και από 50% έως 97% σε άχυρο σίτου (Obodai et al, 2003, Philippoussis et al., 2001, Salmones et al., 2005, Zhang et al., 2002). Αξιοσημείωτο είναι πως με τον εμπλουτισμό των παραπάνω υποστρωμάτων η BA δύναται να αυξηθεί σημαντικά (96-139%, Isikhuemhen & Mikiashvili, 2009, Zervakis et al., 2013). Από τα υπόλοιπα υποστρώματα που έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν, τα κλαδέματα της αμπέλου εμπλουτισμένα με στέμφυλα οινοποιίας και τα απόβλητα εκκοκκισμού βάμβακος είναι μεν τα περισσότερο συγγενή με το υπόστρωμα GM, αλλά παρουσίασαν χαμηλότερη BA σε σχέση με την παρούσα εργασία (79% και 117% αντίστοιχα, Philippoussis et al., 2001, Sánchez et al., 2002). Η υψηλές τιμές BA φαίνεται να σχετίζονται με το περιεχόμενο άζωτο στο υπόστρωμα με αποτέλεσμα να παρατηρείται σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους ( $r = 0,700$ ,  $p < 0.05$ , για τα πέντε πιο αποδοτικά υποστρώματα).

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η προσθήκη πλούσιων σε άζωτο οργανικών υλικών αυξάνει την παραγωγή μανιταριών, μέσω της ενίσχυσης της ενεργότητας των ενζύμων λακκάση και υπεροξειδάση εξαρτημένη του Mn (Mikiashvili et al., 2006). Παρομοίως, οι Kurt and Buyukalaca (2010) έδειξαν ότι η απόδοση στο *P. ostreatus* εξαρτάται από τη συγκέντρωση αζώτου στο υπόστρωμα, ενώ παρατήρησαν υψηλότερη ενεργότητα των ενζύμων λακκάση και καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη σε υποστρώματα που περιείχαν αυξημένη δοσολογία αλευριού σίτου. Επιπλέον, πρότειναν ότι η πολύ υψηλή περιεκτικότητα αζώτου (>1,4%) μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης. Όμως ο προσδιορι-

**Πίνακας 2.2.6. Καλλιεργητικοί παράμετροι του *P. ostreatus* κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση, n = 4. Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Υποστρώματα	Πρωιμότητα (ημέρες)	Συνολική καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	Απόδοση 1 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 2 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 3 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Συνολική Απόδοση (g)	BA %	Παραγωγικότητα	Μέσο βάρος μανιταριών (g)
AN	26,7 ± 0,9 <sup>d</sup>	60,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	210,1 ± 8,7 <sup>a</sup>	69,2 ± 21,3 <sup>a</sup>	21,9 ± 6,5 <sup>bc</sup>	301,1 ± 34,5 <sup>ab</sup>	46,9 ± 7,0 <sup>bc</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>bc</sup>	15,9 ± 2,1 <sup>bc</sup>
BS	37,7 ± 0,9 <sup>bc</sup>	53,0 ± 10,0 <sup>a</sup>	109,8 ± 22,6 <sup>abc</sup>	14,1 ± 14,1 <sup>a</sup>	-	123,9 ± 8,6 <sup>bcd</sup>	33,5 ± 2,3 <sup>bc</sup>	0,7 ± 0,3 <sup>bc</sup>	60,5 ± 19,0 <sup>ab</sup>
CC	37,0 ± 2,1 <sup>bc</sup>	61,7 ± 7,5 <sup>a</sup>	73,5 ± 4,4 <sup>bc</sup>	38,6 ± 21,1 <sup>a</sup>	-	112,1 ± 25,4 <sup>cd</sup>	31,7 ± 7,2 <sup>bc</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>bc</sup>	29,5 ± 4,8 <sup>abc</sup>
GM	33,7 ± 0,3 <sup>cd</sup>	67,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	179,1 ± 18,8 <sup>ab</sup>	78,8 ± 21,3 <sup>a</sup>	99,0 ± 6,1 <sup>a</sup>	356,9 ± 37,4 <sup>a</sup>	137,2 ± 14,4 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	15,4 ± 1,9 <sup>bc</sup>
OL	36,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	64,7 ± 2,7 <sup>a</sup>	136,6 ± 16,5 <sup>abc</sup>	51,1 ± 16,6 <sup>a</sup>	62,7 ± 32,0 <sup>ab</sup>	250,4 ± 42,4 <sup>abc</sup>	71,6 ± 12,1 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>bc</sup>	9,8 ± 0,5 <sup>c</sup>
OS	54,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	76,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	60,3 ± 30,3 <sup>c</sup>	44,7 ± 31,5 <sup>a</sup>	-	105,0 ± 61,7 <sup>cd</sup>	18,8 ± 11,0 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,3 <sup>bc</sup>	12,6 ± 4,1 <sup>bc</sup>
PL	30,3 ± 1,2 <sup>cd</sup>	70,0 ± 7,0 <sup>a</sup>	121,7 ± 7,5 <sup>abc</sup>	89,3 ± 14,8 <sup>a</sup>	2,8 ± 1,7 <sup>c</sup>	213,8 ± 19,9 <sup>abcd</sup>	55,7 ± 5,2 <sup>bc</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	16,3 ± 2,0 <sup>abc</sup>
PN	45,7 ± 3,7 <sup>ab</sup>	68,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	57,4 ± 26,8 <sup>c</sup>	6,5 ± 6,5 <sup>a</sup>	2,6 ± 2,6 <sup>c</sup>	66,5 ± 25,4 <sup>d</sup>	24,7 ± 9,4 <sup>bc</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	22,6 ± 8,6 <sup>abc</sup>
WS	39,0 ± 2,0 <sup>bc</sup>	51,7 ± 9,5 <sup>a</sup>	99,1 ± 34,7 <sup>abc</sup>	20,0 ± 20,0 <sup>a</sup>	-	119,0 ± 27,0 <sup>cd</sup>	52,6 ± 11,9 <sup>bc</sup>	1,1 ± 0,5 <sup>bc</sup>	65,0 ± 17,5 <sup>a</sup>

σμός της άριστης συγκέντρωσης αζώτου στο υπόστρωμα καλλιέργειας δεν είναι εύκολος όπως αποδεικνύεται και από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας (τα πιο αποδοτικά υποστρώματα περιείχαν 1,7-2,3% N) και η απόδοση εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, π.χ. από τη διαθεσιμότητα (όχι μόνο η παρουσία) θρεπτικών, ο σχηματισμός δυνητικά ανασταλτικών της μυκητιακής αύξησης πτητικών ουσιών (αμμωνία), την αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του υποστρώματος, την πιθανή παρουσία τοξικών συστατικών, κ.α. Επιπλέον η χρήση εύκολα αφομοιώσιμων μορφών θρεπτικών συστατικών ανατρέπει σε σημαντικό βαθμό το ανταγωνιστικό/εκλεκτικό πλεονέκτημα ενός τυπικού λιγνοκυτταρινούχου υποστρώματος, όπως έχει αποδειχθεί τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε εμπορική κλίμακα (Altieri et al., 2009, Zervakis et al., 2013).

Η παραγωγικότητα αποτελεί μια παράμετρο στην οποία συνυπολογίζονται η πρωιμότητα, η διάρκεια της παραγωγικής περιόδου καθώς και η βιολογική αποδοτικότητα καθιστώντας την ιδανική για την εκτίμηση της καλλιεργητικής διαδικασίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στο υπόστρωμα GM παρουσιάστηκε η μέγιστη τιμή (2,05 ημέρες<sup>-1</sup>), επιβεβαιώνοντας την υπεροχή του, αφού διαφέρει σημαντικά από όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα (Πίνακας 2.2.6.). Επιπλέον τα PL και WS ήταν ελαφρώς καλύτερα από τα AN, BS και OL, ενώ σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της παραγωγικότητας και της BA ( $r = 0,850, p < 0,05$ ) καθώς επίσης και της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε πρωτεΐνες ( $r = 0,833, p < 0,05$ ). Στη μοναδική εργασία στην οποία έχει υπολογιστεί ο όρος παραγωγικότητα στο είδος *P. ostreatus* (Curvetto et al., 2002), αναφέρεται τιμή από 1,2 έως 3,0 ημέρες<sup>-1</sup> σε υποστρώματα από κελύφη σπόρων ηλίανθου εμπλουτισμένων με τη βέλτιστη συγκέντρωση αμμωνίου και μαγγανίου.

Όσον αφορά την επίδραση των επιμέρους συστατικών των υποστρωμάτων στις καλλιεργητικές παραμέτρους, υψηλή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ λιγνίνης και BA για τα πέντε πιο αποδοτικά υποστρώματα ( $r = 0,906, p < 0,01$ ) και αρνητική μεταξύ ολικών ινωδών, ημικυτταρίνης και ολικών υδατανθράκων με τη BA ( $r = 0,637, r = 0,600$  και  $r = 0,808, p < 0,05$  αντίστοιχα). Παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν όταν η απόδοση του *P. ostreatus* συσχετίστηκε με τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη σε άλλα υποστρώματα (Obodai et al., 2003). Ως εκ τούτου, βελτιωμένη BA και παραγωγικότητα συνδέεται με υποστρώματα που περιέχουν υψηλή συγκέντρωσή μετάλλων και αζώτου (κυρίως σε οργανική μορφή). Επιπλέον, σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα ημικυτταρίνης σε συνδυασμό με υψηλή σε λιγνίνη προκαλεί σημαντική αύξηση στην ενεργότητα λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων ειδικά όταν

Πίνακας 2.2.7. Επιλεγμένα συστατικά των εννέα εξαντλημένων υποστρωμάτων (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου) μετά την καλλιέργεια μανιταριών *P. ostreatus*. Οι τιμές (% , ξ.β.) παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

	AN	BS	CC	GM	OL	OS	PL	PN	WS
N	0,5 ± 0,1 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>d</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,2 ± 0,0 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>ab</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>d</sup>
K	72 ± 11 <sup>d</sup>	-	424 ± 23 <sup>cd</sup>	1057 ± 63 <sup>ab</sup>	758 ± 32 <sup>bc</sup>	1164 ± 182 <sup>a</sup>	1328 ± 80 <sup>a</sup>	307 ± 1 <sup>d</sup>	364 ± 12 <sup>d</sup>
Na	-	2,1 ± 0,4 <sup>d</sup>	12,8 ± 2,0 <sup>bcd</sup>	43,6 ± 4,0 <sup>a</sup>	27,0 ± 4,0 <sup>b</sup>	21,4 ± 3,8 <sup>bc</sup>	52,6 ± 4,5 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,7 <sup>cd</sup>	14,2 ± 0,7 <sup>bcd</sup>
P	46,8 ± 9,5 <sup>e</sup>	39,5 ± 2,5 <sup>e</sup>	62,3 ± 13,8 <sup>de</sup>	193,3 ± 4,2 <sup>b</sup>	90,9 ± 3,9 <sup>cd</sup>	74,1 ± 0,4 <sup>de</sup>	121,8 ± 3,4 <sup>c</sup>	288,8 ± 11,7 <sup>a</sup>	66,9 ± 11,6 <sup>de</sup>
Τέφρα	1,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,8 ± 0,0 <sup>c</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	12,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	14,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	15,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	28,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	13,0 ± 0,9 <sup>b</sup>
Ολικές πρωτεΐνες	3,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	17,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,8 <sup>ab</sup>	6,6 ± 0,4 <sup>bc</sup>	7,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	14,2 ± 1,0 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,6 <sup>bc</sup>
Ολικά λιπίδια	3,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>ab</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>bc</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,2 <sup>ab</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>bc</sup>
Ολικοί υδατάνθρακες	91,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	97,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	93,3 ± 0,2 <sup>ab</sup>	75,2 ± 0,9 <sup>c</sup>	74,6 ± 1,1 <sup>c</sup>	78,9 ± 0,3 <sup>c</sup>	77,7 ± 0,6 <sup>c</sup>	68,4 ± 1,3 <sup>d</sup>	68,6 ± 1,3 <sup>d</sup>
Ινώδη συστατικά	41,0 ± 0,8 <sup>b</sup>	50,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	36,7 ± 0,9 <sup>bc</sup>	23,2 ± 1,2 <sup>e</sup>	25,2 ± 0,8 <sup>de</sup>	49,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	31,5 ± 1,5 <sup>cd</sup>	11,6 ± 0,5 <sup>f</sup>	32,9 ± 1,8 <sup>c</sup>
Ημικυτταρίνη	18,4 ± 1,7 <sup>abc</sup>	22,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,7 ± 0,7 <sup>ab</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>ef</sup>	8,8 ± 0,8 <sup>de</sup>	15,8 ± 0,9 <sup>bc</sup>	14,3 ± 0,8 <sup>de</sup>	1,1 ± 0,7 <sup>f</sup>	12,9 ± 2,5 <sup>cd</sup>
Κυτταρίνη	28,8 ± 5,2 <sup>bc</sup>	48,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	46,1 ± 0,36 <sup>a</sup>	11,3 ± 1,6 <sup>de</sup>	12,7 ± 1,1 <sup>de</sup>	20,4 ± 1,5 <sup>cd</sup>	26,9 ± 2,5 <sup>c</sup>	3,9 ± 0,4 <sup>e</sup>	39,3 ± 1,7 <sup>ab</sup>
Λιγνίνη	16,6 ± 1,8 <sup>cd</sup>	11,0 ± 0,4 <sup>de</sup>	6,1 ± 0,2 <sup>e</sup>	39,8 ± 2,4 <sup>a</sup>	18,3 ± 0,9 <sup>bc</sup>	21,0 ± 0,4 <sup>bc</sup>	14,7 ± 1,5 <sup>cd</sup>	23,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	7,4 ± 1,0 <sup>e</sup>
Μυκηλιακή βιομάζα	148,3 ± 4,3 <sup>ab</sup>	159 ± 21,3 <sup>a</sup>	157,4 ± 19,2 <sup>ab</sup>	86,9 ± 13,1 <sup>d</sup>	103,3 ± 14,8 <sup>cd</sup>	93,1 ± 8,2 <sup>d</sup>	140 ± 15,9 <sup>abc</sup>	114,9 ± 10,8 <sup>bcd</sup>	136,9 ± 14,9 <sup>abc</sup>

τα υπόλοιπα εύκολα αποδομήσιμα συστατικά (υδατάνθρακες, λιπίδια) δεν βρίσκονται σε αφθονία.

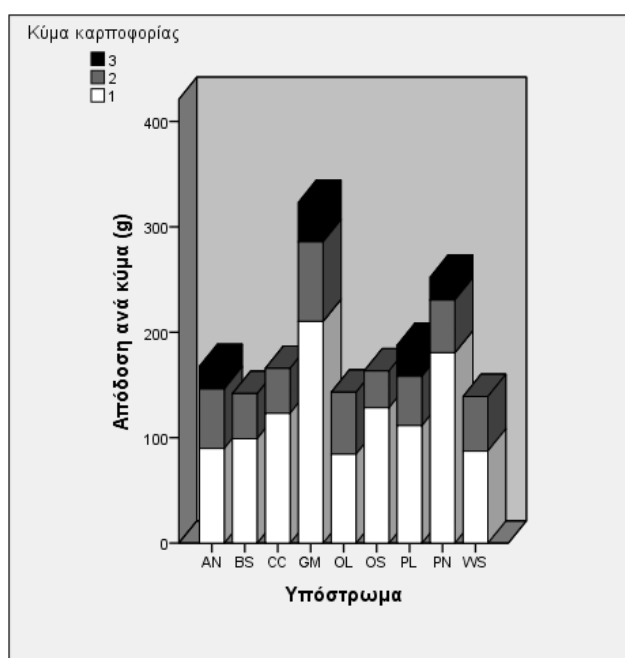
Η προαναφερθείσα μείωση της κυτταρίνης και ειδικά της (πιο εύκολα αποδομήσιμης) ημικυτταρίνης σε σχέση με τη λιγνίνη φαίνεται να συμβαίνει όχι μόνο σε εξαντλημένα υποστρώματα με κύριο συστατικό το άχυρο ή το κέλυφος βαμβακόσπορου (Isikhuemhen et al., 2009; Li et al., 2001), αλλά και σε υποστρώματα αποτελούμενα από διαφορετικές πρώτες ύλες. Η εκτεταμένη διάσπαση της κυτταρίνης και ιδιαίτερα της ημικυτταρίνης συγκριτικά με τη χαμηλή αποδόμηση της λιγνίνης φαίνεται να αποτελεί τον κανόνα στη μεταξύ των υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν στην παρούσα έρευνα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αφθονία ημικυτταρίνης και κυτταρίνης στο αρχικό υπόστρωμα συσχετίστηκε με τη χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη στο εξαντλημένο υπόστρωμα και αντίστροφα ( $r = 0,700 - 0,933, p < 0,05$ ).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα συστατικά του εξαντλημένου υποστρώματος, οι ολικές πρωτεΐνες διέφεραν σημαντικά (από 1-3% στα AN, BS και WS έως 10-17% στα GM, OL και PN). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της περιεκτικότητας των ολικών υδατανθράκων στο αρχικό και τελικό υπόστρωμα με εξαίρεση αυτό που αποτελούνταν από άχυρο (WS). Τέλος, τα ολικά λιπίδια στο εξαντλημένο υπόστρωμα εμφάνισαν κατά κανόνα τιμές μικρότερες του αρχικού, ενώ μεγάλη διακύμανση παρατηρήθηκε στις τιμές της περιεχόμενης τέφρας (Πίνακας 2.2.7.).

#### 2.2.3.4 Αξιολόγηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή μανιταριών *C. cylindracea*

Το πρώτο χρονικά στάδιο (δηλαδή ο αποικισμός του υποστρώματος από τις μυκηλιακές υφές) απαίτησε 4 – 5 εβδομάδες, ενώ η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας διήρκησε 73-79 ημέρες σε όλα τα υποστρώματα (Πίνακας 2.2.8.). Ο υπολογισμός της βιολογικής αποδοτικότητας, απέδειξε -όπως και στην περίπτωση του *P. ostreatus*- ότι το υπόστρωμα GM ήταν μακράν το αποδοτικότερο (128%) ακολουθούμενο από το PN (94%), ενώ με εξαίρεση τα OS και AN όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα έδειξαν ικανοποιητικές αποδόσεις (Πίνακας 2.2.8.). Τα περισσότερα από τα υποστρώματα ολοκλήρωσαν τον καλλιεργητικό κύκλο με την παραγωγή δύο κυμάτων καρποφορίας. Συνολικά το 59 – 79% της απόδοσης προήλθε από το πρώτο κύμα (Γράφημα 2.2.4.). Όσον αφορά το μέσο βάρος των μανιταριών εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων

υποστρωμάτων και συγκριτικά μεγαλύτερο ήταν το μέγεθος αυτών που αναπτύχθηκαν σε παραπροϊόντα ελαιουργίας και ελαιοκομίας (OL και OS, Πίνακας 2.2.8.). Σε προηγούμενες εργασίες η χρησιμοποίηση αχύρου εμπλουτισμένου με αλεύρι σόγιας, κοπριά πουλερικών ή απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων οδήγησε σε τιμές βιολογικής αποδοτικότητας 97 – 179% (Isikhuemhen et al., 2009, Uhart et al., 2008, Zervakis et al., 2013), οι οποίες ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές σε πριονίδι ιτιάς και άχυρο σίτου (4 – 31%, Uhart et al., 2008) ή σε άχυρο εμπλουτισμένο με μικρότερο ποσοστό πίτουρου (48–61%, Philiproussis et al., 2001). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας σύμφωνα με τα οποία υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της BA και της περιεκτικότητας αζώτου του υποστρώματος ( $r = 0,700$ ,  $p < 0,05$ ).



**Γράφημα 2.2.4.** Απόδοση (g) ανά κύμα καρποφορίας του *C. cylindracea* ανεπτυγμένο σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οينوποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου).

Κατά τον υπολογισμό της παραγωγικότητας, όπου συνεκτιμάται η BA και το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την παραγωγή των μανιταριών, το υπόστρωμα GM επιβεβαίωσε την υπεροχή του έναντι όλων των υπολοίπων (1,6 στο GM έναντι 0,3 – 1,2 σε όλα τα υπόλοιπα, Πίνακας 2.2.8.), ενώ αξιοσημείωτη ήταν και η τιμή της παραγωγικότητας για το υπόστρωμα PN (1,2) σε σχέση με το συμβατικό (WS: 0,8).



Πίνακας 2.2.8. Καλλιεργητικοί παράμετροι του *C. cylindracea* κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Υποστρώματα	Πρωιμότητα (ημέρες)	Συνολική καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	Απόδοση 1 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 2 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 3 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Συνολική Απόδοση (g)	BA %	Παραγωγικότητα	Μέσο βάρος μανιταριών (g)
AN	41,7 ± 0,9 <sup>Ab</sup>	76,3 ± 3,2 <sup>Aa</sup>	89,7 ± 18,0 <sup>ABb</sup>	56,4 ± 8,4 <sup>Aa</sup>	21,6 ± 15,2 <sup>Aa</sup>	167,7 ± 24,8 <sup>Abc</sup>	26,2 ± 4,2 <sup>Ad</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>d</sup>	3,7 ± 0,4 <sup>Ba</sup>
BS	37,7 ± 0,7 <sup>Ab</sup>	76,7 ± 0,9 <sup>Aa</sup>	99,1 ± 27,5 <sup>Ab</sup>	42,7 ± 9,6 <sup>Aa</sup>	-	141,7 ± 20,7 <sup>Ac</sup>	38,3 ± 5,6 <sup>AcD</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>de</sup>	3,9 ± 1,0 <sup>Ba</sup>
CC	37,7 ± 2,2 <sup>Ab</sup>	75,0 ± 6 <sup>Aa</sup>	123,1 ± 18,4 <sup>Aab</sup>	42,7 ± 16,4 <sup>Aa</sup>	-	165,7 ± 2,2 <sup>Abc</sup>	46,8 ± 0,6 <sup>AcD</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>cde</sup>	4,0 ± 0,5 <sup>Ba</sup>
GM	42,7 ± 1,2 <sup>Ab</sup>	79,0 ± 1,2 <sup>Aa</sup>	210,4 ± 36,9 <sup>Aa</sup>	75,4 ± 21,9 <sup>Aa</sup>	37,4 ± 1,3 <sup>Ba</sup>	323,2 ± 17,1 <sup>Aa</sup>	128,1 ± 5,0 <sup>Aa</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,9 <sup>Ba</sup>
OL	44,7 ± 5,4 <sup>Ab</sup>	75,0 ± 1,2 <sup>Aa</sup>	84,4 ± 19,6 <sup>Ab</sup>	58,7 ± 30,0 <sup>Aa</sup>	-	143,1 ± 17,1 <sup>Ac</sup>	40,9 ± 4,9 <sup>AcD</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>cde</sup>	9,3 ± 4,7 <sup>Aa</sup>
OS	62,0 ± 5,5 <sup>Aa</sup>	75,3 ± 4,7 <sup>Aa</sup>	128,3 ± 5,1 <sup>Aab</sup>	35,0 ± 35,0 <sup>Aa</sup>	-	163,3 ± 32,1 <sup>Abc</sup>	29,2 ± 5,7 <sup>Ad</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>d</sup>	7,9 ± 1,5 <sup>Aa</sup>
PL	38,3 ± 1,7 <sup>Ab</sup>	70,0 ± 4,6 <sup>Aa</sup>	111,4 ± 11,6 <sup>Aab</sup>	46,7 ± 11,0 <sup>Aa</sup>	29,7 ± 16,3 <sup>Aa</sup>	187,8 ± 11,3 <sup>Abc</sup>	52,4 ± 6,3 <sup>AcD</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>cd</sup>	2,6 ± 0,5 <sup>Ba</sup>
PN	36,3 ± 0,3 <sup>Ab</sup>	75,7 ± 2,2 <sup>Aa</sup>	180,6 ± 22,2 <sup>Aab</sup>	49,9 ± 9,1 <sup>Aa</sup>	21,7 ± 3,9 <sup>Aa</sup>	252,3 ± 10,4 <sup>Aab</sup>	93,5 ± 3,9 <sup>Ab</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,4 ± 1,2 <sup>Ba</sup>
WS	39,7 ± 0,3 <sup>Ab</sup>	73,0 ± 3,1 <sup>Aa</sup>	87,3 ± 10,4 <sup>Ab</sup>	51,7 ± 8,6 <sup>Aa</sup>	-	139,0 ± 15,9 <sup>Ac</sup>	61,4 ± 7,0 <sup>Ac</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	3,5 ± 0,7 <sup>Aa</sup>

Επιπλέον, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της παραγωγικότητας και της ΒΑ ( $r = 0,850, p < 0,05$ ) αλλά και μεταξύ παραγωγικότητας και πρωτεϊνικού περιεχομένου του υποστρώματος ( $r = 0,833, p < 0,05$ ).

Αναφορικά με την επίδραση των επιμέρους συστατικών του υποστρώματος στις καλλιεργητικές παραμέτρους ακολουθήθηκε παρόμοια τάση με αυτή που διαπιστώθηκε στο *P. ostreatus*. Ειδικότερα, στο *C. cylindracea* παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της ΒΑ με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λιγνίνη ( $r = 0,800, p < 0,05$ , στο *P. ostreatus* έφτασε το 0,906) και αρνητική με την ημικυτταρίνη και τους ολικούς υδατάνθρακες ( $r = -0,500$  έως  $-0,637$  και αντίστοιχα  $r = -0,590$  έως  $-0,600$  στο *P. ostreatus*.)

Μέσω των μεταβολικών διεργασιών των μυκήτων επέρχεται μείωση στο βάρος του εκάστοτε υποστρώματος (περίπου 35 - 50%), ενώ σημαντική είναι και η διαφοροποίηση στη σύσταση του συγκριτικά με το αρχικό υλικό. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του *C. cylindracea* σημειώθηκε μεγάλη μείωση στα ολικά ινώδη συστατικά η οποία οφείλεται κυρίως στη μείωση της ημικυτταρίνης (Γράφημα 2.2.5.). Οι διαφορές μεταξύ αρχικών και τελικών υποστρωμάτων ήταν αρκετά μικρότερες για την κυτταρίνη με εξαίρεση το υπόστρωμα PL (μείωση κατά 28%), ενώ ακόμη και στα υποστρώματα που εμφάνισαν μεγάλη απόδοση, η μείωση ήταν ελάχιστη και συγκριτικά μικρότερη από αυτή στο *P. ostreatus*. Αξίζει να αναφερθεί ότι σχετικά μεγαλύτερη μείωση των ινωδών συστατικών παρατηρήθηκε στα λιγότερο αποδοτικά υποστρώματα, ενώ στο GM παρατηρήθηκε η μικρότερη μείωση στη λιγνίνη από οποιαδήποτε άλλο υπόστρωμα (Γράφημα 2.2.5, Πίνακας 2.2.9.). Εκτός από τα υπό εξέταση υποστρώματα, ανάλογη μείωση έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν και σε εξαντλημένο υπόστρωμα αποτελούμενο από άχυρο σίτου ή φλοιό βαμβακόσπορου μετά την καλλιέργεια του *C. cylindracea* (Isikhuemhen et al., 2009). Η αφθονία της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης στο αρχικό υπόστρωμα συνδέεται με χαμηλή περιεκτικότητα λιγνίνης στο τελικό υπόστρωμα και αντιστρόφως, ενώ χαρακτηρίζεται από αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους ( $r = 0,817 - 0,933, p < 0,05$ ). Όσον αφορά τα υπόλοιπα συστατικά των εξαντλημένων υποστρωμάτων, μεγάλη παραλλακτικότητα εμφανίστηκε στις ολικές πρωτεΐνες (από 1,1 στο BS μέχρι και 15,2 στο GM) και μεγάλη μείωση σημειώθηκε στην περίπτωση των ολικών λιπιδίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η περιεκτικότητα του αρχικού υποστρώματος σε πρωτεΐνες, λιπίδια και τέφρα συσχετίζεται σημαντικά (αρνητικά) με την ημικυτταρίνη και κυτταρίνη στο τελικό υπόστρωμα και θετικά με την λιγνίνη.

Πίνακας 2.2.9. Επιλεγμένα συστατικά των εννέα εξαντλημένων υποστρωμάτων (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιός, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποίησης και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιотριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου) μετά την καλλιέργεια μανιταριών *C. cylindracea*. Οι τιμές (% ξ.β.) παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

	AN	BS	CC	GM	OL	OS	PL	PN	WS
N	0,4 ± 0,0 <sup>EA</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>EA</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>EA</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>AA</sup>	2,0 ± 0,0 <sup>abA</sup>	1,2 ± 0,0 <sup>cdA</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>dA</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>bcB</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>EB</sup>
K	55 ± 6,2 <sup>CA</sup>	nd	168 ± 73 <sup>CB</sup>	976 ± 107 <sup>AA</sup>	727 ± 33 <sup>abA</sup>	611 ± 74 <sup>BB</sup>	872 ± 52 <sup>abB</sup>	nd	43 ± 11 <sup>CB</sup>
Na	nd	nd	2,1 ± 0,2 <sup>CB</sup>	37,8 ± 5,3 <sup>AA</sup>	24,2 ± 0,7 <sup>bA</sup>	18,5 ± 2,7 <sup>bA</sup>	29,6 ± 3,0 <sup>abB</sup>	nd	nd
P	16,4 ± 2,4 <sup>dB</sup>	30,3 ± 0,2 <sup>dB</sup>	23,5 ± 4,5 <sup>dB</sup>	162,6 ± 3,1 <sup>AB</sup>	82,3 ± 4,5 <sup>bA</sup>	48,4 ± 5,3 <sup>cdB</sup>	78,0 ± 14,2 <sup>bcB</sup>	164,6 ± 9,5 <sup>AB</sup>	23,8 ± 1,8 <sup>dB</sup>
Τέφρα	2,0 ± 0,0 <sup>dA</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>dA</sup>	3,4 ± 0,5 <sup>dA</sup>	10,6 ± 1,0 <sup>bcA</sup>	12,9 ± 0,2 <sup>bB</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>dA</sup>	10,9 ± 0,5 <sup>bcB</sup>	25,2 ± 1,1 <sup>AA</sup>	8,6 ± 0,2 <sup>CB</sup>
Ολικές πρωτεΐνες	2,8 ± 0,1 <sup>EA</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>EA</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>EA</sup>	15,2 ± 0,4 <sup>AA</sup>	12,6 ± 0,2 <sup>abA</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>cdA</sup>	6,2 ± 0,6 <sup>dA</sup>	9,9 ± 1,5 <sup>bcB</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>dB</sup>
Ολικά λιπίδια	1,6 ± 0,5 <sup>abcB</sup>	nd	0,6 ± 0,0 <sup>bcA</sup>	3,1 ± 0,4 <sup>AA</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>bcA</sup>	1,3 ± 0,7 <sup>bcA</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>CA</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>abcB</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>CA</sup>
Ολικοί υδατάνθρακες	93,7 ± 0,6 <sup>abA</sup>	97,0 ± 0,5 <sup>AA</sup>	93,3 ± 0,6 <sup>bA</sup>	71,1 ± 0,4 <sup>EA</sup>	72,5 ± 0,4 <sup>EA</sup>	87,3 ± 1,0 <sup>CA</sup>	82,8 ± 0,6 <sup>dA</sup>	63,3 ± 1,2 <sup>fA</sup>	89,6 ± 0,4 <sup>CA</sup>
Ινώδη συστατικά	43,6 ± 1,0 <sup>bcA</sup>	57,8 ± 0,4 <sup>AA</sup>	35,9 ± 0,8 <sup>cdeA</sup>	28,5 ± 0,7 <sup>efA</sup>	27,4 ± 1,2 <sup>fA</sup>	47,6 ± 3,4 <sup>bA</sup>	32,9 ± 1,3 <sup>defA</sup>	26,4 ± 1,6 <sup>fA</sup>	40,4 ± 0,2 <sup>bcdA</sup>
Ημικυτταρίνη	18,5 ± 1,1 <sup>dA</sup>	24,4 ± 0,3 <sup>bcA</sup>	34,0 ± 0,8 <sup>AA</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>fA</sup>	10,2 ± 2,4 <sup>efA</sup>	15,8 ± 0,3 <sup>deA</sup>	19,1 ± 1,0 <sup>cdA</sup>	5,1 ± 1,3 <sup>fA</sup>	28,6 ± 0,4 <sup>abA</sup>
Κυτταρίνη	28,1 ± 2,3 <sup>CA</sup>	46,7 ± 0,3 <sup>AA</sup>	36,8 ± 0,8 <sup>BB</sup>	21,7 ± 0,9 <sup>deA</sup>	16,4 ± 0,4 <sup>efA</sup>	19,0 ± 0,3 <sup>efA</sup>	26,3 ± 2,2 <sup>cdA</sup>	15,4 ± 1,0 <sup>fA</sup>	35,6 ± 0,3 <sup>bB</sup>
Λιγνίνη	15,2 ± 2,3 <sup>bA</sup>	15,0 ± 0,1 <sup>bA</sup>	6,9 ± 0,1 <sup>CA</sup>	38,4 ± 2,4 <sup>AA</sup>	21,6 ± 1,8 <sup>bA</sup>	21,9 ± 1,0 <sup>bA</sup>	20,2 ± 0,8 <sup>bA</sup>	31,4 ± 1,1 <sup>AA</sup>	14,7 ± 0,4 <sup>bA</sup>
Μυκηλιακή βιομάζα	114,8 ± 16,0 <sup>bcdB</sup>	135,2 ± 4,8 <sup>abB</sup>	125,7 ± 18,6 <sup>abcdA</sup>	104,8 ± 2,6 <sup>bcA</sup>	134,5 ± 4,3 <sup>abcA</sup>	101,3 ± 6,6 <sup>dA</sup>	152,4 ± 2,1 <sup>AA</sup>	139,8 ± 13,3 <sup>abA</sup>	98,0 ± 3,9 <sup>dB</sup>

Σημαντική επίσης μείωση καταγράφηκε στη συγκέντρωση καλίου και νατρίου στα τελικά υποστρώματα σε σχέση με το *P. ostreatus*, κάτι που μπορεί να εξηγηθεί μέσω της μεγαλύτερης απορρόφησης στις καρποφορίες (όπως προκύπτει από τις συγκρίσεις των μανιταριών των δύο ειδών).

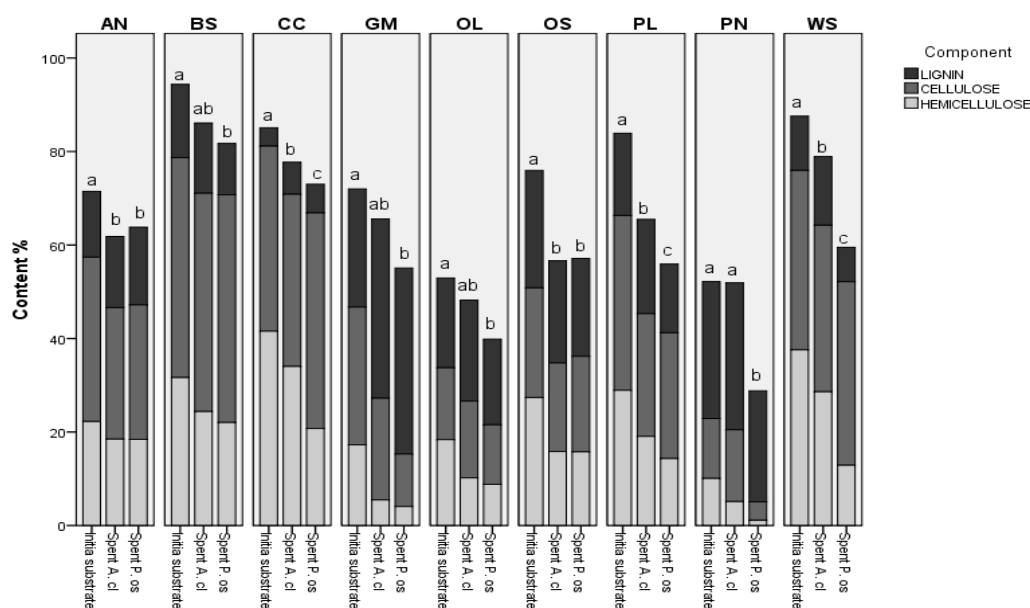
Η μυκηλιακή βιομάζα κυμάνθηκε από 98 – 101 mg g<sup>-1</sup> (στα WS και OS) έως και 152 mg g<sup>-1</sup> χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα περισσότερα από τα υποστρώματα. Επιπροσθέτως, το βάρος της μυκηλιακής βιομάζας στο εξαντλημένο υπόστρωμα παρουσίασε αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τις τιμές της παραγωγικότητας ( $r = 0,700, p < 0,05$ ).

Αντίστοιχη μείωση στα ινώδη συστατικά έχει καταγραφεί και σε υπόστρωμα αποτελούμενο από άχυρο και κοπριά πουλερικών και αποδείχθηκε ότι οφείλεται στη δράση κυτταρινολυτικών ενζύμων όπως οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες, ενώ η μειωμένη αποδόμηση της λιγνίνης συνδέθηκε με χαμηλή παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων όπως η λακκάση και οι υπεροξειδάσες (Isikhuemhen et al., 2009).

#### 2.2.3.5 Αξιολόγηση των εξαντλημένων υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών

Στα εξαντλημένα υποστρώματα μεγάλο μέρος της μάζας έχει βιομετατραπεί ή σε μυκηλιακή βιομάζα είτε σε CO<sub>2</sub> (περίπου 30-50% αναλόγως της φύσης του υλικού) μέσω μεταβολικών διεργασιών, παραγωγής μανιταριών και εξάτμισης του νερού. Πιο συγκεκριμένα υψηλή μείωση σημειώθηκε τόσο στα ολικά ινώδη συστατικά όσο και σε κάθε ένα από αυτά (Γράφημα 2.2.5.), όπως για παράδειγμα η ημικυτταρίνη (τελική περιεκτικότητα 1-16%) στα υποστρώματα PN, GM, OL και OS. Σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν επίσης στην περίπτωση της κυτταρίνης και ειδικά στα υποστρώματα που η απόδοση ήταν ικανοποιητική (π.χ. 28% στο PL), ενώ η μείωση της λιγνίνης ήταν σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με τα προηγούμενα δύο. Είναι αξιοσημείωτο ότι η μεγαλύτερη μείωση στη λιγνίνη παρατηρήθηκε σε υποστρώματα που δεν ήταν αποδοτικά, ενώ στην περίπτωση του GM παρατηρήθηκε η μικρότερη σχετική μείωση (Πίνακας 2.2.9., Γράφημα 2.2.5). Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα των αρχικών υποστρωμάτων σε ολικές πρωτεΐνες, λιπίδια και τέφρα εμφανίζει σημαντική αρνητική συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη και κυτταρίνη στα εξαντλημένα υποστρώματα. Αντίθετα, θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των τριών προαναφερθέντων συστατικών και της λιγνίνης. Τέλος, όσον αφορά την

συγκέντρωση των μακροστοιχείων που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε μείωση του καλίου και του νατρίου στα τελικά υποστρώματα σε σχέση με τα αρχικά υλικά (Πίνακας 2.2.9).



**Γράφημα 2.2.5.** Περιεκτικότητα ημικυτταρίνης, κυτταρίνης και λιγνίνης των αρχικών και των εξαντλημένων υποστρωμάτων μετά την καλλιέργεια των *P. ostreatus* και *C. cylindracea*. Τα πεζά γράμματα αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές για τις συγκρίσεις των μέσων όρων (Duncan's *t* test,  $p < 0,05$ ) των ολικών ινωδών συστατικών μεταξύ του αρχικού και των εξαντλημένων υποστρωμάτων.

Το ποσοστό της μυκηλιακής βιομάζας που απέμεινε στα εξαντλημένα υποστρώματα, κυμάνθηκε από 87 και 93 mg g<sup>-1</sup> στα GM και OS αντίστοιχα έως 159 mg g<sup>-1</sup> στο BS (Πίνακας 2.2.9). Η υπολειμματική βιομάζα βρέθηκε να εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την παραγωγικότητα ( $r = 0,849$ ,  $p < 0,05$ ) και θετική με την πρωιμότητα ( $r = 0,837$ ,  $p < 0,05$ ).

Εάν υπολογιστεί η μυκηλιακή πρωτεΐνη (Paraspyridi et al., 2010), τότε μόνο από τις μυκηλιακές υφές παρέχονται 12-23 mg πρωτεΐνης για κάθε g εξαντλημένου υποστρώματος. Η ποσότητα αυτή είναι αποφασιστική για την περαιτέρω αξιοποίηση των εν λόγω υλικών, ενώ η υψηλή συγκέντρωση σε οργανικό άζωτο και μέταλλα και η μειωμένη περιεκτικότητα σε ινώδη συστατικά συμβάλλουν ουσιαστικά στην επιλογή των υλικών αυτών για την σίτιση οικόσιτων ζώων (Adamonίς et al., 1998). Αύξηση των δύο πρώτων παρατηρήθηκε σε πολλά από τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (π.χ. PN, PL, OL και GM). Η περιεκτικότητα των ολικών ινωδών συστατικών ήταν αρκετά χαμηλή στα προαναφερθέντα υποστρώματα, ενώ το ποσοστό της λιγνίνης κυμάνθηκε από 16% έως και 26% (και 43% στην περίπτωση του υποστρώματος GM).

### 2.2.3.6 Βασική σύσταση μανιταριών *P. ostreatus*

Οι αναλύσεις της βασικής σύστασης των μανιταριών *P. ostreatus* παρουσίασαν μεταβολές των τιμών ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος (Πίνακας 2.2.10.). Η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες ήταν 31% (επί ξ.β.) στα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα AN (σημαντικά υψηλότερη από όλα τα υπόλοιπα), ενώ σχετικά υψηλή ήταν και σε αυτά που αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα PN, OS και OL (20-23%). Αξίζει να σημειωθεί το σχετικά μεγάλο εύρος στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο το οποίο παρατηρήθηκε σε άλλα υποστρώματα βασισμένα σε πριονίδια ξύλου (11-21%) σε αντίθεση με το στενό εύρος τιμών (16-18%) σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα αχύρου σιτηρών (Badu et al., 2011, Dundar et al., 2009), δηλαδή αποτελεσμάτα που συμφωνούν με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας.

Αναφορές για σημαντικά υψηλότερες τιμές πρωτεϊνών σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* είναι σπάνιες και προέρχονται από καλλιέργεια σε υποστρώματα πλούσια σε άζωτο, όπως τα υπολείμματα της ζυθοποιίας ή το άχυρο εμπλουτισμένο με υπολείμματα από ζαχαρότευτλα (Manzi et al., 1999, Wang et al., 2001). Τέτοιου είδους δεδομένα θα μπορούσαν να ερμηνευτούν σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας στην οποία καταδεικνύεται μια θετική συσχέτιση μεταξύ συγκεντρώσεων αζώτου στο υπόστρωμα και πρωτεϊνών στα μανιτάρια ( $r = 0,433$ ). Η σχετικά χαμηλή τιμή της συσχέτισης οφείλεται κυρίως στο ότι σε ένα υπόστρωμα (AN), στο οποίο η συγκέντρωση αζώτου είναι χαμηλή, παρήχθησαν τα μανιτάρια με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Επιπροσθέτως, παρουσιάζει ενδιαφέρον η αρνητική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στα μανιτάρια και ημικυτταρίνης στα υποστρώματα καλλιέργειας ( $r = 0,633, p < 0,05$ ). Η διακύμανση της περιεκτικότητας σε ολικά λιπίδια ήταν σχετικά μικρή και κυμάνθηκε από 2,7-3,5% (υψηλότερη στα BS, PL και CC) έως και 1,6% (σε μανιτάρια ανεπτυγμένα σε OS, η οποία είναι σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα). Η περιεκτικότητα σε ολικά λιπίδια στα μανιτάρια που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα BS (3,5%) ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με αναφορές από μανιτάρια του ίδιου είδους που καλλιεργήθηκαν σε παρόμοια υποστρώματα (Badu et al., 2011), ενώ παρόμοιες ή και μικρότερες τιμές αναφέρονται στο WS (Dundar et al., 2009). Αντιθέτως, σε υποστρώματα αποτελούμενα από ζαχαροκάλαμο ή άχυρο μπανανιάς, η περιεκτικότητα παρουσιάστηκε σημαντικά υψηλότερη (5,3-6,3%, Bonatti et al., 2004). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα ολικά λιπίδια των μανιταριών συσχετίστηκαν

Πίνακας 2.2.10. Βασική σύσταση μανιταριών *P. ostreatus* που αναπτύχθηκαν σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποίησης και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου). Οι τιμές (% ξ.β., με εξαίρεση την ενέργεια, kcal 100g<sup>-1</sup> ξ.β.) παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση, *n* = 4. Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test, *p* < 0.05) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Υπόστρωμα	Ολικές πρωτεΐνες	Ολικά λιπίδια	Ινώδη συστατικά	Ολικοί υδατάνθρακες	Τέφρα	K	Na	P	Ενέργεια
AN	31,36 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,25 <sup>ab</sup>	13,00 ± 0,53 <sup>d</sup>	56,64 ± 0,76 <sup>b</sup>	9,86 ± 0,27 <sup>a</sup>	371 ± 9 <sup>b</sup>	89 ± 2 <sup>abc</sup>	754 ± 72 <sup>ab</sup>	373,0±0,31 <sup>b</sup>
BS	16,06 ± 1,76 <sup>c, d</sup>	3,46 ± 1,14 <sup>a</sup>	15,78 ± 0,61 <sup>bcd</sup>	73,56 ± 2,14 <sup>a</sup>	6,21 ± 0,12 <sup>d</sup>	193 ± 2 <sup>e</sup>	63 ± 2 <sup>d</sup>	469 ± 185 <sup>b</sup>	392,5±5,75 <sup>a</sup>
CC	15,41 ± 0,78 <sup>d</sup>	3,37 ± 0,65 <sup>a</sup>	13,76 ± 4,13 <sup>cd</sup>	73,37 ± 0,63 <sup>a</sup>	8,02 ± 0,49 <sup>bc</sup>	325 ± 18 <sup>bcd</sup>	80 ± 2 <sup>bcd</sup>	915 ± 158 <sup>ab</sup>	384,8±5,15 <sup>ab</sup>
GM	15,99 ± 1,45 <sup>cd</sup>	2,81 ± 0,38 <sup>a</sup>	24,26 ± 1,87 <sup>a</sup>	72,95 ± 0,54 <sup>a</sup>	8,43 ± 0,59 <sup>abc</sup>	374 ± 18 <sup>b</sup>	91 ± 3 <sup>abc</sup>	985 ± 74 <sup>a</sup>	380,3±1,32 <sup>ab</sup>
OL	19,74 ± 1,19 <sup>bc</sup>	2,72 ± 0,23 <sup>a</sup>	12,50 ± 5,44 <sup>d</sup>	68,28 ± 1,02 <sup>ab</sup>	9,48 ± 1,93 <sup>ab</sup>	510 ± 27 <sup>a</sup>	100 ± 10 <sup>ab</sup>	977 ± 65 <sup>a</sup>	375,7±6,83 <sup>b</sup>
OS	21,41 ± 2,34 <sup>b</sup>	1,64 ± 0,35 <sup>b</sup>	13,68 ± 2,54 <sup>cd</sup>	70,21 ± 3,05 <sup>ab</sup>	6,98 ± 1,26 <sup>cd</sup>	277 ± 7 <sup>cd</sup>	76 ± 3 <sup>cd</sup>	891 ± 65 <sup>ab</sup>	380,3±6,79 <sup>ab</sup>
PL	16,13 ± 1,22 <sup>cd</sup>	3,41 ± 0,65 <sup>a</sup>	19,89 ± 3,51 <sup>ab</sup>	72,77 ± 3,53 <sup>a</sup>	7,83 ± 0,60 <sup>bcd</sup>	342 ± 5 <sup>bc</sup>	96 ± 2 <sup>abc</sup>	984 ± 15 <sup>a</sup>	385,7±0,90 <sup>ab</sup>
PN	22,74 ± 0,04 <sup>b</sup>	2,44 ± 0,25 <sup>ab</sup>	13,68 ± 0,16 <sup>cd</sup>	75,88 ± 4,41 <sup>a</sup>	7,50 ± 0,67 <sup>cd</sup>	271 ± 1 <sup>d</sup>	81 ± 3 <sup>bcd</sup>	1001 ± 77 <sup>a</sup>	378,1±7,20 <sup>ab</sup>
WS	14,64 ± 1,38 <sup>d</sup>	2,56 ± 0,17 <sup>ab</sup>	19,07 ± 2,33 <sup>abc</sup>	74,41 ± 0,64 <sup>a</sup>	8,56 ± 0,89 <sup>abc</sup>	352 ± 4 <sup>b</sup>	104 ± 6 <sup>a</sup>	810 ± 0 <sup>ab</sup>	378,6±2,83 <sup>ab</sup>

θετικά με τον λόγο C/N ( $r = 0,450$ ) και την κυτταρίνη ( $r = 0,700$ ,  $p < 0,05$ ) και αρνητικά με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε ολικά λιπίδια ( $r = 0,767$ ,  $p < 0,05$ ). Επιπλέον, αναφορικά με την ενέργεια (gross energy) δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων (373-393 kcal 100 g<sup>-1</sup>, Πίνακας 2.2.10.) και οι τιμές είναι παρόμοιες με αυτές που προέκυψαν από παλιότερες έρευνες για το είδος *P. ostreatus* (Kalmis et al., 2008, Manzi et al., 2004).

Οι ολικοί υδατάνθρακες κυμάνθηκαν από 57% (στο υπόστρωμα AN) έως και 74% (BS, CC και WS), (Πίνακας 2.2.10.). Σε παλιότερες εργασίες αναφέρονται μικρότερες ή παρόμοιες τιμές σε μανιτάρια που καλλιεργήθηκαν σε πριονίδια ή άχυρο (Badu et al., 2011, Mau & Tseng, 1998, Tsai et al., 2008). Οι διαφορές αυτές θα πρέπει να αποδοθούν κατά κύριο λόγο στις διαφορετικές αναλυτικές μεθοδολογίες και στη χρήση διαφορετικών στελεχών του *P. ostreatus*. Επιπλέον η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες συσχετίστηκε θετικά με τον λόγο C/N, καθώς και με την κυτταρίνη και ημικυτταρίνη του υποστρώματος ( $r = 0,683$ ,  $r = 0,750$  και  $r = 0,717$  αντίστοιχα,  $p < 0,05$ ) και αρνητικά με το ποσοστό ολικών λιπιδίων του υποστρώματος ( $r = 0,783$ ,  $p < 0,05$ ).

Στα μανιτάρια του *P. ostreatus* το μεγαλύτερο ποσοστό ινωδών συστατικών μετρήθηκε στο υπόστρωμα GM (24%), ενώ σημαντικά χαμηλότερες τιμές ανιχνεύτηκαν στα περισσότερα από τα υπόλοιπα υποστρώματα (13-14%). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε εργασίες άλλων ερευνητών για μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε άχυρο σίτου (Dundar et al., 2009), ενώ σημαντικά μικρότερη περιεκτικότητα ανιχνεύτηκε σε μανιτάρια ανεπτυγμένα σε πριονίδια από ξυλεία τροπικών δέντρων (Badu et al., 2011).

Η περιεκτικότητα της τέφρας κυμάνθηκε από 6-7% στα BS και OS έως και 10% στο AN, ενώ η συγκέντρωση του καλίου και του νατρίου στα μανιτάρια εμφάνισε πολύ μεγαλύτερη διακύμανση αναλόγως του υποστρώματος ανάπτυξης (Πίνακας 2.2.10.). Σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση σε κάλιο είχαν τα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα OL, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του φωσφόρου μεταξύ των μανιταριών που προήλθαν από διαφορετικά υποστρώματα με εξαίρεση αυτά από το BS στα οποία εμφανίστηκαν οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις για όλα τα μακροστοιχεία. Το ποσοστό της τέφρας στα μανιτάρια ήταν ανάλογο με αυτό που αναφέρεται σε άλλες εργασίες (Badu et al., 2011, Kalmis et al., 2008, Mau & Tseng, 1998, Tsai et al., 2008) με εξαίρεση τις τιμές που αναφέρονται σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε άχυρο σίτου, σόργου, σόγιας και βαμβακιού (Dundar et al., 2009) οι οποίες είναι σημαντικά μικρότερες.



### 2.2.3.7 Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων στα μανιτάρια *P. ostreatus*

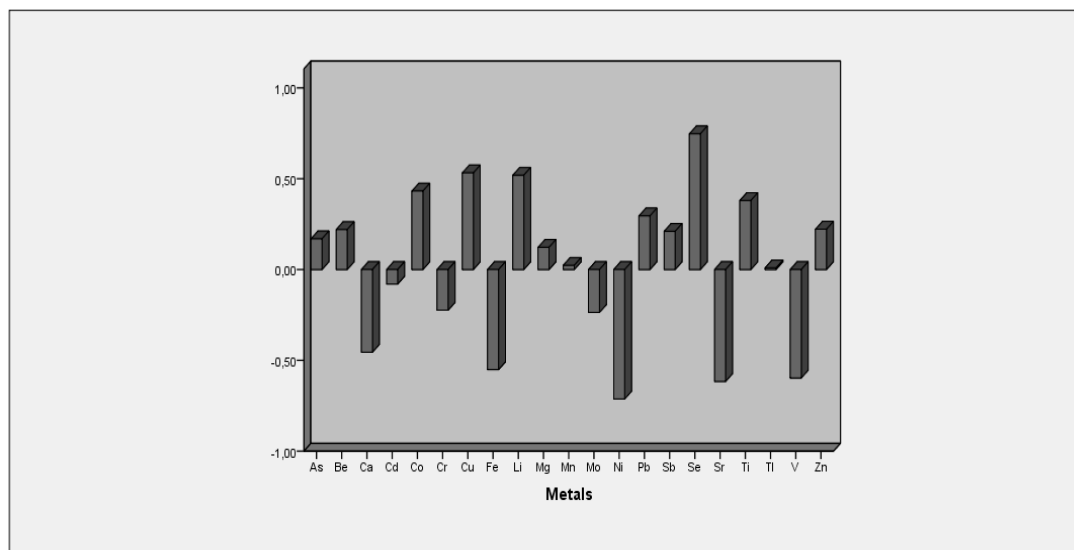
Μέχρι σήμερα έχουν υλοποιηθεί πολλές δεκάδες εργασιών που αναφέρονται στα επίπεδα των μετάλλων σε αυτοφυή μανιτάρια. Ωστόσο πολύ λίγα δεδομένα υπάρχουν για την αντίστοιχη συγκέντρωση σε καλλιεργούμενα είδη και ειδικότερα για τη σχέση μεταξύ υποστρώματος και καρποφοριών.

Οι συγκεντρώσεις των 21 ιχνοστοιχείων που μετρήθηκαν στις καρποφορίες του *P. ostreatus* σε επτά διαφορετικά υποστρώματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2.11. Σε αντίθεση με τα υποστρώματα στα οποία αναπτύχθηκαν (όπου το Ca ήταν το στοιχείο στη μεγαλύτερη αφθονία), στα μανιτάρια η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε για το Mg, ενώ πολύ υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν επίσης για τα στοιχεία Ca, Fe και Zn. Για τα μισά περίπου από τα στοιχεία που εξετάστηκαν (As, Be, Cd, Co, Fe, Li, Mo, Ni, Pb, Se) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων. Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Hoa et al. (2009) οι οποίοι αναφέρουν ότι για το είδος *P. ostreatus* οι συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων στοιχείων στα μανιτάρια δεν εξαρτώνται από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα. Αντίθετα για όλα τα υπόλοιπα στοιχεία (Ca, Cu, Mg, Mn, Sb, Sr, Ti, Tl, V και Zn) σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα χωρίς όμως να παρουσιάζουν ανάλογα μεγάλη διακύμανση με εκείνη που παρατηρήθηκε στα φυτικά παραπροϊόντα. Αξιοσημείωτη σε σχέση με τα υπόλοιπα στοιχεία είναι η διακύμανση στη συγκέντρωση του Ca (από 340 ppm στο υπόστρωμα OL έως και 1968 ppm στο OS), η οποία όμως δεν συσχετίζεται με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα υποστρώματα. Αν και στο παρελθόν έχει παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση του Ca στα μανιτάρια εξαρτάται από τη σύσταση του υποστρώματος (Bernas et al., 2006, Vetter 1994), απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την ακριβή κατανόηση του μηχανισμού απορρόφησης του Ca από τους μύκητες. Επιπλέον, σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στις συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων σε υπόστρωμα και μανιτάρια (Γράφημα 2.2.6). Οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για το Li ( $r = 0,52$ ) και για το Se ( $r = 0,75, p < 0,05$ ). Το μεν Li έχει αποδειχθεί ότι επιδρά στη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου GSK-3β το οποίο σχετίζεται με ψυχασθένειες του ανθρώπου (Gould et al., 2008), ενώ το Se θεωρείται απαραίτητο για την ανάπτυξη όλων των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου λόγω της σημασίας του στη λειτουργικότητα ενζύμων και πρωτεϊνών ((Jarzynska and Falandysz, 2011, Rayman, 2012).

Πίνακας 2.2.11. Συγκεντρώσεις 21 ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια *P. ostreatus* τα οποία καλλιεργήθηκαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα). Οι τιμές (ppm, εκτός από τα Co, Sb και Tl τα οποία εκφράζονται σε ppb και επισημαίνονται με αστερίσκο) αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Trace elements	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
As	1,24±0,61 <sup>a</sup>	2,39±0,02 <sup>a</sup>	2,36±0,22 <sup>a</sup>	2,20±0,13 <sup>a</sup>	2,17±0,21 <sup>a</sup>	1,82±0,31 <sup>a</sup>	1,99±0,13 <sup>a</sup>
Be	4,12±1,05 <sup>a</sup>	2,79±0,45 <sup>a</sup>	7,79±1,05 <sup>a</sup>	8,26±4,03 <sup>a</sup>	6,49±0,58 <sup>a</sup>	9,97±2,96 <sup>a</sup>	3,49±0,21 <sup>a</sup>
Ca	731,1173,65 <sup>ab</sup>	964,64±244,26 <sup>ab</sup>	339,90±50,63 <sup>b</sup>	383,00±104,21 <sup>b</sup>	1968,47±981,84 <sup>a</sup>	561,38±140,46 <sup>b</sup>	432,83±49,90 <sup>b</sup>
Cd	0,50±0,06 <sup>ab</sup>	0,74±0,21 <sup>a</sup>	0,50±0,01 <sup>ab</sup>	0,52±0,13 <sup>ab</sup>	0,43±0,02 <sup>b</sup>	0,43±0,08 <sup>b</sup>	0,53±0,01 <sup>ab</sup>
Co*	33,25±1,06 <sup>ab</sup>	41,15±9,69 <sup>ab</sup>	34,83±4,71 <sup>ab</sup>	23,45±1,20 <sup>b</sup>	53,73±16,52 <sup>a</sup>	22,93±1,72 <sup>b</sup>	51,45±0,78 <sup>ab</sup>
Cr	1,76±0,32 <sup>a</sup>	1,25±0,14 <sup>b</sup>	1,25±0,11 <sup>b</sup>	1,16±0,04 <sup>b</sup>	1,19±0,05 <sup>b</sup>	1,07±0,13 <sup>b</sup>	1,23±0,03 <sup>b</sup>
Cu	39,95±11,33 <sup>a</sup>	16,82±0,15 <sup>c</sup>	22,05±1,92 <sup>abc</sup>	19,92±1,36 <sup>bc</sup>	31,08±6,88 <sup>abc</sup>	17,29±5,85 <sup>c</sup>	38,60±1,89 <sup>ab</sup>
Fe	144,99±8,63 <sup>a</sup>	104,62±7,72 <sup>a</sup>	113,27±15,72 <sup>a</sup>	141,06±15,93 <sup>a</sup>	125,85±7,81 <sup>a</sup>	100,36±22,96 <sup>a</sup>	118,02±7,58 <sup>a</sup>
Li	0,38±0,05 <sup>a</sup>	0,75±0,07 <sup>a</sup>	0,73±0,31 <sup>a</sup>	0,68±0,23 <sup>a</sup>	0,92±0,18 <sup>a</sup>	0,63±0,04 <sup>a</sup>	1,12±0,71 <sup>a</sup>
Mg	2621,51±35,11 <sup>a</sup>	2286,11±611,13 <sup>ab</sup>	2243,64±371,72 <sup>ab</sup>	1746,26±114,42 <sup>ab</sup>	1374,63±281,43 <sup>b</sup>	1814,65±337,44 <sup>ab</sup>	1945,13±107,06 <sup>ab</sup>
Mn	12,79±0,78 <sup>a</sup>	5,86±1,85 <sup>c</sup>	9,61±0,52 <sup>abc</sup>	9,61±0,66 <sup>abc</sup>	7,59±1,35 <sup>bc</sup>	6,58±1,34 <sup>bc</sup>	10,88±0,70 <sup>ab</sup>
Mo	0,29±0,03 <sup>a</sup>	0,39±0,02 <sup>a</sup>	0,19±0,02 <sup>a</sup>	0,26±0,17 <sup>a</sup>	0,59±0,11 <sup>a</sup>	0,26±0,0 <sup>a</sup>	0,60±0,37 <sup>a</sup>
Ni	0,78±0,21 <sup>a</sup>	0,50±0,03 <sup>a</sup>	0,49±0,13 <sup>a</sup>	0,92±0,62 <sup>a</sup>	0,76±0,07 <sup>a</sup>	0,37±0,08 <sup>a</sup>	0,57±0,05 <sup>a</sup>
Pb	0,28±0,05 <sup>a</sup>	0,22±0,07 <sup>a</sup>	0,16±0,04 <sup>a</sup>	0,17±0,02 <sup>a</sup>	0,14±0,00 <sup>a</sup>	0,14±0,00 <sup>a</sup>	0,23±0,04 <sup>a</sup>
Sb*	3,15±0,64 <sup>a</sup>	2,90±0,00 <sup>ab</sup>	1,83±0,23 <sup>ab</sup>	1,95±0,35 <sup>ab</sup>	1,60±0,28 <sup>b</sup>	2,00±0,24 <sup>ab</sup>	2,60±0,85 <sup>ab</sup>
Se	0,21±0,05 <sup>a</sup>	0,17±0,00 <sup>a</sup>	0,15±0,07 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,04 <sup>a</sup>	0,18±0,08 <sup>a</sup>	0,28±0,00 <sup>a</sup>
Sr	2,65±0,49 <sup>b</sup>	4,05±1,07 <sup>ab</sup>	1,29±0,67 <sup>b</sup>	1,45±0,35 <sup>b</sup>	7,70±2,83 <sup>a</sup>	2,34±0,70 <sup>b</sup>	2,03±0,22 <sup>b</sup>
Ti	46,18±1,03 <sup>a</sup>	21,22±3,63 <sup>c</sup>	37,16±4,87 <sup>ab</sup>	29,37±1,85 <sup>bc</sup>	22,53±1,82 <sup>bc</sup>	26,99±5,76 <sup>bc</sup>	37,00±2,28 <sup>ab</sup>
Tl*	7,75±0,64 <sup>a</sup>	6,75±0,64 <sup>abc</sup>	5,70±0,17 <sup>c</sup>	5,95±0,64 <sup>bc</sup>	7,57±0,15 <sup>ab</sup>	6,00±0,51 <sup>abc</sup>	7,35±0,92 <sup>abc</sup>
V	2,23±0,03 <sup>a</sup>	2,08±0,08 <sup>ab</sup>	1,6±0,06 <sup>bc</sup>	1,91±0,01 <sup>bcd</sup>	1,88±0,09 <sup>bcd</sup>	1,79±0,06 <sup>cd</sup>	1,71±0,01 <sup>d</sup>
Zn	106,92±3,42 <sup>ab</sup>	94,20±22,30 <sup>ab</sup>	113,71±2,34 <sup>a</sup>	108,85±0,91 <sup>ab</sup>	74,34±2,28 <sup>b</sup>	73,95±10,00 <sup>b</sup>	110,02±5,64 <sup>ab</sup>

Όπως έχει αναφερθεί στο παρελθόν, ο μύκητας *P. ostreatus* δύναται να συσσωρεύσει στις καρποφορίες του τα δύο προαναφερθέντα στοιχεία και έχουν καταγραφεί επιτυχείς προσπάθειες για την παραγωγή εμπλουτισμένων μανιταριών μέσω της προσθήκης  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  και  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  στα αντίστοιχα υποστρώματα (de Assunção et al., 2012, da Silva et al., 2012, Muñoz et al., 2006, Vieira et al., 2013).



**Γράφημα 2.2.6. Συσχετίσεις (Pearson's correlation coefficient) μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια *P. ostreatus* και των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων στα οποία αναπτύχθηκαν**

### 2.2.3.8 Συγκεντρώσεις σπάνιων γαιών στα μανιτάρια *P. ostreatus*

Οι συγκεντρώσεις των σπάνιων γαιών στα μανιτάρια του *P. ostreatus* που παρήχθησαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.12. και στην Γράφημα 2.2.7. Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων στα υποστρώματα (Παράγραφος 2.2.3.2) οι σπάνιες γαίες με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν κατά φθίνουσα σειρά οι Ce ( $32.5 - 74.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), La ( $15.3 - 38.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) και Nd ( $3.4 - 13.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Σε πρόσφατη έρευνα στην οποία μελετήθηκαν μανιτάρια *P. ostreatus* καλλιεργημένα στην Πολωνία η συγκέντρωση των σπάνιων γαιών που αναφέρθηκε ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη. Πιο συγκεκριμένα, για τα στοιχεία Lu, Nd, Tm και Er η συγκέντρωση ήταν κατά δύο έως τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή της παρούσας εργασίας, ενώ πολύ μικρότερες διάφορες (2 με 10 φορές μεγαλύτερη) εμφανίστηκαν στην περιεκτικότητα των Ce και La (Młeczec et al., 2018). Αξίζει να αναφερθεί ότι το εύρος της συγκέντρωσης σπάνιων γαιών στα μανιτάρια είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό στα υποστρώματα, υποδεικνύ-

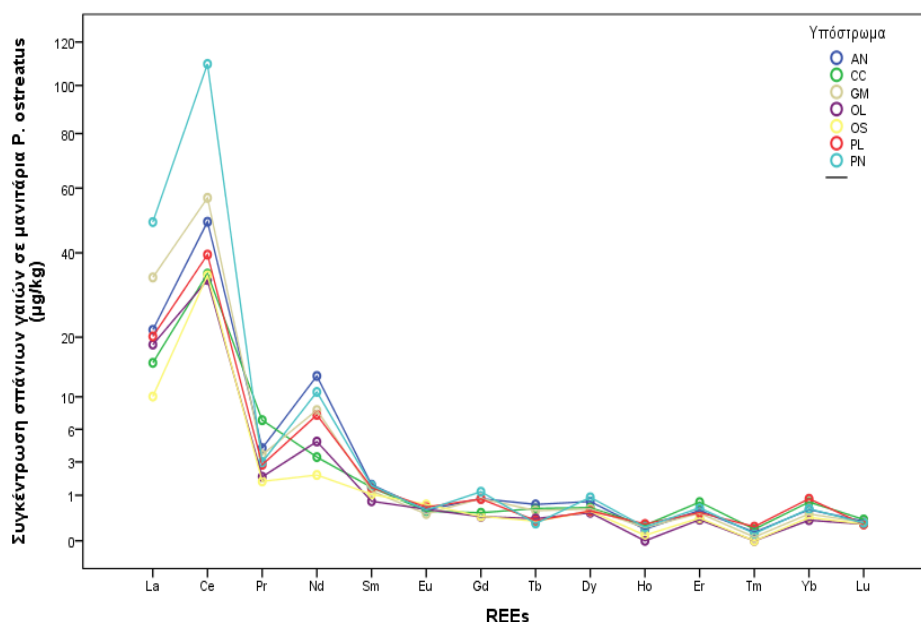
Πίνακας 2.2.12. Συγκέντρωση σπάνιων γαιών σε μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) τα οποία καλλιεργήθηκαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1  $\beta/\beta$ , CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1  $\beta/\beta$ , OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1  $\beta/\beta$ ), OS: Πυρηνόφυλλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση, ( $n = 4$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0.05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

REEs	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
Ce	49,1 $\pm$ 1,3 <sup>Aa</sup>	34 $\pm$ 11 <sup>Aa</sup>	70 $\pm$ 25 <sup>Aa</sup>	32,5 $\pm$ 3,5 <sup>Aa</sup>	52,3 $\pm$ 17,5 <sup>Aa</sup>	46 $\pm$ 14 <sup>Aa</sup>	75 $\pm$ 20 <sup>Aa</sup>
Dy	0,75 $\pm$ 0,09 <sup>Aa</sup>	0,80 $\pm$ 0,36 <sup>Ab</sup>	0,61 $\pm$ 0,22 <sup>Aa</sup>	0,38 $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	0,43 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,43 $\pm$ 0,04 <sup>Aa</sup>	0,92 $\pm$ 0,03 <sup>Ab</sup>
Er	0,45 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>	0,51 $\pm$ 0,11 <sup>Ab</sup>	0,37 $\pm$ 0,12 <sup>Aa</sup>	0,22 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,25 $\pm$ 0,01 <sup>Ab</sup>	0,31 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	0,53 $\pm$ 0,04 <sup>Ab</sup>
Eu	0,46 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	0,43 $\pm$ 0,11 <sup>Ab</sup>	0,35 $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	0,48 $\pm$ 0,14 <sup>Aa</sup>	0,85 $\pm$ 0,26 <sup>Aa</sup>	0,48 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	0,46 $\pm$ 0,02 <sup>Ab</sup>
Gd	0,86 $\pm$ 0,17 <sup>ABa</sup>	0,38 $\pm$ 0,17 <sup>ABb</sup>	0,86 $\pm$ 0,10 <sup>ABb</sup>	0,15 $\pm$ 0,12 <sup>Bb</sup>	0,20 $\pm$ 0,17 <sup>Bb</sup>	0,70 $\pm$ 0,39 <sup>ABa</sup>	1,20 $\pm$ 0,22 <sup>Ab</sup>
Ho	0,07 $\pm$ 0,04 <sup>Aa</sup>	0,07 $\pm$ 0,05 <sup>Ab</sup>	0,04 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>	$\Delta, A,$	0,01 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>Ab</sup>
La	21,5 $\pm$ 6,3 <sup>Aa</sup>	15,3 $\pm$ 2,7 <sup>Ab</sup>	38,6 $\pm$ 8,8 <sup>Aa</sup>	18,6 $\pm$ 2,7 <sup>Aa</sup>	19,0 $\pm$ 4,0 <sup>Ab</sup>	18,3 $\pm$ 1,0 <sup>Ab</sup>	31,3 $\pm$ 7,3 <sup>Aa</sup>
Lu	0,19 $\pm$ 0,04 <sup>Aa</sup>	0,20 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,14 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>
Nd	13,1 $\pm$ 3,8 <sup>Aa</sup>	3,4 $\pm$ 1,2 <sup>Bb</sup>	10,9 $\pm$ 2,5 <sup>Ab</sup>	4,75 $\pm$ 0,86 <sup>Ba</sup>	4,45 $\pm$ 0,63 <sup>Bb</sup>	7,6 $\pm$ 1,0 <sup>ABa</sup>	10,3 $\pm$ 1,0 <sup>Ab</sup>
Pr	4,14 $\pm$ 0,44 <sup>Aa</sup>	4,15 $\pm$ 0,24 <sup>Ab</sup>	3,6 $\pm$ 1,1 <sup>Aa</sup>	1,98 $\pm$ 0,12 <sup>Ba</sup>	3,73 $\pm$ 0,57 <sup>Aa</sup>	2,79 $\pm$ 0,33 <sup>Aa</sup>	3,32 $\pm$ 0,85 <sup>Ab</sup>
Sc	27,0 $\pm$ 1,6 <sup>Aa</sup>	27,0 $\pm$ 1,6 <sup>Aa</sup>	26,5 $\pm$ 4,3 <sup>Aa</sup>	22,6 $\pm$ 2,9 <sup>Aa</sup>	19,31 $\pm$ 0,25 <sup>Aa</sup>	15,14 $\pm$ 0,09 <sup>Aa</sup>	18,60 $\pm$ 0,17 <sup>Aa</sup>
Sm	1,52 $\pm$ 0,28 <sup>Aa</sup>	1,38 $\pm$ 0,49 <sup>Ab</sup>	1,20 $\pm$ 0,19 <sup>Aa</sup>	0,76 $\pm$ 0,11 <sup>Aa</sup>	1,04 $\pm$ 0,18 <sup>Aa</sup>	1,45 $\pm$ 0,27 <sup>Aa</sup>	1,60 $\pm$ 0,22 <sup>Ab</sup>
Tb	0,64 $\pm$ 0,14 <sup>Aa</sup>	0,51 $\pm$ 0,11 <sup>ABa</sup>	0,41 $\pm$ 0,06 <sup>ABCa</sup>	0,24 $\pm$ 0,06 <sup>BCa</sup>	0,19 $\pm$ 0,04 <sup>Ca</sup>	0,18 $\pm$ 0,08 <sup>Ca</sup>	0,15 $\pm$ 0,02 <sup>Cb</sup>
Th	2,08 $\pm$ 0,11 <sup>Aa</sup>	1,75 $\pm$ 0,51 <sup>Aa</sup>	1,18 $\pm$ 0,21 <sup>ABa</sup>	0,54 $\pm$ 0,16 <sup>Ba</sup>	0,59 $\pm$ 0,21 <sup>Ba</sup>	0,84 $\pm$ 0,25 <sup>ABa</sup>	1,68 $\pm$ 0,40 <sup>Ab</sup>
Tm	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,04 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>	0,01 $\pm$ 0,01 <sup>Ab</sup>	$\Delta, A,$	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>Ab</sup>
U	2,25 $\pm$ 0,26 <sup>Ab</sup>	2,42 $\pm$ 0,74 <sup>Aa</sup>	1,19 $\pm$ 0,46 <sup>Ab</sup>	1,13 $\pm$ 0,24 <sup>Aa</sup>	2,44 $\pm$ 0,67 <sup>Aa</sup>	1,55 $\pm$ 0,44 <sup>Aa</sup>	2,25 $\pm$ 0,32 <sup>Aa</sup>
Y	4,37 $\pm$ 0,36 <sup>Ba</sup>	5,4 $\pm$ 1,0 <sup>ABa</sup>	4,28 $\pm$ 0,44 <sup>Ba</sup>	6,5 $\pm$ 1,3 <sup>ABa</sup>	9,5 $\pm$ 1,9 <sup>Aa</sup>	6,4 $\pm$ 1,1 <sup>ABa</sup>	5,7 $\pm$ 0,2 <sup>ABb</sup>
Yb	0,47 $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	0,51 $\pm$ 0,16 <sup>Ab</sup>	0,35 $\pm$ 0,12 <sup>Aa</sup>	0,21 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>	0,70 $\pm$ 0,15 <sup>Aa</sup>	0,48 $\pm$ 0,19 <sup>Aa</sup>	0,49 $\pm$ 0,08 <sup>Ab</sup>

\*  $\Delta, A,$ : Δεν ανιχνεύτηκε

οντας ότι οι απαιτήσεις των βασιδιομυκήτων στη συγκεκριμένη κατηγορία στοιχείων είναι πολύ χαμηλότερες από αυτές των φυτών. Η κατανομή των σπάνιων γαιών στα καλλιεργούμενα μανιτάρια (και στα αντίστοιχα υποστρώματα) η οποία για πρώτη φορά μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, απέδειξε ότι το μυκητιακό υλικό ακολουθεί τον κανόνα των Oddon-Harkins (Γράφημα 2.2.7.) όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των υποστρωμάτων φυτικής προέλευσης.

Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων στα μανιτάρια *P. ostreatus* και στα υποστρώματα από τα οποία προήλθαν, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση για κανένα από τα στοιχεία που μετρήθηκαν ( $r = 0,454 - 0,692$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που διαπιστώθηκε μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις των σπάνιων γαιών στα διάφορα φυτικά παραπροϊόντα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για την πλειοψηφία των μανιταριών που αναπτύχθηκαν στα εν λόγω υποστρώματα. Οι συγκεντρώσεις των σπάνιων γαιών που προσδιορίστηκαν για τα μανιτάρια του *P. ostreatus* είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται από μετρήσεις αυτοφυών μανιταριών (Aruguete et al., 1998, Borovička et al., 2011, Falandysz et al., 2016), αλλά αρκετά χαμηλότερες από αυτές που προσδιορίστηκαν σε δείγματα που συλλέχθηκαν κοντά σε δρόμο μεγάλης κυκλοφορίας στην Πολωνία (Mleczek et al., 2016).



Γράφημα 2.2.7. Κανονική κατανομή των συγκεντρώσεων ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) των σπάνιων γαιών μανιταριών *P. ostreatus* ανεπτυγμένων σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: Πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα). Το προμήθειο (Pm) δεν παρουσιάζεται λόγω μη ανίχνευσης του στα δείγματα που μετρήθηκαν.

Οι συσχετίσεις μεταξύ των στοιχείων στα μανιτάρια *P. ostreatus* εμφάνισαν μεγάλη παραλλακτικότητα ( $r = -0,701$  έως  $0,980$ ) σε αντίθεση με τα υποστρώματα στα οποία οι συγκεντρώσεις τους συσχετιζόταν ισχυρά για όλα τα μέταλλα (βλ. Κεφ 2.2.3.2). Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύει την άποψη ότι αρκετοί μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένων των βασιδιομυκήτων, απορροφούν επιλεκτικά τις σπάνιες γαίες από τα υποστρώματα καλλιέργειας, κάτι που μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε χρησιμοποίησή τους για ανάκτηση/διαχωρισμό τους με βιολογικό τρόπο (d'Aquino et al., 2009, Moriwaki and Yamamoto, 2013). Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να εξηγηθεί ο ακριβής μηχανισμός της επιλεκτικής απορρόφησης σπάνιων γαιών και να κατανοηθούν τα βιοχημικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν. Ένα σημείο εκκίνησης θα μπορούσε να είναι η αντικατάσταση άλλων «υπερ-ιχνοστοιχείων» από κάποιες REEs και η μελέτη της συνεργιστικής ή/και η ανταγωνιστικής τους δράσης.

#### 2.2.3.9 Βασική σύσταση των μανιταριών *C. cylindracea*

Η ανάλυση των κύριων συστατικών των μανιταριών *C. cylindracea* εμφάνισε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ αυτών που παρήχθησαν στα εννέα διαφορετικά υποστρώματα. Η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες ήταν μεγαλύτερη στα μανιτάρια που προήλθαν από τα υποστρώματα AN, OL και PN (20 – 22%, Πίνακας 2.2.13.) συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σχετικά μεγάλη διακύμανση καταγράφηκε επίσης στις ολικές πρωτεΐνες των μανιταριών (11 – 21%) που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα αποτελούμενα από υπολείμματα ξύλου, ενώ πολύ μικρότερη όταν καλλιεργήθηκαν σε άχυρο σίτου (16-18%) (Badu et al., 2011, Dundar et al., 2009). Και στις δύο προαναφερθείσες εργασίες, μολοντί χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά στελέχη μυκήτων προέκυψε παρόμοιο εύρος τιμών με αυτό της παρούσας εργασίας. Σημαντικά υψηλότερες τιμές είναι ασυνήθιστες στην περίπτωση του *C. cylindracea* και αναφέρονται σε εργασίες στις οποίες μελετήθηκαν μανιτάρια καλλιεργημένα σε υλικά πλούσια σε άζωτο, όπως τα εμπλουτισμένα υποστρώματα με κοπριά πουλερικών ή με νιφάδες βρώμης σε συνδυασμό με αλεύρι σόγιας (Isikhuemhen et al., 2009, Uhart et al., 2008). Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας στην οποία αποδείχθηκε η θετική συσχέτιση μεταξύ περιεκτικότητας πρωτεϊνών των μανιταριών και συγκέντρωσης αζώτου στο υπόστρωμα ( $r = 0,433$ ), ενώ η μη ύπαρξη στατιστικά σημαντικών τιμών αποδίδεται αποκλειστικά στο υπόστρωμα AN, το οποίο αν και είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο οδήγησε στην παραγωγή μανιταριών με την υψηλότερη περιεκτικό-

Πίνακας 2.2.13. Βασική σύσταση μανιταριών *C. cylindracea* που έχουν παραχθεί σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού (1:1 β/β), BS: πριονίδι οξιάς, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (1:1 β/β), OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), OS: πυρηνόζυλο, PN: πευκοβελόνες, PL: φύλλα φοίνικα και WS: άχυρο σίτου). Οι τιμές [% , ξ.β., με εξαίρεση την ενέργεια (kcal 100g<sup>-1</sup>, ξ.β.) παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση, n = 4. Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Υπόστρωμα	Ολικές πρωτεΐνες	Ολικά λιπίδια	Ινώδη συστατικά	Ολικοί υδατάνθρακες	Τέφρα	K	Na	P	Ενέργεια
AN	22,37 ± 2,10 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,28 <sup>a</sup>	12,68 ± 1,68 <sup>a</sup>	62,87 ± 3,50 <sup>bc</sup>	10,71 ± 0,80 <sup>a</sup>	346 ± 2 <sup>d</sup>	86 ± 3 <sup>def</sup>	1210 ± 86 <sup>bc</sup>	371,5 ± 1,18 <sup>a</sup>
BS	18,36 ± 0,87 <sup>abc</sup>	3,42 ± 0,69 <sup>a</sup>	15,05 ± 1,49 <sup>a</sup>	70,26 ± 2,91 <sup>ab</sup>	8,16 ± 1,41 <sup>a</sup>	359 ± 12 <sup>d</sup>	94 ± 1 <sup>cd</sup>	1113 ± 2 <sup>c</sup>	384,5 ± 2,24 <sup>a</sup>
CC	14,76 ± 1,50 <sup>c</sup>	2,87 ± 0,58 <sup>a</sup>	17,02 ± 1,07 <sup>a</sup>	72,42 ± 2,15 <sup>a</sup>	10,11 ± 2,08 <sup>a</sup>	308 ± 12 <sup>de</sup>	85 ± 1 <sup>def</sup>	1343 ± 12 <sup>b</sup>	373,9 ± 6,43 <sup>a</sup>
GM	17,70 ± 1,51 <sup>abc</sup>	2,56 ± 0,45 <sup>a</sup>	12,75 ± 4,06 <sup>a</sup>	70,68 ± 1,50 <sup>ab</sup>	9,25 ± 2,02 <sup>a</sup>	242 ± 4 <sup>f</sup>	74 ± 0 <sup>f</sup>	1576 ± 78 <sup>a</sup>	375,8 ± 6,01 <sup>a</sup>
OL	20,45 ± 0,46 <sup>ab</sup>	2,47 ± 0,36 <sup>a</sup>	12,92 ± 1,24 <sup>a</sup>	68,48 ± 0,76 <sup>ab</sup>	8,83 ± 0,75 <sup>a</sup>	278 ± 5 <sup>ef</sup>	77 ± 1 <sup>ef</sup>	1317 ± 8 <sup>bc</sup>	377,0 ± 3,85 <sup>a</sup>
OS	13,93 ± 2,39 <sup>c</sup>	2,89 ± 0,45 <sup>a</sup>	18,00 ± 1,56 <sup>a</sup>	74,25 ± 3,58 <sup>a</sup>	9,09 ± 0,84 <sup>a</sup>	345 ± 9 <sup>d</sup>	91 ± 0 <sup>cde</sup>	283 ± 12 <sup>e</sup>	378,1 ± 1,12 <sup>a</sup>
PL	17,32 ± 0,13 <sup>abc</sup>	3,70 ± 0,54 <sup>a</sup>	19,38 ± 3,35 <sup>a</sup>	69,28 ± 1,97 <sup>ab</sup>	9,90 ± 1,66 <sup>a</sup>	418 ± 13 <sup>c</sup>	104 ± 3 <sup>bc</sup>	1176 ± 8 <sup>bc</sup>	378,9 ± 5,27 <sup>a</sup>
PN	21,56 ± 1,24 <sup>a</sup>	3,24 ± 0,41 <sup>a</sup>	13,38 ± 2,95 <sup>a</sup>	57,02 ± 3,98 <sup>c</sup>	8,16 ± 1,41 <sup>a</sup>	487 ± 3 <sup>b</sup>	117 ± 6 <sup>ab</sup>	761 ± 18 <sup>d</sup>	371,6 ± 5,75 <sup>a</sup>
WS	15,87 ± 3,32 <sup>bc</sup>	3,82 ± 0,47 <sup>a</sup>	14,63 ± 0,09 <sup>a</sup>	68,56 ± 3,76 <sup>ab</sup>	11,94 ± 0,30 <sup>a</sup>	551 ± 19 <sup>a</sup>	125 ± 5 <sup>a</sup>	1213 ± 43 <sup>bc</sup>	371,3 ± 1,21 <sup>a</sup>

τητα σε πρωτεΐνες. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρουσα η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών στα μανιτάρια και του ποσοστού ημικυτταρίνης στο υπόστρωμα ( $r = 0,617$ ,  $p < 0,05$ ). Όσον αφορά τα ολικά λιπίδια στα μανιτάρια *C. cylindracea*, η συγκέντρωσή τους κυμάνθηκε από 2,5 – 2,6% στα OL και GM έως και 3,4 – 3,8% στα WS, PL και BS, τιμές οι οποίες είναι παρόμοιες με αυτές που προέκυψαν από αναλύσεις εμπορικά διαθέσιμων μανιταριών (2,2 – 3,6%, Mau and Tseng, 1998, Tsai et al., 2009). Η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντική και στην περιεκτικότητα των μανιταριών σε λιπίδια όπως αποδεικνύει η θετική συσχέτιση με το λόγο C/N και την ημικυτταρίνη ( $r = 0,667$  και  $r = 0,450$  αντίστοιχα). Επιπλέον, η αρνητική συσχέτιση με τα ολικά λιπίδια του υποστρώματος ( $r = -0,517$ ) αποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν έχουν απορροφηθεί από το υπόστρωμα -λόγω και του μεγάλου μεγέθους των μορίων τους- αλλά αποτελούν προϊόν μεταβολισμού του μύκητα. Τέλος στον υπολογισμό της ενέργειας (η οποία κυμάνθηκε από 372 – 386 kcal 100g<sup>-1</sup> ξ.β. ) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε μεταξύ των υποστρωμάτων αλλά ούτε και με τα μανιτάρια *P. ostreatus* που αναπτύχθηκαν στα αντίστοιχα υποστρώματα (βλ. Παράγραφο 2.2.3.6).

Η χαμηλότερη περιεκτικότητα υδατανθράκων εμφανίστηκε στα μανιτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα PN (57%), ενώ η μεγαλύτερη σε αυτά στο OS (74%). Σε παλαιότερες έρευνες έχουν αναφερθεί τιμές μικρότερες ή και παρόμοιες με της παρούσας εργασίας οι οποίες μπορούν να αποδοθούν τόσο στη διαφορετική μεθοδολογία προσδιορισμού όσο και στη χρήση διαφορετικών στελεχών. Σχετικά με το ποσοστό των ινωδών συστατικών στα μανιτάρια δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των εννέα υποστρωμάτων (13 -19%, Πίνακας 2.2.13.) αλλά ούτε και σε σχέση με το ποσοστό που έχει αναφερθεί στο παρελθόν για μανιτάρια καλλιεργημένα σε εμπορικό υπόστρωμα (16 – 20%) (Mau & Tseng, 1998, Tsai et al., 2008).

Η περιεκτικότητα της τέφρας στα μανιτάρια *C. cylindracea* δεν παρουσίασε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των υποστρωμάτων και κυμάνθηκε από 8% έως και 12% (Πίνακας 2.2.13). Όσον αφορά τη συγκέντρωση των μακροστοιχείων P και Na, ήταν παρόμοια με αυτή που καταγράφηκε στο *P. ostreatus* για τα περισσότερα υποστρώματα που εξετάστηκαν (Πίνακας 2.2.13), ενώ οι υψηλότερες τιμές προέκυψαν στο υπόστρωμα WS (551 και 125 mg 100g<sup>-1</sup> αντίστοιχα) ακολουθούμενο από το PN. Σε όλα τα υποστρώματα παρήχθησαν μανιτάρια με υψηλότερες συγκεντρώσεις φωσφόρου (1113 – 1576 mg 100g<sup>-1</sup>) σε σχέση με το *P. ostreatus* εκτός από τα PN και OS στα οποία η σχετική συγκέντρωση ήταν αρκετά χαμηλή (283 – 761 mg 100 g<sup>-1</sup>).



### 2.2.3.10 Συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων σταμανιτάρια *C. cylindracea*

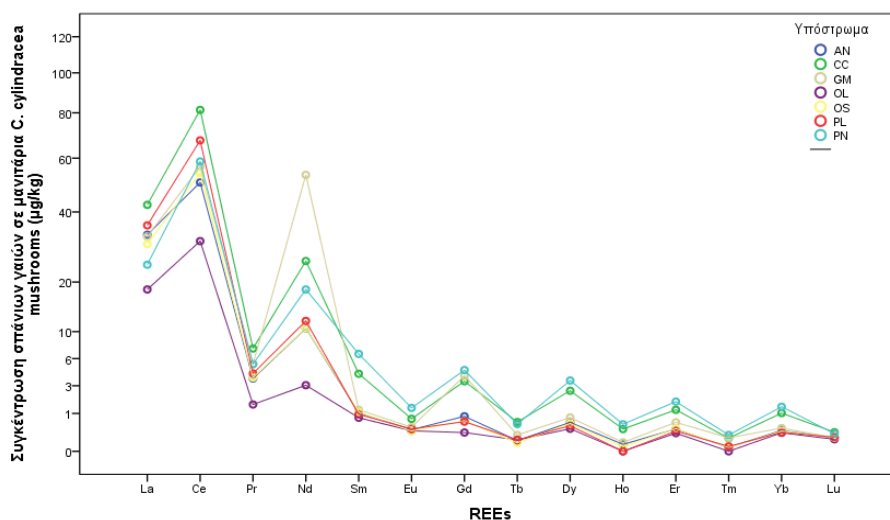
Όπως αναφέρεται και στο Κεφάλαιο 2.2.3.7 έχει δοθεί μεγάλη έμφαση τα τελευταία χρόνια στο προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιχνοστοιχείων σε αυτοφυή μανιτάρια, ενώ πολύ λιγότερα στοιχεία υπάρχουν για καλλιεργούμενα είδη και ιδιαίτερα για αυτά που η καλλιέργεια τους είναι σχετικά περιορισμένη. Επιπλέον σε ελάχιστες περιπτώσεις έχει προσδιοριστεί η συγκέντρωση τους στα υποστρώματα ανάπτυξης ώστε να διευκρινιστεί ο βαθμός συσσώρευσης τους στις καρποφορίες. Στην περίπτωση του είδους *C. cylindracea* μελετήθηκε διεξοδικά η συγκέντρωση των μετάλλων σε μανιτάρια που προήλθαν από επτά διαφορετικά υποστρώματα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.14. Από τα 21 στοιχεία που προσδιορίστηκαν τη μεγαλύτερη αφθονία παρουσίασε το Mg ακολουθούμενο από το Ca και τα Fe και Zn. Για εννέα από τα στοιχεία αυτά (As, Cr, Mn, Mo, Ni, Sb, Se, Sr, Tl) στα οποία συμπεριλαμβάνονται και μερικά από τα πιο επικίνδυνα βαρέα μέταλλα όπως τα As, Cr και Ni δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων αποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάζεται η απορρόφηση τους παρά τις σημαντικές διαφορές στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων. Η συγκέντρωση όλων των υπολοίπων στοιχείων (Be, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mg, Pb, Ti, V και Zn) διέφερε σημαντικά μεταξύ των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα και η μεγαλύτερη συγκέντρωση για τα περισσότερα από αυτά παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα PN. Σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων που έχουν αναφερθεί σε καλλιεργούμενα μανιτάρια στην Ινδία (Muthu et al., 2016), οι τιμές της παρούσας εργασίας ήταν αισθητά μικρότερες. Αντίθετα ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται από αυτοφυή μανιτάρια *C. cylindracea* συλλεγμένα σε μη επιβαρυμένες από ρύπους περιοχές της Β. Τουρκίας (Konuk et al., 2007). Τέλος, σε σύγκριση με το *P. ostreatus*, τα μανιτάρια του *C. cylindracea* περιείχαν στατιστικά μεγαλύτερη συγκέντρωση Be και μικρότερη σε Fe, Mn και Se για όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν.

Πίνακας 2.2.14. Συγκεντρώσεις 21 ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια *C. cylindracea* τα οποία καλλιεργήθηκαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα). Οι τιμές [ppm εκτός από τα Co, Sb και Tl τα οποία εκφράζονται σε ppb και επισημαίνονται με αστερίσκο (\*)], αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Ιχνοστοιχεία	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
As	1,95±0,19 <sup>c</sup> <sub>a</sub>	1,84±0,06 <sup>a</sup>	1,84±0,14 <sup>a</sup>	1,56±0,36 <sup>a</sup>	1,69±0,05 <sup>a</sup>	1,72±0,05 <sup>a</sup>	1,84±0,01 <sup>a</sup>
Be	5,70±2,12 <sup>d</sup>	4,66±0,06 <sup>d</sup>	18,35±4,00 <sup>abc</sup>	23,15±0,01 <sup>ab</sup>	14,14±0,17 <sup>bcd</sup>	27,09±5,55 <sup>a</sup>	7,80±1,70 <sup>cd</sup>
Ca	1076,36±10,26 <sup>a</sup>	562,83±67,78 <sup>b</sup>	686,59±245,72 <sup>ab</sup>	648,36±62,51 <sup>ab</sup>	432,15±62,03 <sup>b</sup>	397,30±9,65 <sup>b</sup>	817,82±90,55 <sup>ab</sup>
Cd	0,33±0,03 <sup>b</sup>	0,41±0,03 <sup>b</sup>	0,35±0,06 <sup>b</sup>	0,34±0,02 <sup>b</sup>	0,34±0,11 <sup>b</sup>	0,33±0,01 <sup>b</sup>	0,66±0,03 <sup>a</sup>
Co	22,67±2,52 <sup>b</sup>	27,33±4,62 <sup>ab</sup>	37,00±3,00 <sup>a</sup>	27,50±2,12 <sup>ab</sup>	25,50±6,36 <sup>ab</sup>	21,00±1,73 <sup>b</sup>	39,67±7,37 <sup>a</sup>
Cr	1,24±0,10 <sup>a</sup>	1,33±0,13 <sup>a</sup>	1,38±0,18 <sup>a</sup>	1,26±0,10 <sup>a</sup>	1,31±0,35 <sup>a</sup>	1,12±0,01 <sup>a</sup>	1,30±0,17 <sup>a</sup>
Cu	24,80±2,31 <sup>b</sup>	19,79±1,77 <sup>b</sup>	25,03±2,73 <sup>b</sup>	34,51±1,93 <sup>a</sup>	26,39±0,59 <sup>b</sup>	19,99±2,12 <sup>b</sup>	33,75±2,89 <sup>a</sup>
Fe	70,25±10,28 <sup>ab</sup>	86,21±4,07 <sup>ab</sup>	64,20±2,24 <sup>ab</sup>	69,90±0,98 <sup>ab</sup>	56,39±9,83 <sup>b</sup>	62,53±1,22 <sup>ab</sup>	119,34±30,51 <sup>a</sup>
Li	1,11±0,08 <sup>ab</sup>	0,49±0,18 <sup>bc</sup>	1,32±0,13 <sup>a</sup>	1,09±0,26 <sup>ab</sup>	1,21±0,16 <sup>ab</sup>	0,46±0,09 <sup>a</sup>	0,95±0,36 <sup>c</sup>
Mg	2388,44±490,61 <sup>a</sup>	1734,73±223,61 <sup>ab</sup>	2276,71±69,48 <sup>a</sup>	1596,16±29,03 <sup>ab</sup>	1212,27±126,09 <sup>b</sup>	1905,72±271,92 <sup>ab</sup>	2070,73±345,85 <sup>ab</sup>
Mn	5,28±0,53 <sup>a</sup>	3,73±0,08 <sup>a</sup>	4,80±0,95 <sup>a</sup>	5,94±1,22 <sup>a</sup>	4,87±0,14 <sup>a</sup>	3,66±0,06 <sup>a</sup>	4,52±0,29 <sup>a</sup>
Mo	0,52±0,27 <sup>a</sup>	0,16±0,07 <sup>a</sup>	0,42±0,03 <sup>a</sup>	0,53±0,24 <sup>a</sup>	0,38±0,15 <sup>a</sup>	0,11±0,05 <sup>a</sup>	0,11±0,04 <sup>a</sup>
Ni	0,42±0,12 <sup>a</sup>	0,49±0,09 <sup>a</sup>	0,63±0,06 <sup>a</sup>	0,79±0,05 <sup>a</sup>	0,73±0,31 <sup>a</sup>	0,58±0,07 <sup>a</sup>	0,67±0,16 <sup>a</sup>
Pb	0,16±0,04 <sup>b</sup>	0,20±0,02 <sup>b</sup>	0,17±0,03 <sup>b</sup>	0,29±0,06 <sup>ab</sup>	0,16±0,04 <sup>b</sup>	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,42±0,13 <sup>a</sup>
Sb*	1,66±0,13 <sup>a</sup>	1,51±0,23 <sup>a</sup>	2,07±0,35 <sup>a</sup>	1,8±0,68 <sup>a</sup>	1,77±0,38 <sup>a</sup>	1,91±0,34 <sup>a</sup>	1,66±0,30 <sup>a</sup>
Se	0,05±0,01 <sup>a</sup>	0,03±0,02 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	0,09±0,06 <sup>a</sup>
Sr	3,90±0,08 <sup>a</sup>	2,26±0,25 <sup>a</sup>	2,18±0,17 <sup>a</sup>	2,08±1,00 <sup>a</sup>	1,48±0,23 <sup>a</sup>	1,38±0,10 <sup>a</sup>	3,69±1,41 <sup>a</sup>
Ti	35,21±2,28 <sup>a</sup>	24,98±6,80 <sup>ab</sup>	28,35±3,65 <sup>ab</sup>	28,97±0,47 <sup>ab</sup>	19,13±1,95 <sup>b</sup>	30,51±3,80 <sup>a</sup>	30,75±3,57 <sup>a</sup>
Tl*	5,50±0,10 <sup>a</sup>	6,37±0,31 <sup>a</sup>	6,83±0,31 <sup>a</sup>	8,50±0,14 <sup>a</sup>	6,10±0,57 <sup>a</sup>	8,53±2,63 <sup>a</sup>	6,67±0,23 <sup>a</sup>
V	1,65±0,06 <sup>a</sup>	1,65±0,06 <sup>a</sup>	1,58±0,07 <sup>ab</sup>	1,52±0,04 <sup>ab</sup>	1,47±0,03 <sup>b</sup>	1,49±0,03 <sup>ab</sup>	1,51±0,02 <sup>ab</sup>
Zn	101,39±1,20 <sup>a</sup>	53,51±0,42 <sup>d</sup>	76,95±10,07 <sup>bc</sup>	75,09±4,24 <sup>bcd</sup>	56,82±12,16 <sup>cd</sup>	73,33±1,78 <sup>cd</sup>	97,20±4,34 <sup>ab</sup>

### 2.2.3.11 Συγκεντρώσεις σπάνιων γαιών σταμανιτάρια *C. cylindracea*

Η συγκέντρωση των σπάνιων γαιών μετρήθηκε σε καρποφορίες του *C. cylindracea* που προήλθαν από επτά διαφορετικά υποστρώματα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.15. Σε αντιστοιχία με ταμανιτάρια *P. ostreatus* αλλά και τα υποστρώματα στα οποία αναπτύχθηκαν, τα στοιχεία με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν κατά φθίνουσα σειρά τα Ce (31 – 81  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), La (13 – 42  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) και Nd (3 – 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι και στην περίπτωση των παραπάνωμανιταριών –όπως και σε όλα τα μελετημένα περιβαλλοντικά δείγματα- ισχύει ο κανόνας των Oddon-Harkin (Γράφημα 2.2.8.). Επιπλέον, για όλες τις σπάνιες γαίες με εξαίρεση τα στοιχεία Ce, La, Lu και Sc παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σταμανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα, ενώ σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα είχαν ταμανιτάρια που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα PN (Πίνακας 2.2.15).



Γράφημα 2.2.8. Κανονική κατανομή των συγκεντρώσεων ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) των σπάνιων γαιώνμανιταριών *C. cylindracea* ανεπτυγμένων σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οينوποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα). Το προμήθειο (Pm) δεν παρουσιάζεται λόγω μη ανίχνευσης του στα δείγματα που μετρήθηκαν.

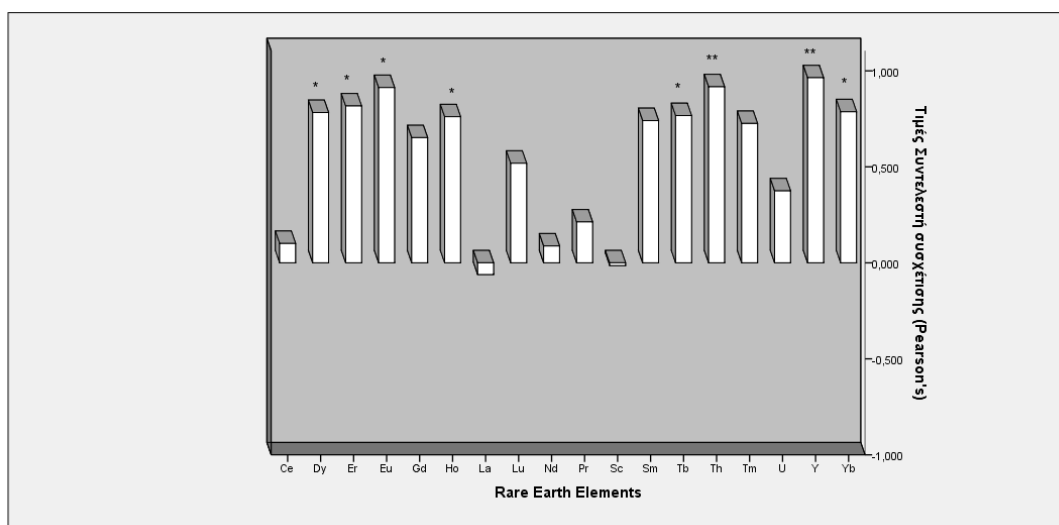
Σε δείγματαμανιταριών *C. cylindracea* ανεπτυγμένα σε πριονίδια με προέλευση την Κίνα διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του La ήταν μικρότερη από αυτή της παρούσας εργα-

Πίνακας 2.2.15. Συγκέντρωση σπάνιων γαιών σε μανιτάρια *C. cylindracea* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) τα οποία καλλιεργήθηκαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1  $\beta/\beta$ , CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1  $\beta/\beta$ , OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1  $\beta/\beta$ ), OS: Πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση, ( $n = 4$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0.05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

REEs	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
Ce	51 $\pm$ 18 <sup>Aa</sup>	81 $\pm$ 15 <sup>Aa</sup>	57 $\pm$ 10 <sup>Aa</sup>	31 $\pm$ 10 <sup>Aa</sup>	54.1 $\pm$ 5.4 <sup>Aa</sup>	68 $\pm$ 11 <sup>Aa</sup>	59 $\pm$ 24 <sup>Aa</sup>
Dy	0.58 $\pm$ 0.08 <sup>Bb</sup>	2.56 $\pm$ 0.25 <sup>Aa</sup>	0.80 $\pm$ 0.07 <sup>ABa</sup>	0.36 $\pm$ 0.08 <sup>Ba</sup>	0.54 $\pm$ 0.09 <sup>Ba</sup>	0.46 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	3.5 $\pm$ 1.4 <sup>Aa</sup>
Er	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>Bb</sup>	1.20 $\pm$ 0.29 <sup>Aa</sup>	0.58 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	0.23 $\pm$ 0.11 <sup>Ba</sup>	0.36 $\pm$ 0.07 <sup>Ba</sup>	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup>	1.73 $\pm$ 0.43 <sup>Aa</sup>
Eu	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>Bb</sup>	0.73 $\pm$ 0.00 <sup>ABa</sup>	0.40 $\pm$ 0.03 <sup>Ba</sup>	0.29 $\pm$ 0.06 <sup>Bb</sup>	0.28 $\pm$ 0.02 <sup>Bb</sup>	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>Bb</sup>	1.32 $\pm$ 0.36 <sup>Aa</sup>
Gd	0.85 $\pm$ 0.22 <sup>Ba</sup>	3.43 $\pm$ 0.82 <sup>Aa</sup>	3.99 $\pm$ 0.51 <sup>Aa</sup>	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	0.65 $\pm$ 0.21 <sup>Ba</sup>	0.61 $\pm$ 0.03 <sup>Ba</sup>	4.6 $\pm$ 1.2 <sup>Aa</sup>
Ho	0.13 $\pm$ 0.08 <sup>Ba</sup>	0.34 $\pm$ 0.15 <sup>ABa</sup>	0.05 $\pm$ 0.03 <sup>Ba</sup>	$\Delta$ .A.	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>Ba</sup>	$\Delta$ .A.	0.51 $\pm$ 0.11 <sup>Aa</sup>
La	13.2 $\pm$ 4.9 <sup>Aa</sup>	42.4 $\pm$ 1.7 <sup>Aa</sup>	32.2 $\pm$ 9.9 <sup>Aa</sup>	18.3 $\pm$ 5.4 <sup>Aa</sup>	30.0 $\pm$ 1.7 <sup>Aa</sup>	35.7 $\pm$ 4.3 <sup>Aa</sup>	24.3 $\pm$ 2.0 <sup>Aa</sup>
Lu	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>Aa</sup>	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>Aa</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>Aa</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>Aa</sup>	0.15 $\pm$ 0.05 <sup>Aa</sup>	0.22 $\pm$ 0.10 <sup>Aa</sup>
Nd	10.6 $\pm$ 2.4 <sup>ABa</sup>	25.3 $\pm$ 5.9 <sup>ABa</sup>	53.4 $\pm$ 8.9 <sup>Aa</sup>	3.05 $\pm$ 0.82 <sup>Bb</sup>	10.57 $\pm$ 0.25 <sup>ABa</sup>	11.9 $\pm$ 2.7 <sup>ABa</sup>	18.3 $\pm$ 2.2 <sup>ABa</sup>
Pr	3.70 $\pm$ 0.97 <sup>ABa</sup>	7.4 $\pm$ 1.9 <sup>Aa</sup>	5.3 $\pm$ 1.4 <sup>ABa</sup>	1.53 $\pm$ 0.70 <sup>Ba</sup>	3.80 $\pm$ 0.19 <sup>ABa</sup>	4.2 $\pm$ 1.2 <sup>ABa</sup>	5.30 $\pm$ 0.45 <sup>ABa</sup>
Sc	17.1 $\pm$ 4.1 <sup>Ab</sup>	14.3 $\pm$ 1.1 <sup>Ab</sup>	14.2 $\pm$ 2.3 <sup>Ab</sup>	8.0 $\pm$ 2.0 <sup>Ab</sup>	11.3 $\pm$ 1.7 <sup>Ab</sup>	11.31 $\pm$ 0.83 <sup>Ab</sup>	14.27 $\pm$ 0.10 <sup>Ab</sup>
Sm	1.03 $\pm$ 0.56 <sup>Ba</sup>	4.20 $\pm$ 0.42 <sup>Aa</sup>	1.21 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup>	0.78 $\pm$ 0.14 <sup>Ba</sup>	1.08 $\pm$ 0.29 <sup>Ba</sup>	0.95 $\pm$ 0.00 <sup>Ba</sup>	5.17 $\pm$ 0.45 <sup>Aa</sup>
Tb	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>Bb</sup>	0.40 $\pm$ 0.19 <sup>Aa</sup>	0.19 $\pm$ 0.04 <sup>Bb</sup>	0.06 $\pm$ 0.05 <sup>Bb</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>Bb</sup>	0.09 $\pm$ 0.03 <sup>Ba</sup>	0.52 $\pm$ 0.17 <sup>Aa</sup>
Th	0.86 $\pm$ 0.25 <sup>Cb</sup>	2.26 $\pm$ 0.37 <sup>Ba</sup>	1.07 $\pm$ 0.18 <sup>BCa</sup>	0.37 $\pm$ 0.15 <sup>Ca</sup>	0.84 $\pm$ 0.16 <sup>Ca</sup>	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>Cb</sup>	5.98 $\pm$ 0.49 <sup>Aa</sup>
Tm	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>Ba</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>Aa</sup>	$\Delta$ .A.	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>Bb</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>Ba</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>Aa</sup>
U	3.34 $\pm$ 0.30 <sup>Aa</sup>	2.91 $\pm$ 0.92 <sup>Aa</sup>	3.34 $\pm$ 0.72 <sup>Aa</sup>	0.96 $\pm$ 0.18 <sup>Ba</sup>	1.38 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup>	2.74 $\pm$ 0.64 <sup>ABa</sup>	3.18 $\pm$ 0.60 <sup>Aa</sup>
Y	3.70 $\pm$ 0.08 <sup>Cb</sup>	6.5 $\pm$ 1.3 <sup>BCa</sup>	4.6 $\pm$ 0.7 <sup>Ca</sup>	2.5 $\pm$ 0.3 <sup>Cb</sup>	3.2 $\pm$ 0.8 <sup>Cb</sup>	3.1 $\pm$ 1.1 <sup>Cb</sup>	18.5 $\pm$ 2.6 <sup>Aa</sup>
Yb	0.30 $\pm$ 0.05 <sup>Bb</sup>	1.02 $\pm$ 0.24 <sup>Aa</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>Ba</sup>	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>Bb</sup>	0.25 $\pm$ 0.00 <sup>Bb</sup>	1.38 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>

\*  $\Delta$ .A.: Δεν ανιχνεύτηκ

σίας (<10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), ενώ κατά πολύ μεγαλύτερες εμφανίστηκαν οι συγκεντρώσεις των Nd, Gd και Ho (Niedzielski et al., 2017). Συνοψίζοντας διαπιστώνεται ότι οι σπάνιες γαίες με μεγαλύτερη φυσική αφθονία (όπως τα Ce και La) δείχνουν μικρότερη διακύμανση στα μανιτάρια, τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών (Miezcek et al., 2018, Niedzielski et al., 2017), όσο και μεταξύ δειγμάτων του ίδιου είδους ανεπτυγμένα σε διαφορετικά υποστρώματα όπως διαπιστώθηκε τόσο από τα αποτελέσματα για *P. ostreatus* και *C. cylindracea* της παρούσας μελέτης όσο και από πρόσφατη εργασία των Rzymiski et al. (2017). Αντίθετα τα στοιχεία που συνήθως βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στο έδαφος και στους φυτικούς ιστούς (π.χ. τα Er, Gd, Ho, Lu και Nd) παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στα διαφορετικά είδη αλλά και μεταξύ μανιταριών του ίδιου είδους που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα. Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ συγκέντρωσης υποστρώματος και μανιταριών παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση για όλα τα στοιχεία, ενώ για οκτώ από αυτά (Dy, Er, Eu, Ho, Tb, Th, Y, Yb) η συσχέτιση ήταν στατιστικά σημαντική ( $r = 0,761 - 0,964$ ,  $p < 0,05$ , Γράφημα 2.2.9.).



Γράφημα 2.2.9 Συσχέτιση (Pearson's correlation coefficient) μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια *C. cylindracea* και των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων στα οποία αναπτύχθηκαν. \*Επίπεδο σημαντικότητας 5%, \*\* επίπεδο σημαντικότητας 1%.

### 2.2.3.12 Επίδραση των ιχνοστοιχείων στις καλλιεργητικές παραμέτρους και την σύσταση των μανιταριών *P. ostreatus* και *C. cylindracea*

Ο συντελεστής συσχέτισης (Pearson's) υπολογίστηκε για να διερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης των επιμέρους μετάλλων στις καλλιεργητικές παραμέτρους των *P. ostreatus* και *C. cylindracea*. Για το μεν *P. ostreatus*, σημαντική είναι η επίδραση όλων των

μετάλλων με εξαίρεση τα As, Cd και Co, τόσο στην αποδόμηση της ημικυτταρίνης ( $r = 0,966 - 1,000$ ,  $p < 0,01$ ) όσο και της κυτταρίνης ( $r = 0,861 - 0,899$ ,  $p < 0,05$ ) και κατ' επέκταση στη βιολογική αποδοτικότητα ( $r = 0,633 - 0,785$ ,  $p < 0,05$ ). Στο παρελθόν έχει μελετηθεί εκτενώς ο βιοχημικός ρόλος των μετάλλων στους μύκητες λευκής σήψης συμπεριλαμβανομένου και του *P. ostreatus*, αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα πολλών από αυτά στην παραγωγή ενζύμων και στην αύξηση του μυκηλίου. Η παραγωγή ημικυτταρινολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων από το *P. ostreatus* που αναπτύχθηκε σε άχυρο σίτου αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται θετικά από την παρουσία μετάλλων όπως τα Cu, Mn, Pb και Zn (Baldrian et al., 2005), ενώ η συγκέντρωση των Cu και Mn φαίνεται να προάγει την παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων όπως η λακκάση και η υπεροξειδάση εξαρτημένη του Mn (Baldrian et al., 2005, Palmieri et al., 2000). Όσον αφορά τη συγκέντρωση του Cd αποδεικνύεται ότι αυξάνει την ενεργότητα της λακκάσης στο *P. ostreatus* αλλά ταυτόχρονα μειώνει την παραγωγή ημικυτταρινολυτικών ενζύμων (Baldrian and Gabriel, 2003). Στα υποστρώματα GM και PN, η συγκέντρωση των Cu, Mn, Pb ήταν συγκριτικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υποστρώματα κάτι που πιθανότατα συνέβαλε στη μεγαλύτερη μείωση ημικυτταρίνης και κυτταρίνης λόγω της υψηλότερης ενεργότητας των ενζύμων που ευθύνονται για την αποδόμηση τους (Πίνακας 2.2.5.).

Από την εξέταση των συσχετίσεων μεταξύ της συγκέντρωσης των μετάλλων και της διατροφικής σύστασης των μανιταριών *P. ostreatus*, η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που προέκυψε αφορούσε τη θετική επίδραση του Cd στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ( $r = 0,884$ ,  $p < 0,01$ ) και την αρνητική στο ποσοστό των υδατανθράκων ( $r = -0,895$ ,  $p < 0,01$ ). Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύεται από τα ευρήματα των Chiu et al. (1998) σύμφωνα με τα οποία η προσθήκη  $CdCl_2$  σε υπόστρωμα άχυρου ή και υπολειμμάτων χάρτου, μετέβαλε σημαντικά το ποσοστό των αμινοξέων στο συγγενές είδος *Pleurotus pulmonarius*.

Όσον αφορά στο *C. cylindracea*, από τη διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ της συγκέντρωσης των ιχνοστοιχείων και των καλλιεργητικών παραμέτρων, προέκυψε ότι η συνολική συγκέντρωση των μετάλλων επηρεάζει θετικά την αποδόμηση της ημικυτταρίνης ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,05$ ), ενώ έχει αρνητική επίδραση στην μείωση της κυτταρίνης ( $r = -0,582$ ). Πιο συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της μείωσης της ημικυτταρίνης και της συγκέντρωσης των στοιχείων Be ( $r = 0,884$ ,  $p < 0,01$ ), Ca ( $r = 0,766$ ,  $p < 0,05$ ), Mg ( $r = 0,802$ ,  $p < 0,05$ ) και Mn ( $r = 0,764$ ,  $p < 0,05$ ), ενώ ήταν αρνητική μεταξύ της μείωσης της κυτταρίνης και της συγκέντρωσης των Pb ( $r = -0,768$ ,  $p < 0,05$ ), Sb ( $r = -0,777$ ,  $p < 0,05$ ) και V ( $r = -0,769$ ,  $p < 0,05$ ). Επιπλέον η μείωση της λιγνίνης αποδείχθηκε ότι

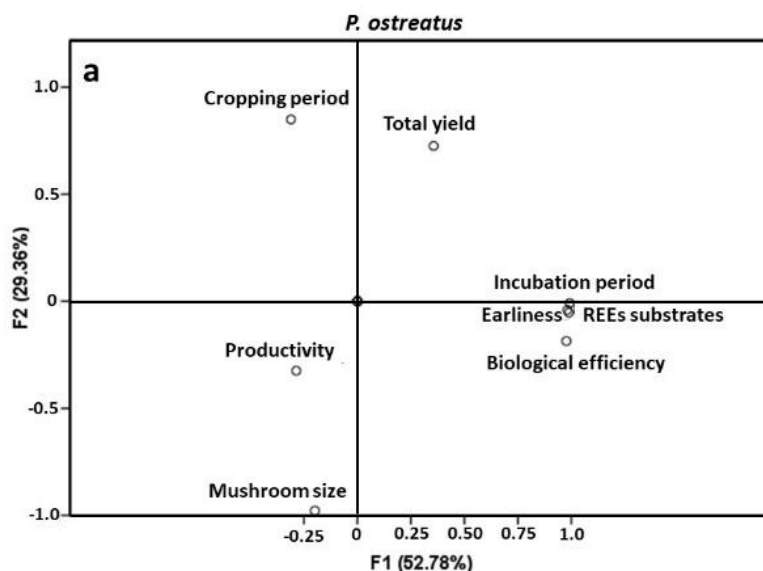
συσχετίζεται (αρνητικά) με τη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων Cr ( $r = -0,861, p < 0,05$ ) και Ni ( $r = -0,915, p < 0,01$ ). Τα μέταλλα για τα οποία αποδείχθηκε η συνεισφορά τους στη μείωση της ημικυτταρίνης παρουσίασαν στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση και με την παραγωγικότητα ( $r = 0,689 - 0,895, p < 0,05$ ). Το ίδιο διαπιστώθηκε και με τη συγκέντρωση των Fe ( $r = 0,809, p < 0,05$ ), Li ( $r = 0,917, p < 0,01$ ) και Sr ( $r = 0,756, p < 0,05$ ). Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν την άποψη ότι τα βαρέα μέταλλα (συμπεριλαμβανομένων των Cd, Cr, Ni, Pb) καθυστερούν ή και αναστέλλουν την έκφραση των λιγνολυτικών ενζύμων (Baldrian, 2003), ενώ κάποια απαραίτητα μέταλλα όπως τα Cu, Mn, Mg, Fe και Zn, συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής και της ενεργότητας εξωκυτταρικών ενζύμων που σχετίζονται με την αποδόμηση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων και κατ' επέκταση με την ανάπτυξη του μυκηλίου (Périeré and Gold, 1991, Singhal and Rathore, 2003).

Όσον αφορά την επίδραση της συγκέντρωσης των ιχνοστοιχείων του υποστρώματος στη σύσταση των μανιταριών, η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που προέκυψε αφορούσε τη θετική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του Na στα μανιτάρια και την συγκέντρωση των Pb ( $r = 0,785, p < 0,05$ ), Sb ( $r = 0,766, p < 0,05$ ) και Zn ( $r = 0,765, p < 0,05$ ).

### 2.2.3.13 Επίδραση των σπάνιων γαιών στις καλλιεργητικές παραμέτρους και την σύσταση των μανιταριών *P. ostreatus* και *C. cylindracea*

Η εφαρμογή της PCA μεταξύ των καλλιεργητικών παραμέτρων για το *P. ostreatus* και των συγκεντρώσεων των σπάνιων γαιών στα υποστρώματα καλλιέργειας έδειξε ότι ο χρόνος επώασης, η πρωιμότητα, η βιολογική αποδοτικότητα και η συγκέντρωση των συγκεκριμένων στοιχείων στο υπόστρωμα συσχετίζονται σημαντικά καθώς διατάσσονται στην ίδια πλευρά τόσο ως προς την PC1 (29,36%) όσο και ως προς την PC2 (52,78%), ενώ οι κύριες συνιστώσες εξηγούν αθροιστικά το 82,1% της συνολικής παραλλακτικότητας των παραγόντων που συμπεριλήφθηκαν (Γράφημα 2.2.10.). Αντίθετα φαίνεται ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των σπάνιων γαιών και της καλλιεργητικής περιόδου ( $r = -0,846, p < 0,05$ ). Όσον αφορά τα τρία κυριότερα μακρομόρια (ημικυτταρίνες, κυτταρίνη και λιγνίνη) τα οποία βρίσκονται σε όλα τα υποστρώματα και βιομετατρέπονται μέσω ενζυματικών διαδικασιών σε εδώδιμη βιομάζα από τον μύκητα *P. ostreatus*, η μείωση τους συσχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση των REEs ( $r = 0,665 - 0,826, p < 0,05, r = 0,638 - 0,764, p < 0,05$  και  $r = 0,135 - 0,347$  αντίστοιχα). Στη συνέχεια, το αποτέλεσμα αυτό έχει επίσης επίπτωση σε παραμέτρους που σχετίζονται με την απόδοση της καλλιέργειας όπως η βιολογική αποδοτικότητα και το μέσο βάρος των μανιταριών (Γράφημα 2.2.10). Τέλος αξίζει να

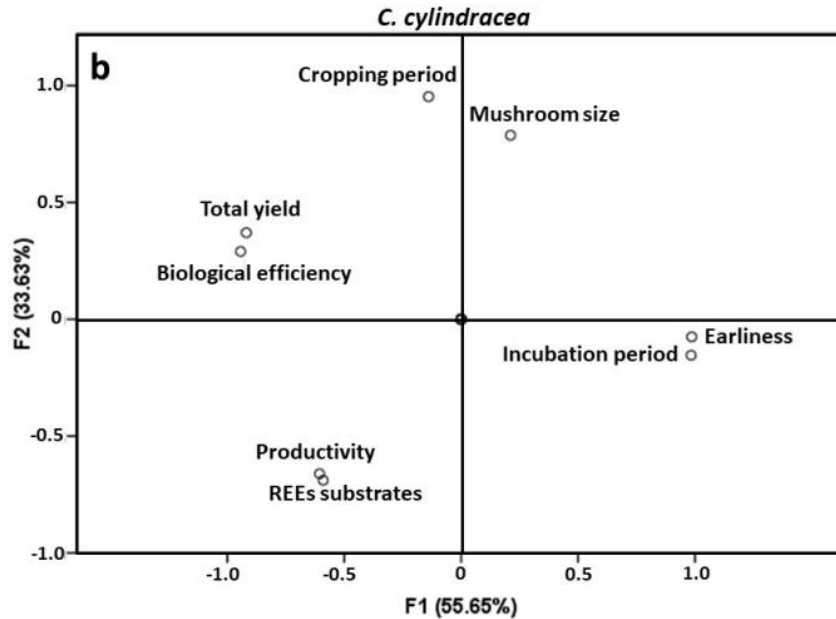
αναφερθεί ότι δεν ανιχνεύτηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης των σπανίων γαιών και της βασικής σύστασης των μανιταριών (πρωτεΐνες, λιπίδια, ινώδη συστατικά, τέφρα, υδατάνθρακες).



**Γράφημα 2.2.10.** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) μεταξύ των ολικών σπανίων γαιών στο υπόστρωμα και των καλλιεργητικών παραμέτρων που αφορούν την παραγωγή μανιταριών *P. ostreatus*.

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA) εφαρμόστηκε επίσης για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της συνολικής συγκέντρωσης των σπανίων γαιών του υποστρώματος και των καλλιεργητικών παραμέτρων που αφορούν το *C. cylindracea* (Γράφημα 2.2.11). Από το παραπάνω Γράφημα προκύπτει ότι η συγκέντρωση των σπανίων γαιών σχετίζεται στενά με την παραγωγικότητα, καθώς οι συγκεκριμένοι παράμετροι διατάσσονται πολύ κοντά τόσο ως προς τον PC1 όσο και ως προς τον PC2, οι οποίοι αθροιστικά εξηγούν το 89,68% της συνολικής διακύμανσης. Επιπλέον φαίνεται ότι συμβάλουν στην επιμήκυνση της καλλιεργητικής περιόδου και επηρεάζουν αρνητικά το μέσο βάρος των μανιταριών. Αναφορικά με την σχέση μεταξύ σπανίων γαιών του υποστρώματος και σύστασης των μανιταριών παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση μόνο με τα Na και K ( $r = 0,729$  και  $r = 0,769$  αντίστοιχα,  $p < 0,05$ ).

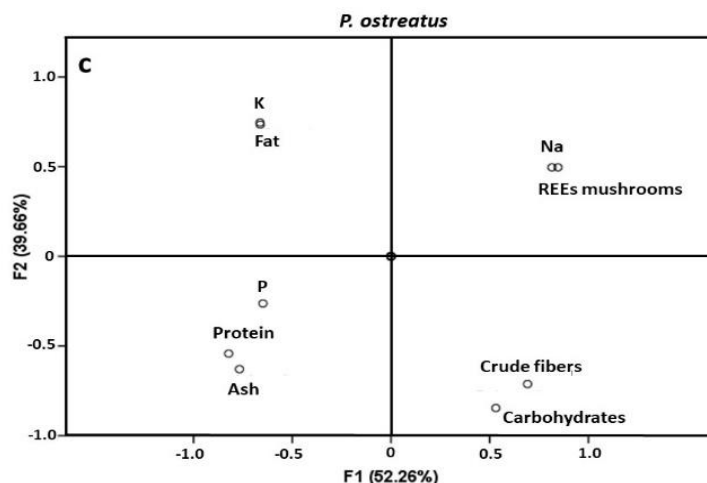




Γράφημα 2.2.11. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) μεταξύ των ολικών σπάνιων γαιών στο υπόστρωμα και των καλλιεργητικών παραμέτρων που αφορούν την παραγωγή μανιταριών *C. cylindracea*.

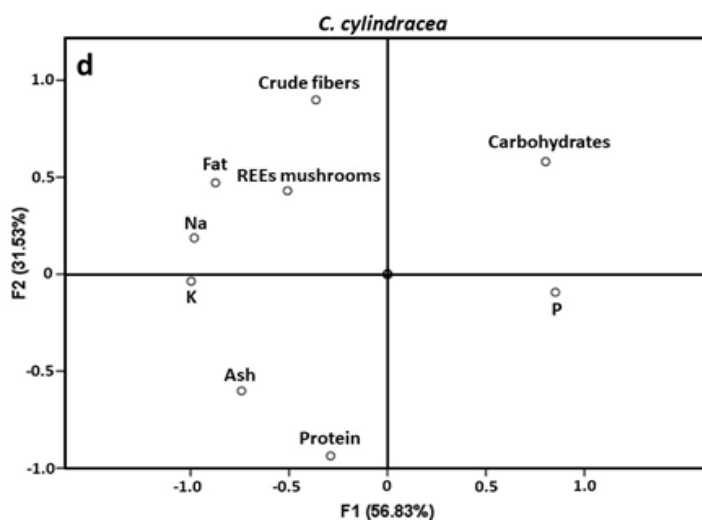
#### 2.2.3.14 Συσχετίσεις μεταξύ συγκέντρωσης σπάνιων γαιών και βασικής σύστασης στα μανιτάρια *P. ostreatus* και *C. cylindracea*

Προκειμένου να αποκτηθεί μια γενική εικόνα για τις σχέσεις μεταξύ της συγκέντρωσης των σπάνιων γαιών και της βασικής σύστασης των μανιταριών (ολικές πρωτεΐνες, ολικά λιπίδια, ινώδη συστατικά, ολικοί υδατάνθρακες, τέφρα, Na, P και K) πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis). Οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση εξηγούν το 91,9% της ολικής διακύμανσης των δεδομένων. Η προβολή των μεταβλητών που μετρήθηκαν στο καθορισμένο επίπεδο από τις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2 φαίνεται στην Γράφημα 2.2.13. Όπως προκύπτει από το Γράφημα η συγκέντρωση των σπάνιων γαιών στις καρποφορίες του *P. ostreatus* σχετίζεται στενά με τη συγκέντρωση του Na, ενώ όλες οι υπόλοιπες μεταβλητές τοποθετούνται μακριά υποδεικνύοντας μικρή ή και καμία συσχέτιση με την συγκέντρωση των σπάνιων γαιών.



Γράφημα 2.2.13. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) μεταξύ των ολικών σπάνιων γαιών στο υπόστρωμα και βασικής σύστασης και μακροστοιχείων σεμανιτάρια *P. ostreatus*.

Όσον αφορά στο *C. cylindracea*, οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση εξηγούν το 88.36% της ολικής διακύμανσης των δεδομένων. Προβολή των μεταβλητών που μετρήθηκαν στο καθορισμένο επίπεδο από τις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2 φαίνεται στο Γράφημα 2.2.14. Όπως προκύπτει από το γράφημα, η συνολική συγκέντρωση των σπάνιων γαιών σταμανιτάρια τοποθετείται στο ίδιο τεταρτημόριο τόσο με τα μακροστοιχεία K και Na όσο και με τα ολικά λιπίδια και τα ινώδη συστατικά τωνμανιταριών. Η παραπάνω παρατήρηση πιθανόν να οφείλεται σε συνεργιστική-ταυτόχρονη

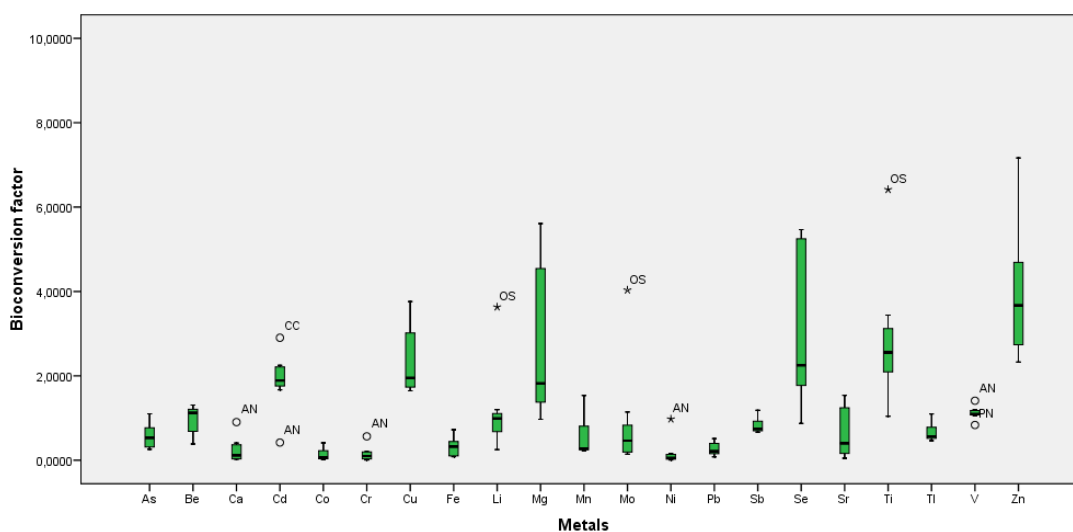


Γράφημα 2.2.14. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) μεταξύ των ολικών σπάνιων γαιών στο υπόστρωμα και βασικής σύστασης και μακροστοιχείων σεμανιτάρια *C. cylindracea*.

απορρόφηση των σπανίων γαιών και των K και Na, σε αντίθεση με το P, το οποίο τοποθετείται σε αντίθετο τεταρτημόριο και για τις δύο κύριες συνιστώσες υποδηλώνοντας ανταγωνιστική σχέση στη μεταξύ τους απορρόφηση.

### 2.2.3.15 Δείκτης βιοσυσσώρευσης ιχνοστοιχείων σεμανιτάρια *P. ostreatus* και *C. cylindracea* και εκτίμηση κινδύνου για ανθρώπινη κατανάλωση

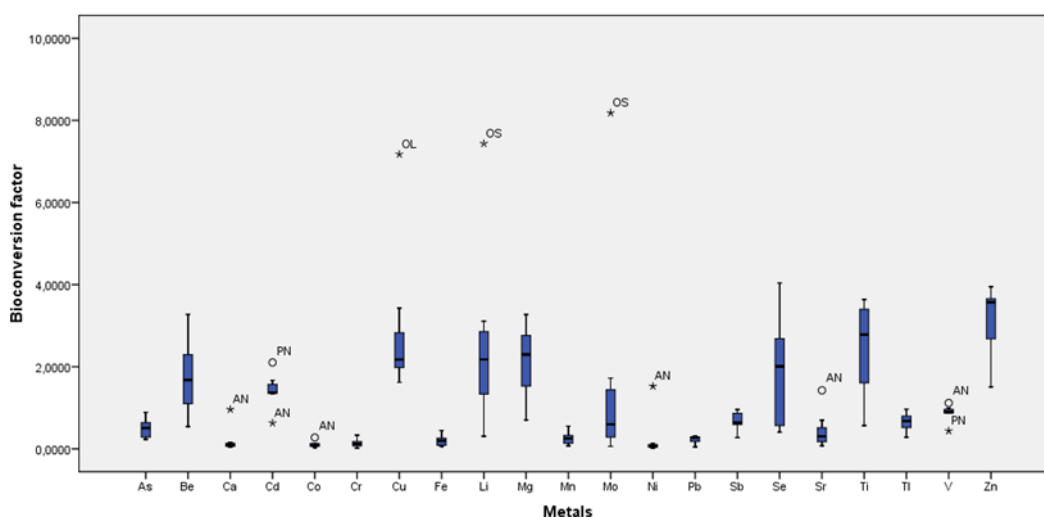
Ο δείκτης βιοσυσσώρευσης (bioconcentration factor, BCF) για τα μέταλλα και τις σπάνιες γαίες υπολογίστηκε ως ο λόγος της συγκέντρωσης κάθε στοιχείου στα μανιτάρια προς τη συγκέντρωση στα αντίστοιχα υποστρώματα ανάπτυξης. Για τους ζωντανούς οργανισμούς, η απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να χαρακτηριστούν αποδοτικοί στην απορρόφηση μετάλλων από το υπόστρωμα είναι ο δείκτης BCF να παίρνει τιμές μεγαλύτερες της μονάδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι μέσες τιμές του BCF για τα 21 ιχνοστοιχεία που εξετάστηκαν στην περίπτωση του *P. ostreatus* κυμάνθηκαν από 0,14 έως και 4,00 για τα Co και Zn αντίστοιχα (Γράφημα 2.2.15.).



**Γράφημα 2.2.15.** Δείκτης βιοσυσσώρευσης (BCF) ιχνοστοιχείων μανιταριών *P. ostreatus* που παρήχθησαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα. Το μέγεθος κάθε μπάρας αντιπροσωπεύει το 50% των τιμών, η μαύρη οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε στήλη τον διάμεσο και οι γραμμές σφάλματος τις ανώτερες και κατώτερες τιμές. Οι κύκλοι εκφράζουν τιμές μεγαλύτερες κατά 1,5-3 φορές από την μέγιστη/ελάχιστη τιμή ενώ οι αστερίσκοι τιμές μεγαλύτερες/μικρότερες του εύρους πάνω από 3 φορές.

Οι υψηλότερες τιμές για τα περισσότερα ιχνοστοιχεία εμφανίζονται στα υποστρώματα AN και OS, τα οποία είναι τα πιο φτωχά όσον αφορά την αρχική συγκέντρωση μετάλλων (Πίνακας 2.2.5) και ταυτόχρονα αυτά με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά λιπίδια. Με εξαίρεση τα στοιχεία Be και Cu (στα οποία δεν εμφανίστηκε καμία συσχέτιση),

για όλα τα υπόλοιπα παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης τους στον δείκτη BCF ( $r = -0,401$  έως  $-0,849$ ) αποδεικνύοντας ότι η αύξηση της συγκέντρωσης κάθε μετάλλου στο υπόστρωμα δεν οδηγεί σε αυξημένη περιεκτικότητα στις καρποφορίες. Όσον αφορά τη σύσταση και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υποστρώματος και την επίδραση τους στον BCF φαίνεται ότι η απορρόφηση αυξάνεται σε όξινο περιβάλλον για όλα τα μέταλλα ( $r = -0,098$  έως  $-0,855$  μεταξύ pH και BCF), ενώ αρνητική συσχέτιση εμφανίζεται μεταξύ BCF και συγκέντρωσης φωσφόρου ( $r = -0,159$  έως  $-0,982$ ). Επιπλέον αξιοσημείωτη είναι θετική συσχέτιση μεταξύ περιεκτικότητας σε ολικά λιπίδια του υποστρώματος και δείκτη BCF για όλα τα στοιχεία και ιδιαίτερα τα As, Co, Mo, Sb, Zn ( $r = 0,746$  έως  $-0,910$ ,  $p < 0,05$ ) πιθανόν λόγω αύξησης της βιοδιαθεσιμότητάς τους.



**Γράφημα 2.2.16.** Δείκτης βιοσυσσώρευσης (BCF) ιχνοστοιχείων μανιταριών *C. cylindracea*, ανεπτυγμένων σε επτά διαφορετικά υποστρώματα. Το μέγεθος κάθε μπάρας αντιπροσωπεύει το 50% των τιμών, η μαύρη οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε στήλη τον διάμεσο και οι γραμμές σφάλματος τις ανώτερες και κατώτερες τιμές. Οι κύκλοι εκφράζουν τιμές μεγαλύτερες κατά 1,5-3 φορές από την μέγιστη/ελάχιστη τιμή, ενώ οι αστερίσκοι τιμές μεγαλύτερες/μικρότερες του εύρους πάνω 3 φορές.

Από τη διερεύνηση των συσχετίσεων των τιμών BCF των επιμέρους στοιχείων προέκυψαν σημαντικές συσχετίσεις (θετικές και αρνητικές) οι οποίες παραπέμπουν σε συνεργιστική ή ανταγωνιστική απορρόφηση τους αντίστοιχα. Από τις πιο χαρακτηριστικές σχετικές περιπτώσεις είναι η ανταγωνιστική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του φωσφόρου και επικίνδυνων για την υγεία μετάλλων όπως τα Cr, Ni, Pb ( $r = -790$  έως  $-0,908$ ,  $p < 0,05$ ), η οποία σε συνδυασμό με την αρνητική συσχέτιση μεταξύ BCF των παραπάνω στοιχείων και συγκέντρωσης P στο υπόστρωμα, υποδεικνύει ότι ο φώσφορος μπορεί να λειτουργήσει

προστατευτικά έναντι της απορρόφησης βαρέων μετάλλων σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus*.

Ο δείκτης βιοσυσσώρευσης των ιχνοστοιχείων για το *C. cylindracea* παρουσιάζεται στην Γράφημα 2.2.16. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς οι τιμές των BCFs κυμάνθηκαν από 0,11 έως και 3,1 για τα Co και Zn αντίστοιχα.

Αξιοσημείωτες είναι οι τιμές για τα στοιχεία Cd (0,63 – 2,10), Cu (1,62 – 7,18), Li (0,31 – 7,44), Se (0,40 - 4,04) Ti (0,57 - ,64) και Zn (1,51 – 3,95) για τα οποία σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα ο δείκτης BCF έλαβε τιμές μεγαλύτερες της μονάδας, υποδεικνύοντας τη βιοσυσσώρευση τους στα μανιτάρια *C. cylindracea*. Συγκρίνοντας τα επτά διαφορετικά υποστρώματα μεταξύ τους, προκύπτει ότι για τα περισσότερα στοιχεία οι μικρότερες τιμές του BCF εμφανίστηκαν στο υπόστρωμα PN, το οποίο ήταν και το πιο πλούσιο σε ιχνοστοιχεία, ενώ πολύ υψηλές τιμές προέκυψαν και στα υποστρώματα AN και OS. Με εξαίρεση το Be, για όλα τα υπόλοιπα στοιχεία αποδείχθηκε η αρνητική συσχέτιση του BCF με την αρχική συγκέντρωση των στοιχείων στα υποστρώματα ανάπτυξης ( $r = -0,362$  έως  $-0,937$ ). Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώνει τα ευρήματα που προέκυψαν στην περίπτωση του *P. ostreatus* και αποδεικνύει ότι η βιοσυσσώρευση των ιχνοστοιχείων επιβραδύνεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις τους στο υπόστρωμα, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στο PN. Η σύσταση και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υποστρωμάτων επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την συσσώρευση των ιχνοστοιχείων στα μανιτάρια. Συγκεκριμένα για τα βαρέα μέταλλα As και Pb, αλλά και για το Se, η απορρόφηση τους ευνοείται σε όξινο περιβάλλον ( $r = -0,748, -0,844$  και  $-0,985, p < 0,01$  αντίστοιχα μεταξύ pH και τιμών του BCF), ενώ τα ίδια στοιχεία εμφάνισαν στατιστικά σημαντική (αρνητική) συσχέτιση με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε P ( $r = -0,893 -0,823$  και  $-0,914, p < 0,01$  αντίστοιχα). Επιπλέον ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση μεταξύ των τιμών του BCF για τα As, Mo και Sb και της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε ολικά λιπίδια ( $r = 0,658 - 0,880, p < 0,05$ ) κάτι που παρατηρήθηκε για τα ίδια στοιχεία και στην περίπτωση του *P. ostreatus*. Τέλος σημαντικές συσχετίσεις (θετικές και αρνητικές) παρατηρήθηκαν και μεταξύ των τιμών των BCF και της κύριας σύστασης των μανιταριών. Από τις πιο χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης P στα μανιτάρια και του BCF των Co, Cr, Fe, Mn, Ni και Sr ( $r = -0,878$  έως και  $0,990-, p < 0,01$ ), ενώ ανάλογα ευρήματα υπήρξαν και στην περίπτωση του *P. ostreatus* υποδηλώνοντας πιθανή προστατευτική δράση του P έναντι της απορρόφησης βαρέων μετάλλων στα μανιτάρια.

Για τον υπολογισμό της πρόσληψης μετάλλων μέσω της κατανάλωσηςμανιταριών *P. ostreatus* και *C. cylindracea* καλλιεργημένα σε διάφορα υποστρώματα, υιοθετήθηκε ως μέσο βάρος ενός ενήλικου ατόμου τα 60 kg σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιστημονική Επιτροπή για τη διατροφή ενηλίκων ατόμων (EFSA, 2012) και σαν ενδεικτική καταναλισκόμενη ποσότητα τα 300g φρέσκων μανιταριών, τα οποία ισοδυναμούν 30 g ξηρού βάρους (Kalac and Svoboda, 2000, Svoboda et al.,2000).

**Πίνακας 2.2.16. Υπολογισμός της πρόσληψης ιχνοστοιχείων μέσω της κατανάλωσης μανιταριών *P. ostreatus*, και ποσοστό κάλυψης του ανεκτού ορίου πρόσληψης ή της ημερήσιας συνιστώμενης δόσης (%) μέσω της κατανάλωσης μιας μερίδας μανιταριών για ενήλικο άτομο βάρους 60 kg.**

Ιχνοστοιχεία	TDI	RDI	Συγκέντρωση μανιταριών <i>P. ostreatus</i>	Ποσοστό κάλυψης TDI/RDI (%)	REFERENCE
As	0,128 mg/day*		0,037 - 0,071	28,9 - 55,5	WHO 2011
Be	0,120 mg/day*		0,084 - 0,289	70,0 - 240,8	WHO 2011
Ca		1000 mg/day	10,20 - 59,05	1,0 - 5,9	WHO and FAO 2004
Cd	0,060 mg/day		0,012 - 0,022	20,0 - 36,7	WHO 2011
Co		Δ.Α.	0,687 - 1,612	-	
Cr		2 - 8 μg /day	0,032 - 0,052	0,6 - 1,0	WHO 1996
Cu	10mg/day	2,2 mg / day	0,505 - 1,199	5,1 - 12,0	WHO 2011/ ICMR 1990
Fe	48 mg/day*	10 - 50mg/day	3,011 - 4,350	10,0 - 14,5	WHO 2011
Li		0,2 - 1,1 mg/day	0,011 - 0,034	1,7 - 5,2	US EPA 2015
Mg		310 - 420 mg/day	41,24 - 78,65	11,3 - 21,5	US NIY
Mn	11 mg day	3 mg/day	0,176 - 0,384	5,9 - 12,8	WHO 2011/USNRC 1989
Mo		0,1 - 0,3 mg/day	0,006 - 0,018	30,0 - 90,0	WHO 2011
Ni	0,720 mg/day		0,011 - 0,028	1,5 - 3,9	WHO 2011
Pb	0,214 mg/day		0,004 - 0,008	1,9 - 3,7	WHO 2011
Sb	0,36 mg/day*		0,048 - 0,095	13,3 - 26,4	WHO 2011
Se	320 - 480 mg/day	0,026 - 0,035 mg/day	0,002 - 0,066	6,6 - 216,4	WHO 2011
Sr	2400 mg / day		0,039 - 0,231	0,0 - 0,0	WHO 2010
Ti	Δ.Α.		0,637 - 1,385	-	
Tl	15,4 mg/day		0,171 - 0,232	1,1 - 1,5	US EPA 2015
V			0,048 - 0,067	-	
Zn	60 mg/day*	15 - 20mg/day	2,219 - 3,411	12,7 -19,5	WHO 2011

\* TDI: ανεκτή ημερήσια πρόσληψη, RDI: συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη

Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά και στον Πίνακα 2.2.16 παρουσιάζονται τα εύρη τιμών για κάθε στοιχείο σε συνδυασμό με την εκατοστιαία κάλυψη των ημερήσιων αναγκών ή την ημερήσια επιτρεπόμενη δόση (ανάλογα με την φύση του κάθε στοιχείου) που αφορούν την κατανάλωση μανιταριών *P. ostreatus*. Σύμφωνα με τα ανώτατα όρια πρόσληψης για τα βαρέα μέταλλα η συγκέντρωση των μανιταριών ξεπερνά την ημερήσια επιτρεπόμενη δόση μόνο στο Be (WHO, 2011), ενώ για τα υπόλοιπα δεν ξεπερνά το 55,5% της συγκεκριμένης δόσης (Πίνακας 2.2.15). Από τα υποστρώματα που μελετήθηκαν το CC δείχνει να επιβαρύνει περισσότερο τις καρποφορίες και συγκεκριμένα την συγκέντρωση As και Cd σε σχέση με τα υπόλοιπα.

**Πίνακας 2.2.17. Υπολογισμός της πρόσληψης ιχνοστοιχείων μέσω της κατανάλωσης μανιταριών *C. cylindracea* και ποσοστό κάλυψης του ανεκτού ορίου πρόσληψης ή της ημερήσιας συνιστώμενης δόσης μέσω της κατανάλωσης μιας μερίδας μανιταριών για ενήλικο άτομο βάρους 60 kg.**

Ιχνοστοιχεία	TDI	RDI	Συγκέντρωση μανιταριών C. <i>cylindracea</i>	Ποσοστό κάλυψης TDI/RDI (%)	REFERENCE
As	0,128 mg/day*		0,047 - 0,059	36,72 – 46,09	WHO 2011
Be	0,120 mg/day*		0,118 - 0,824	98,33 – 686,67	WHO 2011
Ca		1000 mg/day	10,98 - 32,28	1,10 – 3,23	WHO and FAO 2004
Cd	0,060 mg/day		0,009 - 0,020	15,00 – 33,33	WHO 2011
Co		Δ.Α.	0,630 - 1,190	-	
Cr		2 - 8 μg /day	0,029 - 0,041	0,58 – 0,82	WHO 1996
Cu	10mg/day	2,2 mg / day	0,594 - 1,413	5,94 – 14,13	WHO 2011/ ICMR 1990
Fe	48 mg/day*	10 - 50mg/day	1,345 - 3,580	4,48 – 11,93	WHO 2011
Li		0,2 - 1,1 mg/day	0,009 - 0,119	1,38 – 18,31	US EPA 2015
Mg		310 - 420 mg/day	37,92 - 71,65	10,39 – 19,63	US NIY
Mn	11 mg day	3 mg/day	0,099 - 0,178	3,30 – 5,93	WHO 2011/USNRC 1989
Mo		0,1 - 0,3 mg/day	0,003 - 0,020	15,00 – 100,00	WHO 2011
Ni	0,720 mg/day		0,013 - 0,024	1,81 – 3,33	WHO 2011
Pb	0,214 mg/day		0,005 - 0,009	2,34 – 4,21	WHO 2011
Sb	0,36 mg/day*		0,045 - 0,062	12,50 – 17,22	WHO 2011
Se	320 - 480 mg/day	0,026 - 0,035 mg/day	0,000 - 0,003	0,33 – 9,84	WHO 2011
Sr	2400 mg / day		0,028 - 0,117	0,00 – 0,00	WHO 2010
Ti	Δ.Α.		0,487 - 1,290	-	
Tl	15,4 mg/day		0,165 - 0,256	1,07 – 1,66	US EPA 2015
V			0,0391 - 0,050	-	
Zn	60mg/day*	15 - 20mg/day	1,384 - 3,042	7,91 – 17,38	WHO 2011

\* TDI: ανεκτή ημερήσια πρόσληψη, RDI: συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη

Όσον αφορά την κάλυψη των ημερήσιων αναγκών των απαραίτητων για τον ανθρώπινο οργανισμό ιχνοστοιχείων, σημαντική είναι η συνεισφορά των υπό εξέταση μανιταριών στα στοιχεία Zn, Mg και Mo καλύπτοντας ποσοστό έως και 19,5, 21,5 και 90% αντίστοιχα. Επιπλέον, η συνιστώμενη δοσολογία Se -το οποίο θεωρείται πλέον απαραίτητο

ιχνοστοιχείο για διάφορες λειτουργίες στο ανθρώπινο σώμα (Rayman, 2012)- μπορεί να υπερκαλυφθεί από την κατανάλωση μανιταριών *Pleurotus*, ιδιαίτερα αυτών που έχουν αναπτυχθεί στα υποστρώματα AN και PN (κάλυψη κατά 150 έως και 216 % της ημερήσιας συνιστώμενης δόσης). Σε αντίθεση με άλλα μέταλλα, των οποίων η πρόσληψη σε επίπεδα ανώτερα των συνιστώμενων μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση τοξικών φαινομένων, η υπερκάλυψη της ημερήσιας συνιστώμενης δόσης Se έχει συνδεθεί με αντική δράση (Hurwitz et al., 2007, Yu et al., 1997) αύξηση της γονιμότητας (Mistry et al., 2012) και μείωση του κινδύνου εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδούς (Gärtner et al., 2002, Turker et al., 2006).

Όσον αφορά στα μανιτάρια *C. cylindracea*, τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά και στον Πίνακα 2.2.17 παρουσιάζονται τα εύρη τιμών για κάθε στοιχείο σε συνδυασμό με την εκατοστιαία κάλυψη των ημερήσιων αναγκών ή την ημερήσια επιτρεπόμενη δόση (ανάλογα με το αν πρόκειται για τοξικό ή απαραίτητο για τον ανθρώπινο οργανισμό). Σύμφωνα με τα ανώτατα όρια πρόσληψης για τα βαρέα μέταλλα με εξαίρεση το Be το οποίο ξεπερνά κατά πολύ τα επιτρεπτά όρια για τα περισσότερα υποστρώματα (Πίνακα 2.2.17) για όλα τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα η ημερήσια κάλυψη δεν ξεπερνά το 46%. Όσον αφορά την πλήρωση των αναγκών των απαραίτητων για τον ανθρώπινο οργανισμό μέταλλα, τα μανιτάρια *C.cylindracea* και ιδιαίτερα αυτά που προέρχονται από τα υποστρώματα AN και OL μπορούν να καλύψουν πλήρως την ημερήσια ανάγκη σε Mo (Πίνακα 2.2.17) ενώ παρέχουν επίσης σημαντικές ποσότητες Cu, Li, Mg και Zn.

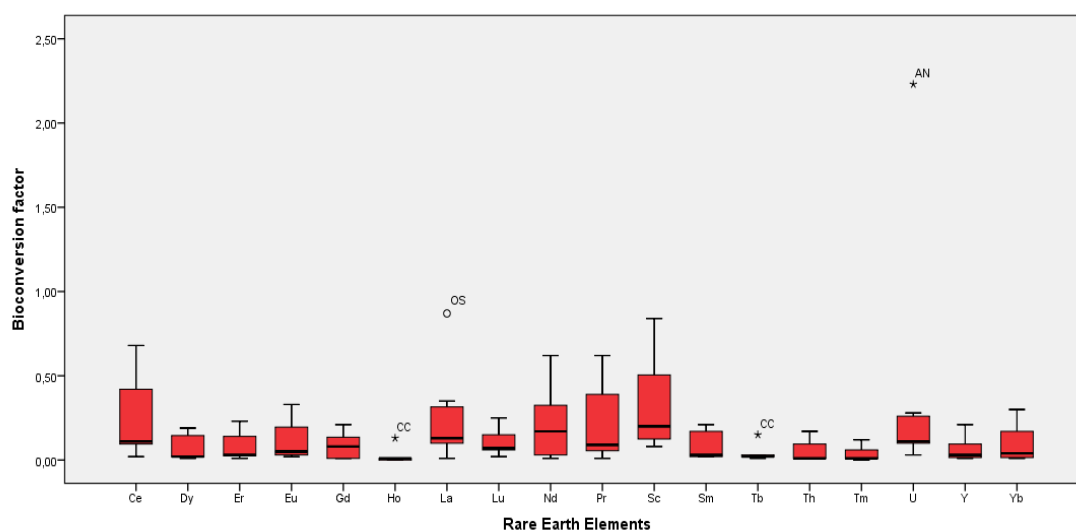
#### 2.2.3.16 Δείκτης βιοσυσώρευσης σπάνιων γαιών από μανιτάρια *P. ostreatus* και *C. cylindracea* και εκτίμηση κινδύνου για την κατανάλωση τους από τον άνθρωπο

Στην παρούσα εργασία οι τιμές των BCF για τις σπάνιες γαίες κυμάνθηκε από 0,00 μέχρι και 1,50 (Γράφημα 2.2.17). Οι μεγαλύτερες τιμές (>1) παρατηρήθηκαν για το ουράνιο (U) στο υπόστρωμα AN (1,50), καθώς και για το σκάνδιο (Sc) στα υποστρώματα AN και OS (1,31 και 1,21 αντίστοιχα). Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις οι τιμές του BCF εμφάνισαν τιμές μικρότερες του 1 και μόνο στα υποστρώματα AN και OS παρατηρήθηκαν τιμές μεγαλύτερες του 0,3. Γενικά, όπως και στην περίπτωση των ιχνοστοιχείων, χαμηλότερες τιμές εμφανίστηκαν σε υποστρώματα πλούσια σε σπάνιες γαίες όπως τα PN και CC και υψηλότερες τιμές σε υποστρώματα με σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις προέκυψε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη BCF και της συγκέντρωσης των σπάνιων



γαιών στα υποστρώματα ( $r = -0,328$  έως  $-0,929$ ). Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως η επίδραση της σύστασης του υποστρώματος στον δείκτη BCF ποικίλει και εξαρτάται από το κάθε στοιχείο. Αξιοσημείωτη είναι η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του pH του υποστρώματος με τον δείκτη BCF για το La ( $r = 0,792$ ,  $p < 0,05$ ) και η αρνητική με τον BCF του Lu ( $r = -0,966$ ,  $p < 0,01$ ). Όσον αφορά την επίδραση της βασικής σύστασης των μανιταριών στο δείκτη BCF αποδείχθηκε η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των περισσότερων σπάνιων γαιών (με εξαίρεση τα Ho, Lu, Tb και Tm) και της συγκέντρωσης P ( $r = 0,631 - 0,980$ ,  $p < 0,05$ ), η οποία πιθανόν να οφείλεται σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ τους, καθώς επίσης και η θετική συσχέτιση μεταξύ του BCF και της περιεκτικότητας σε ολικές πρωτεΐνες ( $r = 0,490 - 0,876$ ,  $p < 0,05$ ).

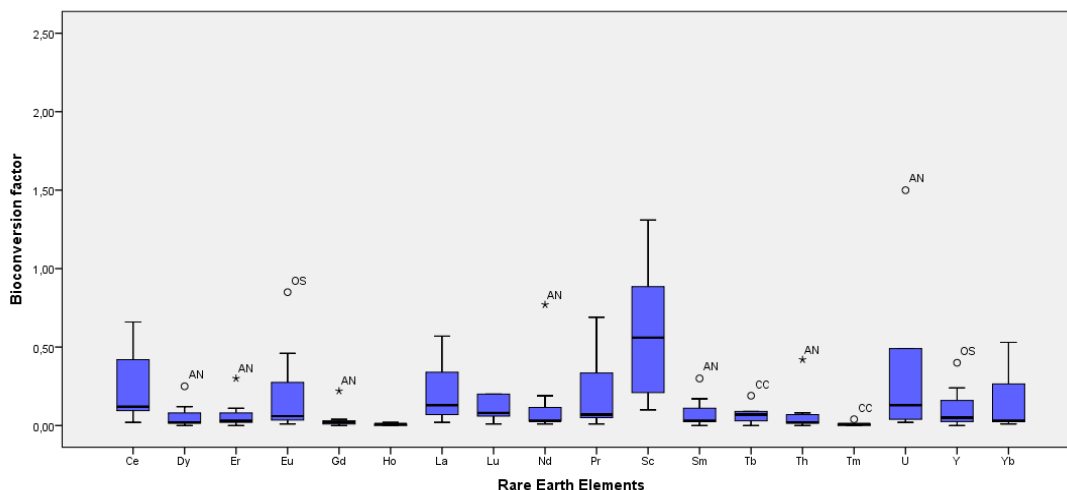
Η χρήση των σπάνιων γαιών κυρίως στη βιομηχανία έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια και αφορά κυρίως τα στοιχεία La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Sc, and Y (Gambogi 2011, Li et al. 2013). Επιπλέον η χρήση τους σε λιπάσματα σε συνδυασμό με μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία, κυρίως στην Κίνα, φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης τους στα εδάφη τα οποία εφαρμόζονται συστηματικά (Ramos et al., 2016).



**Γράφημα 2.2.17. Δείκτης βιοσυσσώρευσης (BCF) σπάνιων γαιών μανιταριών *P. ostreatus* ανεπτυγμένων σε επτά διαφορετικά υποστρώματα. Το μέγεθος κάθε στήλης αντιπροσωπεύει το 50% των τιμών, η μαύρη οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε στήλη τον διάμεσο και οι γραμμές σφάλματος τις ανώτερες και κατώτερες τιμές. Οι κύκλοι εκφράζουν τιμές μεγαλύτερες κατά 1,5-3 φορές από την μέγιστη/ελάχιστη τιμή ενώ οι αστερίσκοι τιμές μεγαλύτερες/μικρότερες του εύρους πάνω από 3 φορές.**

Αν και δεν έχει γίνει αποσαφηνιστεί η επίδραση τους στις λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος, πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι η χορήγηση σπάνιων γαιών συνδέεται με μείωση του οξειδωτικού στρες, αντιφλεγμονώδη δράση και αντιαγγειογόνο

δράση στον καρκίνο των ωοθηκών (Giri et al., 2013, Hirst et al., 2009, Li et al., 2013a). Όμως, υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία τους σχετίζεται με ασθένειες των πνευμόνων και τοξικότητα των νεφρών (Li et al., 2013b, Ould-Moussa et al., 2014, Pagano et al., 2015, Rim et al., 2013). Πάντως μέχρι σήμερα δεν έχουν θεσπιστεί επίσημα ανώτατα όρια για την πρόσληψη σπάνιων γαιών. Θεωρείται ότι προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία μπορούν να προκληθούν όταν η ημερήσια πρόσληψη ξεπερνά τα 100 – 110  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Li et al., 2013a).



**Γράφημα 2.2.18.** Δείκτης βιοσυσσώρευσης (BCF) σπάνιων γαιών μανιταριών *C. cylindracea* ανεπτυγμένων σε επτά διαφορετικά υποστρώματα. Το μέγεθος κάθε στήλης αντιπροσωπεύει το 50% των τιμών, η μαύρη οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε στήλη τον διάμεσο και οι γραμμές σφάλματος τις ανώτερες και κατώτερες τιμές. Οι κύκλοι εκφράζουν τιμές μεγαλύτερες κατά 1,5-3 φορές από την μέγιστη/ελάχιστη τιμή ενώ οι αστερίσκοι τιμές μεγαλύτερες/μικρότερες του εύρους πάνω από 3 φορές.

Από τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) σπάνιων γαιών μέσω της κατανάλωσης μανιταριών *C. cylindracea* υπολογίστηκε στα 0.034 – 0.098  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , ενώ για τα *P. ostreatus* υπολογίστηκε στα 0.046 – 0.081  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Οι προαναφερθείσες τιμές υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση μανιταριών των δύο ειδών ανεξαρτήτως του υποστρώματος ανάπτυξης τους οδηγεί σε πρόσληψη ποσότητας πολύ χαμηλότερης αυτής που μπορεί να έχει ανεπιθύμητες συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό (100 – 110  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Παρομοίως, σε 26 είδη εκτομυκοριζικών και σαπροτροφικών μανιταριών που συλλέχτηκαν από μη ρυπασμένες περιοχές της Τσεχίας, οι μέγιστες συγκεντρώσεις REEs αν και πολύ υψηλότερες από αυτές της παρούσας εργασίας συνοδεύτηκαν επίσης από πολύ χαμηλό EDI (0,365 και 0,487  $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$  αντίστοιχα) (Boronička et al., 2011). Η μέγιστη ημερήσια πρόσληψη που έχει αναφερθεί για μανιτάρια, καταγράφηκε στην Πολωνία και οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,295  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$  στο *Piptoporus betulinus* μέχρι και 2,515  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$  στο *Suillus luteus* (Mleczek et al., 2016). Ανάλογα

ευρήματα έχουν προκύψει από πρόσφατες μελέτες στις οποίες προσδιορίστηκε το περιεχόμενο καλλιεργήσιμων ή και αυτοφυών μανιταριών σε σπάνιες γαίες, από τα οποία επίσης προκύπτει ότι η συνολική τους συγκέντρωση είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή που δύναται να προκαλέσει προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία (Mlczek et al., 2018, Niedzielski et al., 2017, Rzymiski et al., 2017). Παρομοίως, οι Li et al. (2013a) απέδειξαν ότι η κατανάλωση οπωροκηπευτικών από περιοχές που γίνεται εξόρυξη των εν λόγω μετάλλων δεν οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των σπάνιων γαιών στο αίμα των καταναλωτών.

### 2.2.3.17 Αξιοποίηση των σπάνιων γαιών για πρόβλεψη της προέλευσης των μανιταριών

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των σπάνιων γαιών σε μανιτάρια *C. cylindracea* και *P. ostreatus* έγινε χρήση διακρίνουσας ανάλυσης (“discriminant analysis”) με σκοπό την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με το υπόστρωμα προέλευσης τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο με το προφίλ των σπάνιων γαιών ταξινομήθηκε σωστά το 86,6% των δειγμάτων στα υποστρώματα προέλευσης, ενώ τα δύο είδη διαχωρίστηκαν σε ποσοστό 94% (Πίνακας 2.2.18.). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενσωμάτωση στην ανάλυση των επιπλέον δεδομένων της βασικής σύστασης των μανιταριών είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διακριτικής ικανότητας και τον απόλυτα επιτυχή διαχωρισμό (100%) όλων των δειγμάτων ανάλογα με το υπόστρωμα προέλευσης και το είδος του μύκητα.

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η χρήση του αποτυπώματος των σπάνιων γαιών όχι μόνο μπορεί να αποτελέσει δείκτη για την ταυτοποίηση της γεωγραφικής προέλευσης σε διάφορα προϊόντα όπως το τσάι (Ma et al., 2016), η φάβα Σαντορίνης (Drivelos et al., 2014, το ελαιόλαδο (Farmaki et al., 2012) και τα πορτοκάλια (Hu et al., 2014), αλλά το συγκεκριμένο αποτύπωμα συνδέεται ευθέως με τα εδαφογεωλογικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής και επηρεάζεται ελάχιστα από εξωτερικούς παράγοντες (Drivelos et al., 2016a).

Η πιστοποίηση της προέλευσης αποτελεί σημαντικό κριτήριο για τα τρόφιμα και τα συστατικά τους και επεκτείνεται ταχέως τα τελευταία χρόνια σε παγκόσμιο επίπεδο, λόγω της νομοθετικής προστασίας και της ευαισθητοποίησης του καταναλωτικού κοινού. Στην περίπτωση των καλλιεργούμενων μανιταριών ο ακριβής προσδιορισμός του υποστρώματος είναι απαραίτητος για την πιστοποίηση της προέλευσης της παραγωγής, για το εάν χρησιμοποιούνται εναλλακτικά (μη συνήθη) υποστρώματα, για την υιοθέτηση ορθών περιβαλλοντικών πρακτικών ή την αναβάθμιση της διατροφικής αξίας.

Πίνακας 2.2.18. Ταξινόμηση των καλλιεργούμενων μανιταριών [% σωστή πρόβλεψη (αριθμός δειγμάτων)] σε επίπεδο είδους (*C. cylindracea* και *P. ostreatus*) και ανά υπόστρωμα καλλιέργειας [AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1 β/β, CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1 β/β, OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1 β/β), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα] με την βοήθεια της διακρίνουσας ανάλυσης και τη χρήση ή μόνο των δεδομένων των συγκεντρώσεων των σπάνιων γαιών (REEs), είτε σε συνδυασμό με τα δεδομένα της βασικής σύστασης των μανιταριών.

Παράμετροι που ενσωματώθηκαν στην ανάλυση	Ακρίβεια πρόβλεψης ταξινόμησης						
	Υποστρώματα						
	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
Σπάνιες γαίες	60% (5)	80% (5)	83% (6)	100% (4)	75% (4)	100% (5)	80% (5)
Σπάνιες γαίες + βασική σύσταση	100% (5)	100% (5)	100% (5)	100% (5)	100% (5)	100% (5)	100% (5)
	Είδη μανιταριών						
	<i>C. cylindracea</i>			<i>P. ostreatus</i>			
Σπάνιες γαίες	100% (19)			87% (15)			
Σπάνιες γαίες + βασική σύσταση	100% (19)			100% (15)			

## 2.2.4 Συμπεράσματα

Τα εννέα υπό διερεύνηση υποστρώματα (τα περισσότερα εκ των οποίων αποτελούνται από σημαντικά αγροτικά και δασικά παραπροϊόντα που παράγονται στην Μεσόγειο) παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση στην περιεκτικότητα μακροστοιχείων, ιχνοστοιχείων, σπάνιων γαιών και της βασικής σύστασης (ολικών λιπιδίων, ολικής πρωτεΐνης, τέφρας και ινωδών συστατικών) τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τη βιολογική αποδοτικότητα και την κατανομή της απόδοσης στα τρία κύματα καρποφορίας (αλλά όχι τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου) στα δύο είδη μανιταριών που εξετάστηκαν. Για το μεν *P. ostreatus*, το GM αποτέλεσε μακράν το αποδοτικότερο υπόστρωμα ακολουθούμενο από τα OL και PL, όλα αποδοτικότερα συγκριτικά με το άχυρο σίτου που αποτελεί το πιο διαδεδομένο υπόστρωμα, καθιστώντας τα εν δυνάμει αξιοποιήσιμα στην εμπορική καλλιέργεια. Σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της βιολογικής αποδοτικότητας και

της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε ολικές πρωτεΐνες, λιγνίνη, REEs και των περισσότερων μετάλλων και αρνητική με την ημικυτταρίνη και τους ολικούς υδατάνθρακες.

Η χρήση των εννέα διαφορετικών υποστρωμάτων για την παραγωγή μανιταριών του *C. cylindracea* είχε σαν αποτέλεσμα τη μεγάλη διαφοροποίηση των καλλιεργητικών παραμέτρων όπως η βιολογική αποδοτικότητα και η απόδοση ανά κύμα καρποφορίας. Το υπόστρωμα GM ήταν μακράν το αποδοτικότερο από αυτά που εξετάστηκαν ακολουθούμενο από το PN. Η βιολογική αποδοτικότητα στα προαναφερθέντα υποστρώματα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή στα WS και BS τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως στην καλλιέργεια του *C. cylindracea*, αποδεικνύοντας ότι μπορούν να αποτελέσουν ικανά εναλλακτικά υποστρώματα για την παραγωγή των εν λόγω μανιταριών. Όπως και στην περίπτωση του *P. ostreatus* έτσι και στο *C. cylindracea*, σημαντική θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της βιολογικής αποδοτικότητας και της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε άζωτο, λιγνίνη και τέφρα και αρνητική με την περιεχόμενη ημικυτταρίνη και τους υδατάνθρακες.

Στα εξαντλημένα υποστρώματα του *P. ostreatus* αποδείχθηκε η σημαντική μείωση της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης σε αντίθεση με την ελάχιστη μείωση της λιγνίνης. Η μείωση αυτή φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά τόσο από την συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων (όπως τα Cu, Mn και Zn) όσο και από την συγκέντρωση των σπάνιων γαιών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υψηλή περιεκτικότητα των αρχικών (μη εισέτι εμβολιασμένων από τον μύκητα) υποστρωμάτων σε ημικυτταρίνη και κυτταρίνη σχετίζεται με την χαμηλή περιεκτικότητα των εξαντλημένων υποστρωμάτων σε λιγνίνη και αντιστρόφως. Η μυκηλιακή βιομάζα στο εξαντλημένο υπόστρωμα παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων και φαίνεται να συσχετίζεται αρνητικά με την παραγωγικότητα σε μανιτάρια. Στα εξαντλημένα υποστρώματα του *C. cylindracea* σημειώθηκε μείωση των ημικυτταρινών και της κυτταρίνης, αλλά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με το *P. ostreatus*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υψηλή περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη και κυτταρίνη στο αρχικό υπόστρωμα σχετίζεται με την χαμηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη στο εξαντλημένο υπόστρωμα και αντίστροφα. Η υπολειπόμενη βιομάζα παρουσίασε μεγάλη διακύμανση στα εξαντλημένα υποστρώματα και συσχετίστηκε αρνητικά με την παραγωγικότητα. Η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα της μυκηλιακής βιομάζας σε πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση σε άζωτο και μέταλλα και την σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα της λιγνίνης, διευκολύνει την αξιοποίηση των εξαντλημένων υποστρωμάτων και ιδιαίτερα των PN, PL, OL και GM στην διατροφή των ζώων.

Η συγκέντρωση του αζώτου στο υπόστρωμα συσχετίστηκε θετικά με την περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη τόσο στο *P. ostreatus* όσο και στο *C. cylindracea*, παρουσιάζοντας τις υψηλότερες τιμές στα υποστρώματα AN, PN, OS και OL. Αντίθετα αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών λιπιδίων στα μανιτάρια με την περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε ολικά λιπίδια. Το υπόστρωμα PN παρουσίασε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση ιχνοστοιχείων και σπάνιων γαιών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υποστρώματα, αποδεικνύοντας ότι είναι ιδιαίτερα αποδοτικό στη βιοσυσσώρευση στοιχείων από το περιβάλλον και θα μπορούσε πιθανά να αξιοποιηθεί ως βιολογικός δείκτης ρύπανσης. Συγκριτικά με το *P. ostreatus* που καλλιεργήθηκε στα ίδια υλικά, το *C. cylindracea* περιείχε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση P και Be, αλλά μικρότερες ποσότητες Mn και Se. Για τα περισσότερα ιχνοστοιχεία και σπάνιες γαίες που μετρήθηκαν στα μανιτάρια, ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα PN. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η διατροφική σύσταση των καλλιεργούμενων μανιταριών μπορεί επιλεκτικά να τροποποιηθεί με την ανάλογη διαφοροποίησης της σύστασης του υποστρώματος.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα των μανιταριών σε βαρέα μέταλλα, με εξαίρεση το Be, δεν υπερβαίνει τα ημερήσια επιτρεπτά όρια, ενώ μεγάλο μέρος των ημερήσιων αναγκών σε απαραίτητα ιχνοστοιχεία δύναται να καλυφθεί μέσω της κατανάλωσης μανιταριών *P. ostreatus*. Ο δείκτης βιοσυσσώρευσης μετάλλων εξαρτάται από την φύση κάθε στοιχείου και σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίστηκε μεγαλύτερος της μονάδας, κατατάσσοντας το *P. ostreatus* στους ικανούς συσσωρευτές (όπως για παράδειγμα για τα μέταλλα Cu, Mg, Se και Zn). Ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις τόσο για τα ιχνοστοιχεία όσο και για τις σπάνιες γαίες φαίνεται να υπάρχει αρνητική συσχέτιση του BCF με την συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε. Στο *C. cylindracea*, από τα βαρέα μέταλλα και τις σπάνιες γαίες, μόνο το Be φαίνεται να υπερβαίνει την ημερήσια επιτρεπόμενη δοσολογία, ενώ σημαντικό ποσοστό των απαραίτητων ιχνοστοιχείων όπως των Cu, Mn και Zn μπορεί να καλυφθεί μέσω της κατανάλωσης μανιταριών του συγκεκριμένου είδους.

Οι αναλύσεις των σπάνιων γαιών, που για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκαν σε καλλιεργούμενα μανιτάρια και στα υποστρώματα στα οποία αναπτύχθηκαν, απέδειξαν ότι πολλά από τα στοιχεία διαφοροποιούνται μεταξύ των μανιταριών αναλόγως της φύσης του υποστρώματος. Επιπλέον το προφίλ των σπανίων γαιών αποδείχθηκε ότι μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των δύο ειδών μανιταριών που εξετάστηκαν αλλά και την πρόβλεψη του υποστρώματος από το οποίο προέκυψαν.





---

## Κεφάλαιο 2.3

---

**Αύξηση της περιεκτικότητας  
μανιταριών *Pleurotus* σε  
βιοδραστικά συστατικά μέσω της  
αξιοποίησης παραπροϊόντων  
ελαιουργίας και οινοποιίας ως  
υποστρώματων καλλιέργειας**

### 2.3.1 Εισαγωγή

Στο παρόν Κεφάλαιο επιλέχθηκαν τα δύο βασικά παραπροϊόντα που έδειξαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις (στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα ελαιοκομίας και ελαιουργίας) κατά την υλοποίηση των πειράματων που συμπεριλήφθηκαν στο Κεφάλαιο 2.2, ενώ ταυτόχρονα παράγονται σε τεράστιες ποσότητες στην Ελλάδα και στις υπόλοιπες Μεσογειακές χώρες και εξετάστηκε η δυνατότητα τους να αποτελέσουν υποστρώματα ανάπτυξης εδώδιμων μανιταριών που ανήκουν στα είδη *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. nebrodensis* και *P. citrinopileatus*.

Στόχοι ήταν η αξιολόγηση διαφόρων μειγμάτων των παραπάνω υλικών αυτούσια ή σε συνδυασμό με άχυρο ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη αναλογία που μεγιστοποιεί την απόδοση σε μανιτάρια σε κάθε είδος μύκητα και αφετέρου ο προσδιορισμός επιλεγμένων βιοδραστικών ενώσεων στις παραγόμενες καρποφορίες και η διερεύνηση της τυχόν επίδρασης που ασκούν τα υπό εξέταση υποστρώματα στη διατροφική αξία των τελικών προϊόντων.

### 2.3.2 Υλικά και μέθοδοι

#### 2.3.2.1 Βιολογικό υλικό

Τρία στελέχη του είδους *P. ostreatus* (*P. ostreatus* LGM 22, *P. ostreatus* LGAM 217, and *P. ostreatus* LGAM 104), τρία αντιπροσωπευτικά της ομάδας του *P. eryngii* (*P. eryngii* LGAM 216, *P. eryngii* LGAM 170, and *P. nebrodensis* UPA 6) καθώς και το στέλεχος *P. citrinopileatus* 3040, εξετάστηκαν στα πλαίσια του παρόντος πειράματος. Όλα προέρχονται από απομονώσεις αυτοφυών μανιταριών εκτός από το τελευταίο το οποίο αποτελεί διαδεδομένο εμπορικό στέλεχος (SYLVAN S.A.) και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στη συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.

#### 2.3.2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την υλοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν στέμφυλα οινοποιίας (GM) και απόβλητα ελαιοτριβείων δύο φάσεων (TPOMW) τα οποία προήλθαν από οινοποιείο που

εδρεύει στη Νεμέα και ελαιοτριβείο από την περιοχή της Καλαμάτας αντίστοιχα. Τα πειράματα οργανώθηκαν σε δύο στάδια. Το πρώτο περιλαμβάνει τη συγκριτική αξιολόγηση των 7 στελεχών σε τρία βασικά υποστρώματα [i) OL:TPOMW παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων, 1:1 β/β), ii) GM:WS στέμφυλα οινοποιίας και άχυρο σίτου (1:1 β/β) και iii) WS: άχυρο σίτου] για τη διερεύνηση της καταλληλότητας αυτών στην παραγωγή μανιταριών και την υποστήριξη ικανοποιητικών αποδόσεων.

Στο κύριο πείραμα επιλέχθηκαν 3 στελέχη (ένα από κάθε είδος *P. ostreatus*, *P. eryngii* και *P. nebrodensis*) και καλλιεργήθηκαν σε οκτώ διαφορετικά υποστρώματα αποτελούμενα από διαφορετικές αναλογίες των GM και TPOMW με τα κύρια υλικά των υποστρωμάτων [άχυρο σίτου (WS) και φύλλα ελιάς (OL) αντίστοιχα]. Τα μείγματα που εξετάστηκαν ήταν τα ακόλουθα: GM σε αναλογίες 3:1, 1:1 και 1:3 με WS (w/w) και TPOMW σε αναλογίες 3:1, 1:1 και 1:3 με OL. Επιπλέον υποστρώματα αποτελούμενα μόνο από φύλλα ελιάς (OL) και άχυρο σίτου (WS) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Η προετοιμασία του πολλαπλασιαστικού υλικού και των υποστρωμάτων έγινε όπως περιγράφεται στις Παραγράφους 2.1.2.2 και 2.2.2.2 αντίστοιχα. Οι πειραματικές μονάδες είχαν βάρος 2 kg και συμπεριλήφθηκαν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Οι καλλιεργητικοί παράμετροι που καταγράφηκαν ήταν όμοιες με αυτές της παραγράφου 2.1.2.3, ενώ οι χημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα μανιτάρια (ολικά φαινολικά, επιμέρους φαινολικά και τερπενικά συστατικά, αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων, εργοστερόλη και γλουκάνες) περιγράφηκαν στην Παράγραφο 2.1.2. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν επιπλέον τα ολικά φαινολικά, τα επιμέρους φαινολικά και τερπενικά συστατικά και η συγκέντρωση του σκουαλενίου στα υποστρώματα ανάπτυξης. Οι διαδικασίες των εκχυλίσεων και του τελικού προσδιορισμού ήταν όμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τα μανιτάρια.

### 2.3.2.3 Προσδιορισμός σκουαλενίου στα υποστρώματα ανάπτυξης

Ο προσδιορισμός του σκουαλενίου στα υποστρώματα ανάπτυξης έγινε με τη χρήση συσκευής αέριας χρωματογραφίας (GC-MS). Αρχικά πραγματοποιήθηκε σαπωνοποίηση των λυοφιλωμένων δειγμάτων και ακολούθησε σιλυλίωση με BSTFA όπως και για τον προσδιορισμό της εργοστερόλης (Παράγραφος 2.1.2.5), ενώ η χοληστερόλη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Η ταυτοποίηση του σκουαλενίου βασίστηκε στο

χρόνο κατακράτησης των εσωτερικών προτύπων και τη σύγκριση των φασμάτων μάζας σε NIST 98 (NIST MS search v6.1d) βιβλιοθήκη φασμάτων μάζας.

### 2.3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 2.3.3.1 Αξιολόγηση καλλιεργητικών παραμέτρων ειδών *Pleurotus* ανεπτυγμένων σε παραπροϊόντα ελαιουργίας και οινοποιίας

Σύμφωνα με τη μελέτη των αποτελεσμάτων των καλλιεργητικών παραμέτρων, η εμφάνιση των μανιταριών προηγήθηκε στο υπόστρωμα GM:WS για όλα τα στελέχη *P. ostreatus* που εξετάστηκαν (τιμές πρωιμότητας 11-22 ημέρες και 25-31 στο συμβατικό υπόστρωμα) όπως και στα υπόλοιπα είδη (18-35 ημέρες έναντι 22-37 ημέρες στο άχυρο) παρουσιάζοντας όμως μικρότερες διαφορές (Πίνακας 2.3.1). Η υψηλή συγκέντρωση σε εύκολα αφομοιώσιμα οργανικά συστατικά (κυρίως σε απλά σάκχαρα και ημικυτταρίνες) και η απουσία ανασταλτικών για την ανάπτυξη των μυκήτων ενώσεων μπορούν να εξηγήσουν την επιτάχυνση του σχηματισμού και ανάπτυξης των μανιταριών. Αντίθετα η χρήση του μείγματος φύλλων ελιάς και αποβλήτων ελαιοτριβείου δύο φάσεων ως υπόστρωμα, καθυστέρησε σημαντικά την εμφάνιση των μανιταριών του *P. ostreatus* (από 5 έως και 19 ημέρες σε σχέση με το μάρτυρα) κάτι το οποίο παρατηρήθηκε τόσο στην περίπτωση του *Hericium erinaceus* όσο και του *Cyclocybe cylindracea* (βλ. κεφάλαια 2.5 και 2.6). Ωστόσο αυτή η αρνητική επίδραση παρουσιάστηκε ιδιαίτερα αμβλυμένη στην περίπτωση των ειδών *P. eryngii* και *P. nebrodensis* (πρωιμότητα 31-36 ημέρες στο υπόστρωμα OL:TPOMW έναντι 26-37 στα υπόλοιπα υποστρώματα, Πίνακας 2.3.1) πιθανόν λόγω της πιο γρήγορης και αποδοτικής αποδόμησης των τοξικών συστατικών των ελαιουργικών παραπροϊόντων από τα εν λόγω είδη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα στελέχη του *P. ostreatus* φαίνεται να ανακάμπτουν αργότερα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής διαδικασίας στο υπόστρωμα OL:TPOMW και ως εκ τούτου η συνολική διάρκεια της καλλιέργειας δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τριών υποστρωμάτων. Για όλα τα στελέχη, με εξαίρεση το είδος *P. nebrodensis* το οποίο παρουσίασε βραχύτερη καλλιεργητική περίοδο στο υπόστρωμα WS, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου μεταξύ των τριών διαφορετικών υποστρωμάτων (Πίνακας 2.3.1).

Όσον αφορά την δυνατότητα των υπό εξέταση υποστρωμάτων να υποστηρίξουν την παραγωγή μανιταριών, το WS:GM απέδωσε καλύτερα στα είδη *P. eryngii* και *P. nebrodensis*

με βάση τις τιμές βιολογικής αποδοτικότητας (48-87%) και παραγωγικότητας (0,63 – 1,35) που καταγράφηκαν, χωρίς ωστόσο οι τιμές της τελευταίας να είναι σημαντικά υψηλότερες από τον μάρτυρα (Πίνακας 2.3.1). Όσον αφορά τα *P. ostreatus* και *P. citrinopileatus*, τόσο ο μάρτυρας όσο και το υπόστρωμα WS:GM εμφάνισαν υψηλές τιμές βιολογικής αποδοτικότητας (45-107%) και παραγωγικότητας (0,83-2,02), ενώ στο υπόστρωμα που αποτελείται από παραπροϊόντα ελαιουργίας εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές. Παρά το γεγονός ότι το υπόστρωμα OL:TPOMW έδειξε να είναι το λιγότερο κατάλληλο για την παραγωγή μανιταριών του είδους *P. nebrodensis*, εντούτοις εμφάνισε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καλλιέργεια του *P. eryngii*, παρουσιάζοντας σημαντικά μεγαλύτερες τιμές βιολογικής αποδοτικότητας και παραγωγικότητας σε σχέση με τα άλλα δύο υπό εξέταση υποστρώματα. Αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων μανιταριών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέσο μέγεθος των καρποφοριών. Η μόνη εμφανής και αξιοσημείωτη διαφοροποίηση ήταν το σημαντικά σκουρότερο χρώμα της επιφάνειας του πύλου των μανιταριών *P. eryngii* όταν αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα OL:TPOMW (Εικόνα 2.3.1).



Εικόνα 2.3.1. Καρποφορίες του στελέχους *P. eryngii* LGAM 216 σε υποστρώματα WS (α), WS:GM (β) και OL:TPOMW (γ).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν τρία στελέχη που ανήκουν στα είδη *P. ostreatus*, *P. eryngii* και *P. nebrodensis* με κριτήριο την πρωιμότητα εμφάνισης των καρποφοριών και τη βιολογική αποδοτικότητα στα υπό εξέταση υποστρώματα, για περαιτέρω διερεύνηση των καλλιεργητικών τους παραμέτρων αλλά και για την ενδελεχή μελέτη της συγκέντρωσης επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών στις παραγόμενες καρποφορίες.

**Πίνακας 2.3.1. Καλλιεργητικές παράμετροι στελεχών *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *P. nebrodensis* και *P. citrinopileatus* κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε τρία διαφορετικά υποστρώματα [GM+WS: στέμφυλα οινοποιίας και άχυρο σίτου (1:1 w/w), OL+TPOMW: φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (1:1 w/w), και WS: άχυρο σίτου (μάρτυρας)]. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (n = 5). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων για κάθε στέλεχος.**

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Πρωιμότητα (ημέρες)	Καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	Απόδοση 1 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 2 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 3 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Συνολική απόδοση	Βιολογική αποδοτικότητα (%)	Παραγωγικότητα	Βάρος μανιταριών (g)
<i>P. ostreatus</i> LGAM 104	WS	24.50±0.57 <sup>b</sup>	67.25±9.50 <sup>a</sup>	185.00±8.52 <sup>ab</sup>	93.00±47.23 <sup>a</sup>	53.25±45.89 <sup>a</sup>	331.25±24.10 <sup>a</sup>	106.68±7.76 <sup>a</sup>	1.62±0.29 <sup>a</sup>	9.00±0.83 <sup>b</sup>
	GM+WS	18.50±3.78 <sup>b</sup>	53.75±5.19 <sup>a</sup>	226.25±52.77 <sup>a</sup>	70.00±20.05 <sup>a</sup>	46.75±38.01 <sup>a</sup>	343.00±68.71 <sup>a</sup>	98.03±19.63 <sup>a</sup>	1.83±0.32 <sup>a</sup>	12.84±3.19 <sup>b</sup>
	OL+TPOMW	44.00±6.08 <sup>a</sup>	74.67±16.26 <sup>a</sup>	98.00±49.50 <sup>b</sup>	26.67±17.07 <sup>a</sup>	2.33±1.04 <sup>a</sup>	132.50±0.71 <sup>b</sup>	26.95±0.14 <sup>b</sup>	0.39±0.12 <sup>b</sup>	28.25±7.20 <sup>a</sup>
<i>P. ostreatus</i> LGAM 217	WS	25.00±0.82 <sup>a</sup>	44.67±10.12 <sup>a</sup>	133.25±54.92 <sup>b</sup>	53.25±32.27 <sup>a</sup>	16.25±9.89 <sup>a</sup>	202.75±122.51 <sup>ab</sup>	79.66±33.13 <sup>a</sup>	0.83±0.15 <sup>b</sup>	21.74±5.97 <sup>a</sup>
	GM+WS	11.40±0.89 <sup>b</sup>	49.50±4.04 <sup>a</sup>	222.25±40.26 <sup>a</sup>	66.20±46.69 <sup>a</sup>	20.60±12.88 <sup>a</sup>	313.25±76.64 <sup>a</sup>	84.14±22.47 <sup>a</sup>	1.92±0.23 <sup>a</sup>	17.23±8.90 <sup>a</sup>
	OL+TPOMW	30.00±7.90 <sup>a</sup>	63.00±19.27 <sup>a</sup>	47.25±11.44 <sup>c</sup>	20.40±11.82 <sup>a</sup>	6.20±4.55 <sup>a</sup>	99.00±16.71 <sup>b</sup>	17.86±5.62 <sup>b</sup>	0.31±0.15 <sup>c</sup>	15.00±4.00 <sup>a</sup>
<i>P. ostreatus</i> LGM 22	WS	31.00±0.00 <sup>b</sup>	33.50±0.71 <sup>a</sup>	170.50±20.51 <sup>a</sup>	17.50±4.95 <sup>b</sup>	22.50±0.71 <sup>b</sup>	210.50±24.75 <sup>ab</sup>	67.79±7.97 <sup>a</sup>	2.02±0.21 <sup>a</sup>	9.47±1.14 <sup>a</sup>
	GM+WS	22.25±0.96 <sup>c</sup>	36.50±4.51 <sup>a</sup>	107.00±11.53 <sup>b</sup>	35.00±7.00 <sup>a</sup>	21.25±32.15 <sup>b</sup>	157.67±14.98 <sup>b</sup>	45.06±4.28 <sup>b</sup>	1.23±0.10 <sup>b</sup>	6.98±0.50 <sup>a</sup>
	OL+TPOMW	41.50±2.12 <sup>a</sup>	64.00±4.24 <sup>b</sup>	105.67±26.31 <sup>b</sup>	32.33±12.74 <sup>a</sup>	124.50±34.65 <sup>a</sup>	272.50±14.85 <sup>a</sup>	55.43±3.02 <sup>ab</sup>	0.78±0.11 <sup>c</sup>	11.84±3.19 <sup>a</sup>
<i>P. eryngii</i> LGAM 216	WS	34.25±2.50 <sup>a</sup>	61.33±13.32 <sup>a</sup>	129.00±28.28 <sup>b</sup>	32.67±28.31 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	178.00±29.70 <sup>b</sup>	57.33±9.57 <sup>b</sup>	0.83±0.13 <sup>b</sup>	26.60±2.77 <sup>a</sup>
	GM+WS	26.00±0.71 <sup>c</sup>	65.20±2.17 <sup>a</sup>	153.60±36.79 <sup>ab</sup>	89.00±36.54 <sup>a</sup>	40.20±29.36 <sup>a</sup>	305.25±31.11 <sup>a</sup>	87.24±8.89 <sup>a</sup>	1.35±0.18 <sup>a</sup>	39.17±9.53 <sup>a</sup>
	OL+TPOMW	30.60±1.14 <sup>b</sup>	65.60±4.22 <sup>a</sup>	231.25±30.63 <sup>a</sup>	98.40±47.71 <sup>a</sup>	11.50±9.00 <sup>a</sup>	360.50±43.38 <sup>a</sup>	73.33±8.82 <sup>ab</sup>	1.12±0.08 <sup>ab</sup>	34.84±4.51 <sup>a</sup>
<i>P. eryngii</i> LGAM 70	WS	37.33±1.53 <sup>a</sup>	81.50±12.12 <sup>a</sup>	113.25±18.26 <sup>a</sup>	6.00±4.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	119.25±9.47 <sup>a</sup>	38.41±3.05 <sup>a</sup>	0.42±0.06 <sup>b</sup>	99.17±28.40 <sup>a</sup>
	GM+WS	35.40±3.44 <sup>a</sup>	57.75±13.05 <sup>a</sup>	132.80±49.14 <sup>a</sup>	31.60±31.38 <sup>a</sup>	4.20±3.39 <sup>a</sup>	168.60±51.32 <sup>a</sup>	48.19±14.67 <sup>a</sup>	0.63±0.03 <sup>a</sup>	60.91±30.09 <sup>a</sup>
	OL+TPOMW	35.60±2.19 <sup>a</sup>	61.00±9.49 <sup>a</sup>	156.40±39.48 <sup>a</sup>	37.80±24.52 <sup>a</sup>	13.80±9.85 <sup>a</sup>	208.00±72.80 <sup>a</sup>	42.31±14.80 <sup>a</sup>	0.61±0.15 <sup>ab</sup>	75.79±26.93 <sup>a</sup>
<i>P. nebrodensis</i> UPA 6	WS	31.00±2.1 <sup>a</sup>	47.3±0.60 <sup>b</sup>	77.2±21.0 <sup>a</sup>	30.2±12.6 <sup>b</sup>	δπ	107.5±21.3 <sup>b</sup>	35.9±13.8 <sup>b</sup>	0.76±0.17 <sup>a</sup>	62.6±11.3 <sup>a</sup>
	GM+WS	28.00±2.16 <sup>a</sup>	68.25±5.91 <sup>a</sup>	62.75±11.24 <sup>a</sup>	105.75±10.60 <sup>a</sup>	39.25±29.46 <sup>a</sup>	207.75±34.52 <sup>a</sup>	60.80±11.53 <sup>a</sup>	0.89±0.13 <sup>a</sup>	53.38±13.10 <sup>a</sup>
	OL+TPOMW	32.00±1.41 <sup>a</sup>	62.00±0.00 <sup>a</sup>	58.50±2.12 <sup>a</sup>	δπ	δπ	58.50±2.12 <sup>c</sup>	11.90±0.43 <sup>c</sup>	0.19±0.01 <sup>b</sup>	58.50±2.12 <sup>a</sup>
<i>P. citrinopileatus</i> 3040	WS	21.75±1.71 <sup>a</sup>	59.00±4.34 <sup>a</sup>	117.00±21.68 <sup>a</sup>	34.25±7.36 <sup>b</sup>	15.50±6.68 <sup>a</sup>	166.75±51.28 <sup>b</sup>	53.70±16.51 <sup>b</sup>	0.84±0.30 <sup>b</sup>	8.55±2.35 <sup>a</sup>
	GM+WS	18.25±0.50 <sup>a</sup>	54.00±2.83 <sup>a</sup>	100.25±20.32 <sup>a</sup>	135.75±18.63 <sup>a</sup>	38.75±13.26 <sup>a</sup>	274.75±5.80 <sup>a</sup>	78.52±1.66 <sup>a</sup>	1.46±0.10 <sup>a</sup>	8.62±2.70 <sup>a</sup>
	OL+TPOMW	27.00±9.00 <sup>a</sup>	62.00±9.75 <sup>a</sup>	41.6±18.43 <sup>b</sup>	39.00±8.85 <sup>b</sup>	36.20±14.06 <sup>a</sup>	129.00±17.51 <sup>b</sup>	26.24±3.56 <sup>c</sup>	0.46±0.11 <sup>b</sup>	9.46±2.65 <sup>a</sup>

δπ: δεν παρήχθησαν μανιτάρια

Τα επιλεχθέντα στελέχη ήταν τα *P. ostreatus* LGM22, *P. eryngii* LGM216 και *P. nebrodensis* UPA6 τα οποία αξιολογήθηκαν σε 8 διαφορετικά υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα αχύρου σίτου (WS), στέμφυλων οινοποιίας (GM), φύλλων ελιάς (OL) και αποβλήτου ελαιοτριβείων δύο φάσεων (TPOMW) στις αναλογίες που φαίνονται στον Πίνακα 2.3.2.

Από τη μελέτη των καλλιεργητικών παραμέτρων στα οκτώ υπό εξέταση υποστρώματα προέκυψε αρχικά ότι η πρωιμότητα στην εμφάνιση των μανιταριών επηρεάστηκε διαφορετικά από τη σύσταση του υποστρώματος για κάθε ένα από τα τρία είδη. Στο *P. ostreatus* απαιτήθηκε σημαντικά λιγότερο χρονικό διάστημα στον μάρτυρα (WS) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, ενώ η αύξηση του ποσοστού των στέμφυλων και του αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων επιβράδυνε την εμφάνιση των πρώτων καρποφοριών. Αντίθετα στην περίπτωση των δύο συγγενών ειδών *P. eryngii* και *P. nebrodensis* σημειώθηκε αρνητική επίδραση εξαιτίας του υποστρώματος μόνο όταν το άχυρο αντικαταστάθηκε από τα φύλλα ελιάς (Πίνακας 2.3.2). Όσον αφορά τη βιολογική αποδοτικότητα, το είδος *P. ostreatus* έδωσε κατά 40% μεγαλύτερες τιμές όταν καλλιεργήθηκε στον μάρτυρα (WS) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Αντίθετα στο *P. eryngii* οι τιμές της βιολογικής αποδοτικότητας αυξήθηκαν με την προσθήκη στέμφυλων στο υπόστρωμα σε αναλογία μέχρι και 50%, ενώ περαιτέρω αύξηση σημειώθηκε στο υπόστρωμα OL:TPOMW 3:1 (82%). Τέλος στην περίπτωση του *P. nebrodensis*, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων που αποτελούνταν από άχυρο ή μείγματα αχύρου με στέμφυλα. Σημαντική όμως μείωση επέφερε η προσθήκη αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων στο υπόστρωμα κάτι που είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη απουσία μανιταριών στο υπόστρωμα OL:TPOMW 1:3, λόγω της υψηλής τοξικότητας του συγκεκριμένου μείγματος και της αδυναμίας του εν λόγω στελέχους να ολοκληρώσει την ανάπτυξη του.

Όσον αφορά την παραγωγικότητα, οι μέγιστες τιμές παρατηρήθηκαν στον μάρτυρα (WS) και για τα τρία στελέχη εξαιτίας της βραχύτερης διάρκειας της καλλιεργητικής περιόδου στο συγκεκριμένο υπόστρωμα (3,05, 3,78 και 1,49 για τα είδη *P. ostreatus*, *P. eryngii* και *P. nebrodensis* αντίστοιχα). Στα είδη *P. ostreatus* και *P. nebrodensis*, οι τιμές ήταν σημαντικά μικρότερες σε όλα τα “εναλλακτικά” υποστρώματα που δοκιμάστηκαν συγκριτικά με τον μάρτυρα, ενώ δεν παρουσίασαν έντονες διαφορές μεταξύ τους. Αντίθετα, στο *P. eryngii*, υψηλότερες τιμές εμφανίστηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν στέμφυλα (1,70 – 2,15) σε σχέση με αυτά που αποτελούνταν από παραπροϊόντα ελαιοκομίας (0,46-1,64), λόγω της

μεγαλύτερης διάρκειας που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση του κύκλου παραγωγής στα τελευταία.

Σε προηγούμενες εργασίες έχουν αναφερθεί τιμές βιολογικής αποδοτικότητας από 41 έως και 96% για το *P. eryngii* παραγόμενο σε διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα (Kirbag and Akyuz, 2008, Mishra et al., 2013, Philippoussis et al., 2001, Rodriguez Estrada et al., 2009, Zervakis et al., 2013) και από 50-137% για το *P. ostreatus* ανεπτυγμένο σε μεγάλο εύρος –εμπλουτισμένων ή μη- αγροβιομηχανικών υπολειμμάτων συμπεριλαμβανομένου κομποστοποιημένου αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) (Κεφάλαιο 2.1., Isikhuemhen and Mikiashvilli, 2009, Philippoussis et al., 2001, Ruiz-Rodriguez et al., 2010, Zervakis et al., 2013), ενώ δεν υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα για την παραγωγή μανιταριών του είδους *P. nebrodensis*. Σε γενικές γραμμές, υψηλή διακύμανση παρατηρείται στις τιμές των καλλιεργητικών παραμέτρων όταν προστίθενται στο υπόστρωμα απόβλητα από ελαιοτριβείο δύο φάσεων, λόγω της μεγάλης διακύμανσης στις φυσικοχημικές παραμέτρους οι οποίες επηρεάζονται από την διαδικασία επεξεργασίας της ελιάς, την ποικιλία που χρησιμοποιείται και τις καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται (Aggoun, et al., 2016, Ntougias et al., 2013).

### 2.3.3.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης επιλεγμένων οργανικών συστατικών στα υποστρώματα καλλιέργειας

Της ανάλυσης των εκχυλισμάτων μανιταριών προηγήθηκε ο προσδιορισμός των πολυφαινολών (ολικών και επιμέρους φαινολικών), της ρεσβερατρόλης, των τερπενικών συστατικών και του σκουαλενίου σε όλα τα υποστρώματα καλλιέργειας που μελετήθηκαν με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό 18 επιμέρους συστατικών (Πίνακας 2.3.3). Γενικά, μετρήθηκαν υψηλές τιμές συγκεντρώσεων για εν λόγω συστατικά, οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε στέμφυλα ή σε απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου που εξηγείται από τη φύση των συγκεκριμένων παραπροϊόντων (Romero et al., 2018, Teixeira et al., 2014). Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση στην περίπτωση των υδροξυβενζοϊκών οξέων, της ρεσβερατρόλης, των τερπενικών ενώσεων και του σκουαλενίου τα οποία ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλές ή και μηδενικές συγκεντρώσεις στο συμβατικό υπόστρωμα (άχυρο σίτου), ενώ με την προσθήκη των στέμφυλων η περιεκτικότητά τους αυξάνεται κατά μία έως τρεις τάξεις μεγέθους (π.χ. στην περίπτωση του p-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος και του ολεανολικού οξέος στον μάρτυρα σε σύγκριση με το υπόστρωμα WS:GMC 1:3).



**Πίνακας 2.3.2 Καλλιεργητικοί παράμετροι των ειδών *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* και *Pleurotus nebrodensis* κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε οκτώ διαφορετικά υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα τεσσάρων βασικών υλικών (GM: στέμφυλα οينوποιίας, OL: φύλλα ελιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων και WS: άχυρο σίτου. Όλες οι αναλογίες είναι εκφρασμένες σε w/w. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε μέσους όρους ± τυπική απόκλιση ( $n=5$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$ -test.  $P < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων σε κάθε είδος.**

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Πρωιμότητα (ημέρες)	Καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	Απόδοση 1 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 2 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 3 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Συνολική απόδοση (g)	Βιολογική αποδοτικότητα (%)	Παραγωγικότητα	Βάρος μανιταριών (g)
<i>P. ostreatus</i> LGM22	WS	23.25±1.26 <sup>e</sup>	33.75±6.34 <sup>b</sup>	146.57±15.60 <sup>a</sup>	105.57±31.84 <sup>a</sup>	48.85±17.12 <sup>bc</sup>	301.00±44.92 <sup>a</sup>	100.45±14.97 <sup>a</sup>	3.05±0.68 <sup>a</sup>	8.75±2.29 <sup>abc</sup>
	WS:GM 3:1	31.5±1.00 <sup>d</sup>	33.50±4.43 <sup>b</sup>	91.54±22.66 <sup>b</sup>	41.97±15.53 <sup>b</sup>	69.19±25.17 <sup>b</sup>	202.70±10.33 <sup>b</sup>	62.75±3.17 <sup>b</sup>	1.89±0.19 <sup>b</sup>	11.03±3.94 <sup>ab</sup>
	WS:GM 1:1	33.75±0.96 <sup>cd</sup>	35.75±8.38 <sup>b</sup>	47.05±6.09 <sup>c</sup>	47.06±17.08 <sup>b</sup>	26.65±2.64 <sup>c</sup>	100.77±27.08 <sup>cd</sup>	29.65±7.95 <sup>cd</sup>	0.86±0.25 <sup>c</sup>	5.63±1.56 <sup>cd</sup>
	WS:GM 1:3	47.25±1.71 <sup>a</sup>	43.25±5.12 <sup>b</sup>	49.32±18.90 <sup>c</sup>	22.29±16.54 <sup>b</sup>	23.71±12.95 <sup>c</sup>	83.47±18.59 <sup>d</sup>	24.78±5.56 <sup>d</sup>	0.58±0.16 <sup>c</sup>	3.58±1.23 <sup>c</sup>
	OL	32.33±2.52 <sup>cd</sup>	46.67±13.32 <sup>b</sup>	45.24±29.12 <sup>c</sup>	45.80±9.79 <sup>b</sup>	22.03±10.40 <sup>c</sup>	113.07±32.58 <sup>cd</sup>	29.27±8.42 <sup>cd</sup>	0.68±0.21 <sup>c</sup>	4.43±1.92 <sup>c</sup>
	OL:TPOMW 3:1	33.33±0.58 <sup>cd</sup>	62.33±6.11 <sup>a</sup>	78.73±21.88 <sup>bc</sup>	55.19±2.92 <sup>b</sup>	30.97±15.18 <sup>bc</sup>	164.88±48.84 <sup>bc</sup>	46.23±13.69 <sup>bc</sup>	0.74±0.17 <sup>c</sup>	4.57±1.33 <sup>bc</sup>
	OL:TPOMW 1:1	41.50±2.12 <sup>b</sup>	64.00±4.24 <sup>a</sup>	105.67±26.31 <sup>b</sup>	32.33±12.74 <sup>b</sup>	124.50±34.65 <sup>a</sup>	221.00±59.82 <sup>b</sup>	56.72±3.02 <sup>b</sup>	0.87±0.01 <sup>c</sup>	11.84±3.19 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 1:3	34.30±0.58 <sup>c</sup>	43.00±9.54 <sup>b</sup>	44.04±12.63 <sup>c</sup>	39.55±11.71 <sup>b</sup>	63.44±5.01 <sup>b</sup>	125.88±41.36 <sup>cd</sup>	26.61±7.97 <sup>d</sup>	0.59±0.20 <sup>c</sup>	4.57±1.39 <sup>bc</sup>	
<i>P. eryngii</i> LGAM 216	WS	26.00±0.00 <sup>c</sup>	22.50±4.18 <sup>c</sup>	173.02±26.71 <sup>a</sup>	15.75±4.25 <sup>c</sup>	2.54±1.07 <sup>b</sup>	191.30±25.32 <sup>bcd</sup>	63.88±8.44 <sup>ab</sup>	3.78±1.11 <sup>a</sup>	24.63±9.36 <sup>a</sup>
	WS:GM 3:1	26.00±0.00 <sup>c</sup>	37.50±1.73 <sup>bc</sup>	151.34±32.68 <sup>ab</sup>	41.05±14.13 <sup>bc</sup>	46.45±15.10 <sup>ab</sup>	238.83±69.10 <sup>abc</sup>	73.93±21.40 <sup>ab</sup>	1.99±0.64 <sup>bc</sup>	33.78±12.12 <sup>a</sup>
	WS:GM 1:1	26.00±0.82 <sup>c</sup>	36.00±0.82 <sup>bc</sup>	164.01±24.84 <sup>a</sup>	26.42±14.52 <sup>bc</sup>	72.34±19.29 <sup>a</sup>	262.77±44.39 <sup>abc</sup>	77.25±13.05 <sup>ab</sup>	2.15±0.35 <sup>b</sup>	27.45±15.20 <sup>a</sup>
	WS:GM 1:3	26.00±0.00 <sup>c</sup>	34.75±6.65 <sup>bc</sup>	137.41±49.63 <sup>ab</sup>	22.59±13.49 <sup>bc</sup>	27.84±13.53 <sup>ab</sup>	187.83±61.94 <sup>bcd</sup>	55.78±18.39 <sup>ab</sup>	1.70±0.77 <sup>bc</sup>	18.78±11.31 <sup>a</sup>
	OL	30.00±1.00 <sup>b</sup>	38.67±5.51 <sup>bc</sup>	53.08±28.58 <sup>b</sup>	91.67±29.73 <sup>ab</sup>	16.73±8.98 <sup>ab</sup>	161.48±14.17 <sup>cd</sup>	41.77±3.69 <sup>bc</sup>	1.09±0.15 <sup>bc</sup>	20.97±7.94 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 3:1	26.00±1.00 <sup>c</sup>	51.33±6.66 <sup>ab</sup>	122.90±30.75 <sup>ab</sup>	117.12±30.86 <sup>a</sup>	54.09±11.60 <sup>ab</sup>	294.11±64.48 <sup>ab</sup>	82.43±18.06 <sup>a</sup>	1.64±0.51 <sup>bc</sup>	41.03±13.28 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 1:1	30.75±1.26 <sup>ab</sup>	65.25±4.79 <sup>ab</sup>	231.25±30.63 <sup>a</sup>	117.75±23.21 <sup>a</sup>	11.50±3.00 <sup>b</sup>	360.50±43.38 <sup>a</sup>	74.23±8.82 <sup>ab</sup>	1.12±0.08 <sup>bc</sup>	34.84±4.51 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 1:3	32.33±0.58 <sup>a</sup>	38.67±7.77 <sup>bc</sup>	42.81±12.10 <sup>b</sup>	38.48±16.23 <sup>bc</sup>	6.17±3.68 <sup>b</sup>	87.46±24.73 <sup>d</sup>	18.50±7.31 <sup>c</sup>	0.46±0.11 <sup>c</sup>	29.97±19.16 <sup>a</sup>	
<i>P. nebrodensis</i> UPA 6	WS	47.00±5.35 <sup>ab</sup>	25.75±6.08 <sup>d</sup>	77.21±20.96 <sup>a</sup>	30.25±12.64 <sup>a</sup>	δπ	107.46±31.34 <sup>a</sup>	35.87±13.08 <sup>a</sup>	1.49±0.28 <sup>a</sup>	62.59±21.33 <sup>a</sup>
	WS:GM 3:1	48.33±1.53 <sup>ab</sup>	40.00±1.00 <sup>bcd</sup>	56.07±13.94 <sup>a</sup>	35.30±10.84 <sup>a</sup>	δπ	91.37±24.74 <sup>a</sup>	28.28±13.85 <sup>a</sup>	0.71±0.26 <sup>ab</sup>	56.07±13.94 <sup>a</sup>
	WS:GM 1:1	46.00±4.58 <sup>ab</sup>	26.67±8.14 <sup>cd</sup>	95.55±21.87 <sup>a</sup>	29.57±11.22 <sup>a</sup>	δπ	125.12±32.78 <sup>a</sup>	36.80±10.23 <sup>a</sup>	1.26±0.45 <sup>ab</sup>	95.55±21.87 <sup>a</sup>
	WS:GM 1:3	40.33±1.15 <sup>b</sup>	44.67±9.41 <sup>abc</sup>	49.79±6.05 <sup>a</sup>	47.93±18.09 <sup>a</sup>	29,74±7,09 <sup>a</sup>	127.46±6.12 <sup>a</sup>	37.58±1.82 <sup>a</sup>	0.89±0.25 <sup>ab</sup>	42.56±18.22 <sup>a</sup>
	OL	51.00±8.00 <sup>ab</sup>	47.33±0.58 <sup>ab</sup>	60.94±12.72 <sup>a</sup>	37.74±14.43 <sup>a</sup>	10,69±5,52 <sup>b</sup>	133.59±17.93 <sup>a</sup>	34.57±4.64 <sup>a</sup>	0.73±0.11 <sup>ab</sup>	48.88±14.77 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 3:1	56.67±2.52 <sup>a</sup>	62.00±0.00 <sup>a</sup>	58.50±1.50 <sup>a</sup>	δπ	δπ	58.50±1.50 <sup>b</sup>	11.90±0.31 <sup>b</sup>	0.19±0.00 <sup>b</sup>	58.50±1.50 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 1:1	57.33±3.51 <sup>a</sup>	22.33±8.62 <sup>d</sup>	65.58±22.90 <sup>a</sup>	δπ	δπ	65.58±12.90 <sup>b</sup>	18.39±12.03 <sup>ab</sup>	1.11±0.27 <sup>ab</sup>	65.58±22.90 <sup>a</sup>	

δπ: δεν παρήχθησαν μανιτάρια

Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και για τα υδροξυκιναμικά οξέα, στα οποία όμως παρουσιάστηκαν πολύ μικρότερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων. Όσον αφορά τα υποστρώματα με βάση τα ελαιουργικά παραπροϊόντα, η περιεκτικότητά τους στα εξεταζόμενα συστατικά ή αυξανόταν σημαντικά είτε μειωνόταν με την προσθήκη του αποβλήτου διαφασικού ελαιοτριβείου ανάλογα με την φύση της εξεταζόμενης χημικής ένωσης. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών και του σκουαλενίου παρουσιάστηκε αυξημένη από δύο έως και τριάντα φορές στο υπόστρωμα OL:TPOMW 1:3 σε σύγκριση με τα φύλλα ελιάς, ενώ τα τερπενικά συστατικά με εξαίρεση το μασλινικό οξύ παρουσίασαν αντίστροφη τάση (λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας των φύλλων ελιάς σε σχέση με το απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε). Επιπλέον, το σιναπικό οξύ, η ομοβανιλική αλκοόλη και η τυροσόλη, ανιχνεύτηκαν μόνο στα ελαιουργικά παραπροϊόντα (ή σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα μείγματα που περιείχαν στέμφυλα), ενώ η ρεσβερατρόλη δεν φάνηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μειγμάτων των ελαιουργικών παραπροϊόντων (Πίνακας 2.3.3).

### 2.3.3.3 Εκτίμηση της συγκέντρωσης επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών στα παραγόμενα μανιτάρια

Τα φαινολικά συστατικά συγκαταλέγονται στα πιο διαδεδομένα φυτικά προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Kasote et al., 2015). Τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ελάχιστα όσον αφορά την παρουσία επιμέρους φαινολικών συστατικών σε καλλιεργούμενα μανιτάρια (Gąsecka et al., 2017, Islam et al., 2016). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, προσδιορίστηκε για πρώτη φορά η συγκέντρωσή τους σε μανιτάρια τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα. Τρία φαινολικά οξέα, το σιλβένιο ρεσβερατρόλη, δύο τερπενικά οξέα και δύο τερπενικές αλκοόλες ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα μανιταριών από είδη *Pleurotus* (Πίνακας 2.3.4).

Μεταξύ των φαινολικών οξέων τα p-υδροξύ-βενζοϊκό και p-υδροξύ-φαινυλοξικό ήταν τα πιο άφθονα με συγκεντρώσεις μέχρι και 177,6 και 159,6 mg/100 g ξ.β. αντίστοιχα. Οι υψηλότερες τιμές και για τα δύο συστατικά σημειώθηκαν στο *P. nebrodensis* όπου οι αντίστοιχες περιεκτικότητες -ιδιαίτερα στα μείγματα WS:GM- ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τα δύο άλλα είδη που εξετάστηκαν. Επιπλέον, η συγκέντρωση του πρωτοκατεχουϊκού

οξέος αυξήθηκε και στα τρία είδη όσο αυξανόταν το ποσοστό των αποβλήτων ελαιοτριβείου δύο φάσεων στο υπόστρωμα.

Το σιλβένιο ρεσβερατρόλη, το οποίο αποτελεί μια φυσική φαινόλη παραγόμενη από πληθώρα φυτών και του αποδίδονται ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες, μετρήθηκε σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα *P. eryngii* και *P. nebrodensis*. Ειδικά για τα δύο είδη, η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης ήταν έως και δεκαπέντε φορές υψηλότερη σε σύγκριση με το *P. ostreatus* ανεξάρτητα από το υπόστρωμα στο οποίο καλλιεργήθηκαν (Πίνακας 2.3.4). Γενικά, η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης σταμανιτάρια κυμάνθηκε από 0 έως και 151 μg/100g ξ.β. και ήταν δυσανάλογα χαμηλότερη από τις τιμές που μετρήθηκαν στα αντίστοιχα υποστρώματα (τα μείγματα WS-GM παρουσίασαν μέχρι και 60 φορές υψηλότερη συγκέντρωση από τα ελαιουργικά παραπροϊόντα και η συγκέντρωση ρεσβερατρόλης έφτασε μέχρι και 596 μg/100g ξ.β.). Η παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική της ύπαρξης ενός μηχανισμού απορρόφησης ο οποίος εξαρτάται από το είδος/στέλεχος (το *P. nebrodensis* φαίνεται να είναι πιο αποδοτικό στην απορρόφηση σε σύγκριση με τα άλλα δύο στελέχη), με τον οποίο ταμανιτάρια συσσωρεύουν ρεσβερατρόλη ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της στο υπόστρωμα.

Η συσσώρευση των τερπενικών οξέων (ολεανολικό και ουρσολικό οξύ) σταμανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε ελαιουργικά παραπροϊόντα εμφανίστηκε διαφοροποιημένη σε σχέση με όσα αναφέρθηκαν για την ρεσβερατρόλη. Έτσι, οι συγκεντρώσεις και των δύο συστατικών εμφανίστηκαν αυξημένες σταμανιτάρια του *P. eryngii* όσο αυξανόταν το ποσοστό των φύλλων ελιάς στο υπόστρωμα, ενώ δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σταμανιτάρια του *P. ostreatus* που αναπτύχθηκαν σε ελαιουργικά υπολείμματα (Πίνακας 2.3.4). Επιπροσθέτως, οι συγκεντρώσεις του ολεανολικού και ουρσολικού οξέος σε όλα τα είδη *Pleurotus* που μελετήθηκαν ακολούθησαν την ίδια τάση στα μείγματα αχύρου και στέμφυλων, δηλαδή σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στις καρποφορίες ως επακόλουθο της αύξησης της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε στέμφυλα. Παρομοίως, η συγκέντρωση της ερυθροδιόλης φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας στέμφυλων στο υπόστρωμα. Τέλος, η προσθήκη στέμφυλων ή αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων στο υπόστρωμα επηρέασε σημαντικά τη συγκέντρωση της ουβαόλης μόνο στα είδη *P. eryngii* και *P. nebrodensis*.

**Πίνακας 2.3.3. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και περιεκτικότητα επιμέρους φαινολικών συστατικών, τερπενικών ενώσεων και σκουαλενίου σε υποστρώματα καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus* αποτελούμενα από διαφορετικές αναλογίες των τεσσάρων λιγνοκυτταρινούχων υλικών (GM: στέμφυλα οινοποιίας, OL: φύλλα ελιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων και WS: άχυρο σίτου). Οι αναλογίες των υποστρωμάτων είναι εκφρασμένες σε w/w ξ.β. Οι τιμές (μg/100g d.w.) εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση ( $n = 5$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$ -test.  $P < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Συστατικά	WS	WS:GM 3:1	WS:GM 1:1	WS:GM 1:3	OL	OL:TPOMW 3:1	OL:TPOMW 1:1	OL:TPOMW 1:3
Ολικά φαινολικά (mg GAE/100g d.w.)	52.04±8.29 <sup>c</sup>	63.92±5.38 <sup>c</sup>	134.11±12.22 <sup>b</sup>	176.36±73.6 <sup>b</sup>	362.51±37.90 <sup>a</sup>	395.08±62.18 <sup>a</sup>	398.86±39.11 <sup>a</sup>	394.45±18.10 <sup>a</sup>
<i>Υδρόξυ-βενζοϊκά οξέα</i>								
ρ-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	7.41±1.32 <sup>e</sup>	27.76±6.23 <sup>e</sup>	30.59±3.37 <sup>e</sup>	64.69±9.35 <sup>d</sup>	67.85±2.67 <sup>d</sup>	131.10±14.40 <sup>c</sup>	170.90±2.33 <sup>b</sup>	218.17±11.20 <sup>a</sup>
ρ-υδρόξυ-φαινοξικό οξύ	Δ.Α.	12.51±3.54 <sup>de</sup>	8.54±0.78 <sup>e</sup>	82.82±4.27 <sup>c</sup>	16.96±0.94 <sup>d</sup>	62.08±6.41 <sup>c</sup>	141.51±20.65 <sup>b</sup>	265.22±65.88 <sup>a</sup>
Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	Δ.Α.	158.43±12.20 <sup>d</sup>	177.01±22.24 <sup>d</sup>	444.14±55.21 <sup>bc</sup>	144.80±43.47 <sup>d</sup>	374.84±70.21 <sup>c</sup>	672.75±88.52 <sup>ab</sup>	892.88±120.60 <sup>a</sup>
Συριγγικό οξύ	41.61±6.02 <sup>e</sup>	124.39±1.07 <sup>cd</sup>	107.53±9.74 <sup>cd</sup>	346.06±48.65 <sup>a</sup>	55.75±18.76 <sup>e</sup>	80.67±15.43 <sup>de</sup>	143.38±11.95 <sup>c</sup>	219.06±34.59 <sup>b</sup>
Βανιλικό οξύ	20.04±1.68 <sup>d</sup>	79.01±5.54 <sup>d</sup>	105.93±14.8 <sup>d</sup>	334.11±8.38 <sup>c</sup>	99.9±15.66 <sup>d</sup>	334.23±78.94 <sup>c</sup>	718.61±14.39 <sup>b</sup>	1139.08±84.12 <sup>a</sup>
<i>Υδρόξυκιναμικά οξέα</i>								
Καφεϊκό οξύ	Δ.Α.	16.42±2.23 <sup>f</sup>	48.97±14.36 <sup>ef</sup>	93.06±25.96 <sup>e</sup>	261.19±37.41 <sup>d</sup>	501.74±177.15 <sup>c</sup>	821.59±164.57 <sup>b</sup>	1107.07±167.79 <sup>a</sup>
Φερουλικό οξύ	60.68±16.3 <sup>e</sup>	58.19±11.07 <sup>e</sup>	83.60±3.90 <sup>e</sup>	90.96±6.87 <sup>e</sup>	253.41±23.18 <sup>d</sup>	368.72±57.40 <sup>c</sup>	553.46±73.73 <sup>b</sup>	639.43±35.06 <sup>a</sup>
ρ-κουμαρικό οξύ	49.63±6.68 <sup>e</sup>	108.12±3.56 <sup>d</sup>	113.1±14.93 <sup>d</sup>	119.65±19.20 <sup>d</sup>	343.08±24.53 <sup>c</sup>	596.70±169.30 <sup>b</sup>	782.47±111.27 <sup>a</sup>	795.12±119.79 <sup>a</sup>
sinapic acid	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	37.17±8.08 <sup>d</sup>	78.19±1.94 <sup>c</sup>	116.43±21.86 <sup>b</sup>	197.33±44.90 <sup>a</sup>
<i>Φαινόλες</i>								
Ομοβανιλική αλκοόλη	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	12.97±2.34 <sup>e</sup>	124.48±30.91 <sup>d</sup>	455.48±129.17 <sup>c</sup>	817.01±50.45 <sup>b</sup>	1114.09±85.78 <sup>a</sup>
Τυροσόλη	Δ.Α.	1.50±0.47 <sup>d</sup>	4.15±0.01 <sup>d</sup>	12.46±2.11 <sup>d</sup>	58.16±15.03 <sup>d</sup>	388,36±72,02 <sup>c</sup>	926,10±136,22 <sup>b</sup>	1596,06±355,12 <sup>a</sup>
<i>Στιλβένια</i>								
Ρεσβερατρόλη	Δ.Α.	148.07±13.69 <sup>c</sup>	260.47±34.09 <sup>b</sup>	596.16±139.88 <sup>a</sup>	11.53±0.41 <sup>d</sup>	14.47±2.70 <sup>d</sup>	13.74±0.71 <sup>d</sup>	12.19±2.15 <sup>d</sup>
<i>Τερπενικά</i>								
Ολεανολικό οξύ	337.36±82.04 <sup>e</sup>	154489±10935 <sup>e</sup>	275607±18748 <sup>d</sup>	620369±56301 <sup>c</sup>	2602088±680006 <sup>a</sup>	2079717±476998 <sup>a</sup>	1400600±67876 <sup>b</sup>	676862±73688 <sup>c</sup>
Ουρσολικό οξύ	Δ.Α.	322.89±97.91 <sup>e</sup>	534.43±104.98 <sup>de</sup>	815.88±97.30 <sup>d</sup>	259692±81525 <sup>a</sup>	224763±526717 <sup>a</sup>	137699±7922 <sup>b</sup>	45694±2813 <sup>c</sup>
Μασλικό οξύ	Δ.Α.	104.60±17.66 <sup>c</sup>	160.53±19.6 <sup>c</sup>	792.08±194.42 <sup>b</sup>	399716±48324 <sup>a</sup>	435330±99257 <sup>a</sup>	445201±10590 <sup>a</sup>	362050±42284 <sup>a</sup>
Ερυθροδιόλη	15.69±2.71 <sup>f</sup>	806.49±23.17 <sup>e</sup>	1336±125.21 <sup>e</sup>	2950±581 <sup>e</sup>	119380±26380 <sup>a</sup>	73801±15949 <sup>b</sup>	44677±2815 <sup>c</sup>	17702±2843 <sup>d</sup>
Ουβαόλη	10.89±2.43 <sup>e</sup>	55.95±16.23 <sup>e</sup>	63.41±0.51 <sup>e</sup>	238.56±57.26 <sup>e</sup>	164764±34626 <sup>a</sup>	108618±21814 <sup>b</sup>	64757±2903 <sup>c</sup>	23241±2983 <sup>d</sup>
Σκουαλένιο	0.77±0.05 <sup>f</sup>	3.01±0.34 <sup>e</sup>	7.56±1.99 <sup>de</sup>	13.70±2.29 <sup>d</sup>	8.19±3.10 <sup>de</sup>	32.85±5.32 <sup>c</sup>	69.36±8.83 <sup>b</sup>	108.23±6.06 <sup>a</sup>

Δ.Α.: Δεν ανιχνεύτηκε

Αξιολογώντας τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι αυξανόμενου του ποσοστού των στέμφυλων και του αποβλήτου ελαιοτριβείου σε υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο και φύλλα ελιάς αντίστοιχα, παρατηρείται αξιοσημείωτη επίδραση στην συγκέντρωση των απλών πολυφαινολών, της ρεσβερατρόλης και των τερπενικών συστατικών στα μανιτάρια. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν ιδιαίτερα έντονο στην περίπτωση του p-OH-φαινυλοξικού οξέος, του ολεανολικού οξέος και της ερυθροδιόλης σε όλες τις επεμβάσεις. Επιπλέον, ειδικά για τα μανιτάρια του είδους *P. eryngii*, η συγκέντρωση του p-OH-βενζοϊκού οξέος, της ρεσβερατρόλης και του ουρσολικού οξέος επηρεάστηκαν σημαντικά από την προσθήκη στέμφυλων και αποβλήτου ελαιοτριβείου στα κύρια υποστρώματα.

#### 2.3.3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών σε μανιτάρια *Pleurotus* καλλιεργημένα σε υποστρώματα που προέρχονται από παραπροϊόντα ελαιουργίας και οινοποίησης

Μέχρι στιγμής, ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την επίδραση της φύσης του υποστρώματος στην απόδοση αλλά και την περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνες και μέταλλα (Κεφάλαιο 2.1., Banik and Nandi, 2004), ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για την επίδραση των υποστρωμάτων στην περιεκτικότητα των μανιταριών σε βιοδραστικά συστατικά. Στην παρούσα εργασία καταγράφηκε μεγάλη διακύμανση στη συγκέντρωση διαφόρων βιοδραστικών συστατικών σε μανιτάρια που παράχθηκαν σε οκτώ διαφορετικά υποστρώματα (Πίνακας 2.3.5). Ιδιαίτερα έντονη ήταν η εξειδικευμένη ως προς το είδος απόκριση στην προσθήκη ή την αντικατάσταση του συμβατικού υποστρώματος από άλλα υλικά. Για παράδειγμα στο είδος *P. eryngii* οι τιμές των TPC, AAR και FRAP συγκρινόμενες μεταξύ των μανιταριών που προήλθαν από τα υποστρώματα WS και OL:TPOMW 1:3 παρουσιάζουν αύξηση κατά 80, 50 και 40 φορές αντίστοιχα στο δεύτερο υπόστρωμα, ενώ ενδιάμεσες τιμές παρατηρήθηκαν στα υπόλοιπα υποστρώματα. Γενικά, η αυξημένη περιεκτικότητα του υποστρώματος σε στέμφυλα οδήγησε σε προοδευτικά υψηλότερες τιμές σε TPC (μέχρι και 88%), AAR και FRAP (αύξηση μέχρι και 80 και 92% αντίστοιχα, αν και όχι σε όλες τις περιπτώσεις με στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επεμβάσεων) για όλα τα είδη που μελετήθηκαν (Πίνακας 2.3.5, Γράφημα 2.3.1).

Πίνακας 2.3.4. Επιμέρους φαινορικά και τερπενικά συστατικά μανιταριών *Pleurotus ostreatus* (LGM 22), *P. eryngii* (LGAM 216) και *P. nebrodensis* (UPA 6) τα οποία παρήχθησαν σε οκτώ υποστρώματα καλλιέργειας αποτελούμενα από διαφορετικές αναλογίες των ακόλουθων βασικών λιγνοκυτταρινούχων υλικών (GM: στέμφυλα οينوποίας, OL: φύλλα ελιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων και WS: άχυρο σίτου). Οι αναλογίες των υποστρωμάτων είναι εκφρασμένες σε w/w ξ.β. Οι τιμές (μg/100g d.w.) εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση ( $n = 5$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$ -test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων σε κάθε είδος.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Φαινορικά οξέα			Στιλβένια	Τερπενικά οξέα		Τερπενικές αλκοόλες	
		ρ-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	ρ-υδρόξυ-φαινολοξικό	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Ρεσβερατρόλη	Ολεανολικό οξύ	Ουρσολικό οξύ	Ερυθροδιόλη	Ουβαόλη
<i>P. ostreatus</i> LGM 22	WS	13,16±1,19 <sup>c</sup>	8,99±2,99 <sup>c</sup>	18,28±4,64 <sup>b</sup>	1,74±1,02 <sup>c</sup>	126,49±37,01 <sup>c</sup>	8,62±5,50 <sup>e</sup>	1,51±0,44 <sup>e</sup>	1,30±0,44 <sup>d</sup>
	WS:GM 3:1	27,9±3,69 <sup>ab</sup>	19,34±8,74 <sup>bc</sup>	24,53±10,04 <sup>b</sup>	5,68±1,27 <sup>b</sup>	208,35±66,14 <sup>c</sup>	28,04±4,66 <sup>d</sup>	10,34±1,13 <sup>d</sup>	9,21±0,81 <sup>c</sup>
	WS:GM 1:1	25,94±6,46 <sup>ab</sup>	21,30±4,01 <sup>b</sup>	40,31±15,01 <sup>a</sup>	6,01±2,63 <sup>ab</sup>	1200,78±228,21 <sup>b</sup>	35,19±10,81 <sup>d</sup>	13,77±5,04 <sup>d</sup>	3,34±1,07 <sup>d</sup>
	WS:GM 1:3	24,91±1,97 <sup>b</sup>	14,31±2,11 <sup>c</sup>	35,67±12,25 <sup>ab</sup>	6,93±1,04 <sup>ab</sup>	1936,58±386,17 <sup>a</sup>	107,74±25,74 <sup>c</sup>	23,21±1,71 <sup>c</sup>	4,67±1,61 <sup>d</sup>
	OL	41,48±4,44 <sup>a</sup>	21,88±3,55 <sup>b</sup>	33,22±5,74 <sup>ab</sup>	7,91±1,20 <sup>ab</sup>	2194,47±483,86 <sup>a</sup>	237,14±40,81 <sup>b</sup>	64,30±2,27 <sup>b</sup>	68,26±3,02 <sup>b</sup>
	OL:TPOMW 3:1	38,30±9,24 <sup>a</sup>	25,27±0,56 <sup>ab</sup>	34,94±11,37 <sup>ab</sup>	11,80±5,01 <sup>a</sup>	2469,78±983,22 <sup>a</sup>	392,51±95,55 <sup>a</sup>	159,44±41,91 <sup>a</sup>	121,65±28,26 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 1:1	37,48±3,21 <sup>a</sup>	31,17±4,14 <sup>a</sup>	37,76±7,44 <sup>a</sup>	11,03±1,07 <sup>a</sup>	2715,06±47,14 <sup>a</sup>	214,70±21,70 <sup>b</sup>	112,66±38,74 <sup>a</sup>	117,40±40,17 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 1:3	36,08±8,93 <sup>a</sup>	37,25±1,41 <sup>a</sup>	44,37±8,71 <sup>a</sup>	9,67±2,26 <sup>a</sup>	2997,70±23,62 <sup>a</sup>	208,87±28,13 <sup>b</sup>	80,25±30,09 <sup>ab</sup>	89,81±12,60 <sup>ab</sup>	
<i>P. eryngii</i> LGAM 216	WS	24,61±0,21 <sup>c</sup>	0,60±0,17 <sup>d</sup>	27,55±15,80 <sup>bc</sup>	Δ.Α.	30,50±2,50 <sup>d</sup>	Δ.Α.	3,40±1,14 <sup>f</sup>	5,84±1,91 <sup>d</sup>
	WS:GM 3:1	49,75±13,66 <sup>b</sup>	21,84±1,51 <sup>c</sup>	33,01±6,14 <sup>b</sup>	18,88±4,06 <sup>ab</sup>	632,88±118,66 <sup>c</sup>	15,50±0,94 <sup>d</sup>	6,02±0,71 <sup>e</sup>	7,71±2,38 <sup>d</sup>
	WS:GM 1:1	33,16±3,41 <sup>b</sup>	17,23±1,12 <sup>c</sup>	39,84±10,09 <sup>b</sup>	44,10±15,41 <sup>a</sup>	829,37±273,81 <sup>c</sup>	23,86±10,41 <sup>d</sup>	7,47±1,09 <sup>de</sup>	10,65±3,68 <sup>cd</sup>
	WS:GM 1:3	32,04±13,10 <sup>b</sup>	16,12±0,64 <sup>c</sup>	32,07±11,40 <sup>b</sup>	41,04±16,74 <sup>a</sup>	1698,47±572,11 <sup>b</sup>	24,85±1,67 <sup>d</sup>	9,86±2,75 <sup>d</sup>	7,39±1,65 <sup>d</sup>
	OL	30,31±1,55 <sup>b</sup>	24,01±0,88 <sup>b</sup>	29,71±7,64 <sup>b</sup>	4,87±0,92 <sup>c</sup>	4996,46±963,76 <sup>a</sup>	658,81±96,55 <sup>a</sup>	122,10±37,44 <sup>a</sup>	134,01±24,10 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 3:1	76,41±26,57 <sup>a</sup>	30,09±13,04 <sup>ab</sup>	41,83±18,14 <sup>b</sup>	16,01±1,65 <sup>b</sup>	3592,48±1120,65 <sup>a</sup>	501,83±117,77 <sup>a</sup>	73,13±25,81 <sup>b</sup>	150,65±30,71 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 1:1	81,68±29,08 <sup>a</sup>	34,11±7,36 <sup>ab</sup>	77,65±11,66 <sup>a</sup>	20,73±5,77 <sup>ab</sup>	2118,69±289,14 <sup>ab</sup>	245,84±53,64 <sup>b</sup>	41,65±9,82 <sup>c</sup>	89,67±17,42 <sup>b</sup>
OL:TPOMW 1:3	91,26±31,14 <sup>a</sup>	40,50±13,27 <sup>a</sup>	92,51±4,05 <sup>a</sup>	14,46±2,91 <sup>b</sup>	542,20±45,71 <sup>c</sup>	82,55±24,23 <sup>c</sup>	11,01±2,39 <sup>d</sup>	22,91±7,77 <sup>c</sup>	
<i>P. nebrodensis</i> UPA 6	WS	117,87±43,87 <sup>ab</sup>	17,19±1,29 <sup>d</sup>	27,79±15,80 <sup>b</sup>	26,68±6,40 <sup>c</sup>	115,38±23,42 <sup>d</sup>	24,70±4,11 <sup>c</sup>	7,94±1,23 <sup>d</sup>	7,34±2,69 <sup>b</sup>
	WS:GM 3:1	142,71±26,20 <sup>a</sup>	131,87±14,91 <sup>a</sup>	52,60±27,22 <sup>a</sup>	56,65±9,52 <sup>b</sup>	200,48±65,93 <sup>cd</sup>	27,78±9,12 <sup>bc</sup>	1,06±6,02 <sup>d</sup>	6,44±1,28 <sup>b</sup>
	WS:GM 1:1	155,72±26,57 <sup>a</sup>	159,60±10,68 <sup>a</sup>	41,65±10,14 <sup>ab</sup>	65,61±9,57 <sup>b</sup>	397,45±125,71 <sup>c</sup>	33,69±5,03 <sup>b</sup>	52,07±3,61 <sup>c</sup>	42,73±26,04 <sup>ab</sup>
	WS:GM 1:3	90,70±2,49 <sup>b</sup>	95,03±4,02 <sup>b</sup>	34,93±11,18 <sup>ab</sup>	67,14±19,07 <sup>b</sup>	945,48±223,48 <sup>b</sup>	40,90±7,29 <sup>b</sup>	43,20±25,65 <sup>c</sup>	26,54±22,21 <sup>b</sup>
	OL	73,57±14,38 <sup>b</sup>	44,58±2,01 <sup>c</sup>	25,91±11,01 <sup>b</sup>	112,24±2,00 <sup>a</sup>	1755,51±37,56 <sup>a</sup>	142,23±9,11 <sup>a</sup>	51,84±19,89 <sup>c</sup>	41,28±9,21 <sup>b</sup>
	OL:TPOMW 3:1	177,55±15,91 <sup>a</sup>	65,50±15,54 <sup>c</sup>	46,44±13,45 <sup>a</sup>	142,33±24,93 <sup>a</sup>	1278,83±327,87 <sup>ab</sup>	132,84±30,54 <sup>a</sup>	196,13±41,00 <sup>a</sup>	138,01±66,27 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 1:1	165,43±47,93 <sup>a</sup>	59,63±5,38 <sup>c</sup>	51,23±7,41 <sup>a</sup>	151,18±31,06 <sup>a</sup>	982,42±117,40 <sup>b</sup>	165,74±28,67 <sup>a</sup>	104,65±27,79 <sup>b</sup>	95,71±27,27
OL:TPOMW 1:3	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	

Δ.Α.: Δεν ανιχνεύτηκε

Δ.Π.: Δεν παρήχθησαν μανιτάρια

Παρομοίως, σημαντική εξάρτηση από την σύσταση του υποστρώματος παρουσιάστηκε στις τιμές του TPC αλλά και της αντιοξειδωτικής ικανότηταςμανιταριών *P. eryngii* όταν προστέθηκε TPOMW στο βασικό υπόστρωμα από φύλλα ελιάς. Αντίθετα, οι τιμές των AAR και FRAP των ειδών *P. nebrodensis* και *P. ostreatus* δεν επηρεάστηκαν ανάλογα από τον συγκεκριμένο τύπο υποστρώματος, με εξαίρεση τις αυξημένες τιμές του TPC που παρατηρήθηκαν σε μεγάλες αναλογίες διφασικού αποβλήτου ελαιολιτριβείου. Η επιμήκυνση στο χρόνο που απαιτήθηκε για οξείδωση του λιπαρών επίσης επηρεάστηκε θετικά από την προσθήκη στέμφυλων ή διφασικού αποβλήτου ελαιολιτριβείου στα βασικά υποστρώματα κυρίως στην περίπτωση του *P. eryngii* (μέχρι και 37% αύξηση σε σύγκριση με το μάρτυρα) και του *P. ostreatus* (μέχρι και 31% αύξηση), παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων.

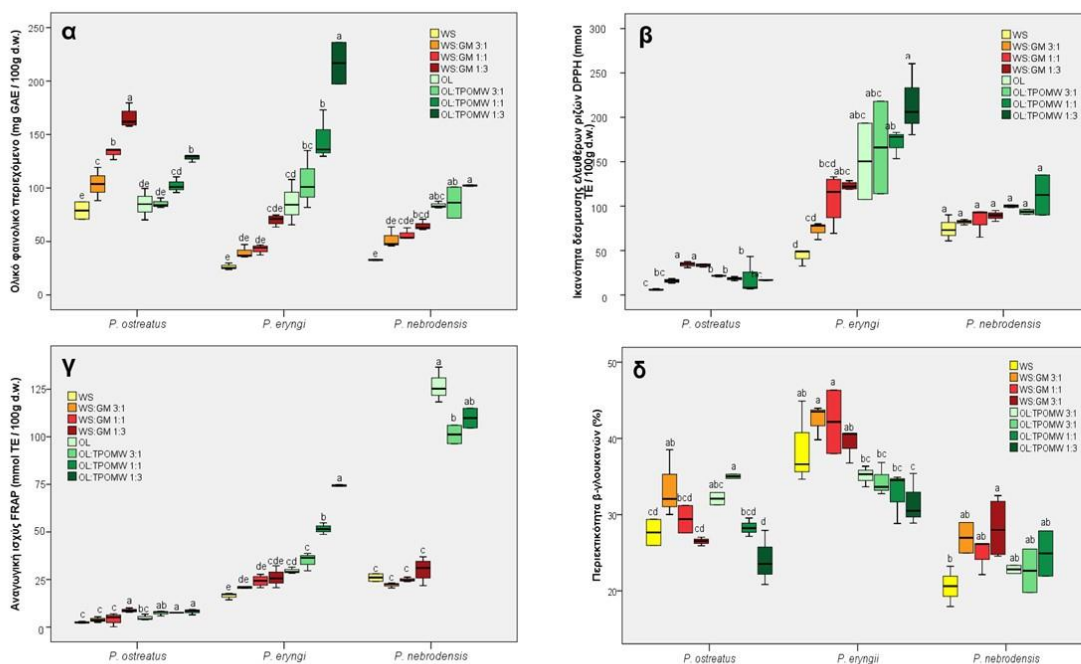
Σε προηγούμενες εργασίες έχει αναφερθεί ότι μανιτάρια των ειδών *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* τα οποία αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν μέχρι και 90% διφασικού αποβλήτου ελαιολιτριβείου δεν εμφάνισαν υψηλότερες τιμές TPC σε αντίθεση με ό τι παρατηρήθηκε σε μανιτάρια των ειδών *C. cylindracea* και *H. erinaceus* τα οποία αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν ελαιουργικά παραπροϊόντα (βλ. Κεφάλαια 2.4 και 2.5). Στην παρούσα εργασία το φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητα επηρεάστηκαν σημαντικά από τον τύπο του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μανιταριών *P. eryngii* και *P. nebrodensis*, σε αντίθεση με το *P. ostreatus*. Επομένως, αυτού του τύπου οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι εξαρτώνται κυρίως από το είδος/στέλεχος που εξετάζεται. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα του TPC μεθανολικών εκχυλισμάτων που μετρήθηκαν σε έξι είδη *Agaricus* προερχόμενα από εμπορική καλλιέργεια (133 έως 1155 mg GAE/100 g d.w., Gąsecka et al., 2017), όπως επίσης και από δείγματα καλλιεργούμενων και αυτοφυών εδώδιμων μανιταριών (80 έως 550 mg GAE/100 g d.w., συμπεριλαμβανομένου του *P. ostreatus*, 140 mg GAE/100 g d.w., Palacios et al., 2011).

**Πίνακας 2.3.5. Αντιοξειδωτική ικανότητα (εκφρασμένη ως DPPH, FRAP και TSO) και περιεκτικότητα σε γλουκάνες και εργοστερόλη σε μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* (LGM 22), *P. eryngii* (LGAM 216) και *P. nebrodensis* (UPA 6) ανεπτυγμένα σε οκτώ διαφορετικά υποστρώματα αποτελούμενα από διαφορετικές αναλογίες των ακόλουθων υλικών: GM: στέμφυλα οينوποιίας, OL: φύλλα ελιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων και WS: άχυρο σίτου. Όλες οι αναλογίες εκφράζονται σε w/w ξ.β. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n = 5). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Είδη	Υποστρώματα	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/100 g ξ.β.)	Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, DPPH (mmol TE / 100 g ξ.β.)	Αναγωγική ισχύς, FRAP (mmol TE / 100 g ξ.β.)	Ολική οξειδωση ορού, TSO (επιμήκυνση του χρόνου υστέρησης, sec)	Εργοστερόλη (mg/100 g ξ.β.)	α-γλουκάνες (% ξ.β.)	β-γλουκάνες (% ξ.β.)
<i>P. ostreatus</i> LGM 22	WS	79,01±11,25 <sup>e</sup>	6,00±0,68 <sup>c</sup>	2,45±0,38 <sup>c</sup>	2003±30 <sup>a</sup>	107,21±10,86 <sup>c</sup>	6,63±1,10 <sup>a</sup>	27,67±2,40 <sup>cd</sup>
	WS:GM 3:1	103,73±15,41 <sup>c</sup>	15,81±2,07 <sup>bc</sup>	3,81±1,20 <sup>c</sup>	2168±489 <sup>a</sup>	278,10±79,01 <sup>b</sup>	4,01±0,91 <sup>bc</sup>	33,54±4,44 <sup>ab</sup>
	WS:GM 1:1	132,75±05,38 <sup>b</sup>	34,48±2,91 <sup>a</sup>	4,43±1,00 <sup>c</sup>	2222±50 <sup>a</sup>	316,65±96,70 <sup>b</sup>	6,69±0,73 <sup>a</sup>	29,40±2,53 <sup>bcd</sup>
	WS:GM 1:3	165,41±09,94 <sup>a</sup>	33,45±1,72 <sup>a</sup>	8,71±1,02 <sup>a</sup>	2631±534 <sup>a</sup>	570,83±62,93 <sup>a</sup>	5,06±1,86 <sup>abc</sup>	26,50±0,56 <sup>cd</sup>
	OL	84,89±14,63 <sup>de</sup>	21,54±1,19 <sup>b</sup>	4,89±1,64 <sup>bc</sup>	1886±226 <sup>a</sup>	114,44±44,24 <sup>c</sup>	3,44±0,73 <sup>c</sup>	32,10±1,14 <sup>abc</sup>
	OL:TPOMW 3:1	85,47±04,72 <sup>de</sup>	18,32±2,32 <sup>b</sup>	7,37±1,27 <sup>ab</sup>	2105±47 <sup>a</sup>	128,08±26,25 <sup>c</sup>	4,89±0,99 <sup>abc</sup>	35,02±0,40 <sup>a</sup>
	OL:TPOMW 1:1	102,41±07,42 <sup>cd</sup>	19,27±2,44 <sup>b</sup>	7,55±0,09 <sup>a</sup>	2241±147 <sup>a</sup>	164,73±34,06 <sup>bc</sup>	5,98±0,83 <sup>ab</sup>	28,31±1,21 <sup>bcd</sup>
	OL:TPOMW 1:3	128,22±03,37 <sup>b</sup>	16,76±0,53 <sup>bc</sup>	8,04±1,45 <sup>a</sup>	2400±113 <sup>a</sup>	213,44±45,76 <sup>bc</sup>	3,54±0,77 <sup>c</sup>	24,11±3,58 <sup>d</sup>
<i>P. eryngii</i> LGAM 216	WS	26,33±03,11 <sup>e</sup>	43,65±9,64 <sup>d</sup>	16,41±1,83 <sup>e</sup>	1472±27 <sup>a</sup>	25,81±8,19 <sup>d</sup>	7,85±2,27 <sup>ab</sup>	38,72±5,44 <sup>ab</sup>
	WS:GM 3:1	39,87±06,25 <sup>de</sup>	73,41±9,65 <sup>cd</sup>	20,93±0,65 <sup>de</sup>	1684±98 <sup>a</sup>	118,47±51,94 <sup>c</sup>	8,76±1,41 <sup>a</sup>	42,43±2,27 <sup>a</sup>
	WS:GM 1:1	43,11±04,00 <sup>de</sup>	108,60±28,91 <sup>bcd</sup>	24,34±3,02 <sup>de</sup>	1764±346 <sup>a</sup>	236,10±44,63 <sup>b</sup>	7,56±2,36 <sup>ab</sup>	42,17±5,87 <sup>a</sup>
	WS:GM 1:3	70,08±04,90 <sup>cde</sup>	122,94±4,53 <sup>abc</sup>	26,20±5,83 <sup>cde</sup>	2227±81 <sup>a</sup>	298,53±24,57 <sup>b</sup>	10,04±0,99 <sup>a</sup>	39,35±2,23 <sup>ab</sup>
	OL	86,04±21,24 <sup>cd</sup>	150,47±20,55 <sup>abc</sup>	29,60±1,64 <sup>cd</sup>	2121±411 <sup>a</sup>	627,23±41,74 <sup>a</sup>	7,81±2,55 <sup>ab</sup>	35,10±1,36 <sup>bc</sup>
	OL:TPOMW 3:1	106,03±26,87 <sup>bc</sup>	166,11±23,51 <sup>abc</sup>	34,94±4,74 <sup>c</sup>	2125±248 <sup>a</sup>	574,47±33,63 <sup>a</sup>	3,38±0,59 <sup>c</sup>	34,41±2,15 <sup>bc</sup>
	OL:TPOMW 1:1	146,21±23,36 <sup>b</sup>	171,52±15,82 <sup>ab</sup>	51,67±3,12 <sup>b</sup>	2219±178 <sup>a</sup>	601,09±47,81 <sup>a</sup>	7,39±1,52 <sup>ab</sup>	32,76±3,39 <sup>bc</sup>
	OL:TPOMW 1:3	216,76±27,48 <sup>a</sup>	215,65±30,91 <sup>a</sup>	74,39±0,57 <sup>a</sup>	2344±374 <sup>a</sup>	626,57±106,79 <sup>a</sup>	4,79±1,26 <sup>bc</sup>	31,59±3,39 <sup>c</sup>
<i>P. nebrodensis</i> UPA 6	WS	32,65±0,78 <sup>e</sup>	74,73±14,71 <sup>a</sup>	26,02±2,79 <sup>c</sup>	1769±260 <sup>a</sup>	337,82±27,38 <sup>c</sup>	7,98±1,86 <sup>a</sup>	20,60±2,63 <sup>b</sup>
	WS:GM 3:1	52,31±09,79 <sup>de</sup>	82,23±3,06 <sup>a</sup>	22,13±1,43 <sup>c</sup>	1869±456 <sup>a</sup>	349,82±71,54 <sup>bc</sup>	8,57±2,44 <sup>a</sup>	26,97±2,82 <sup>ab</sup>
	WS:GM 1:1	56,54±05,46 <sup>cde</sup>	83,92±16,27 <sup>a</sup>	24,92±1,20 <sup>c</sup>	2028±295 <sup>a</sup>	436,63±132,53 <sup>ab</sup>	7,80±2,49 <sup>a</sup>	24,81±2,32 <sup>ab</sup>
	WS:GM 1:3	64,85±05,20 <sup>bcd</sup>	89,17±6,10 <sup>a</sup>	30,17±6,32 <sup>c</sup>	1969±27 <sup>a</sup>	582,54±57,65 <sup>a</sup>	9,39±1,79 <sup>a</sup>	28,27±4,07 <sup>a</sup>
	OL	83,91±03,34 <sup>abc</sup>	100,02±2,02 <sup>a</sup>	126,68±9,22 <sup>a</sup>	2228±19 <sup>a</sup>	419,90±33,49 <sup>a</sup>	7,95±4,12 <sup>a</sup>	22,82±0,75 <sup>ab</sup>
	OL:TPOMW 3:1	86,32±20,48 <sup>ab</sup>	93,63±3,73 <sup>a</sup>	101,21±6,75 <sup>b</sup>	1954±96 <sup>a</sup>	220,65±22,29 <sup>b</sup>	6,94±3,95 <sup>a</sup>	22,64±4,02 <sup>ab</sup>
	OL:TPOMW 1:1	102,25±8,01 <sup>a</sup>	112,55±1,65 <sup>a</sup>	109,82±7,34 <sup>ab</sup>	2041±27 <sup>a</sup>	204,74±48,73 <sup>b</sup>	10,75±2,37 <sup>a</sup>	24,91±4,19 <sup>ab</sup>
	OL:TPOMW 1:3	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ

δπ: δεν παρήχθησαν μανιτάρια





**Γράφημα 2.3.1** α) ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορισμένη ως β) ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών γ) αναγωγική ισχύς και δ) β-γλουκάνες προσδιορισμένα σε μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* (στέλεχος LGM 22), *P. eryngii* (LGAM 216) και *P. nebrodensis* (UPA 6) ανεπτυγμένα σε οκτώ διαφορετικά υποστρώματα αποτελούμενα από διαφορετικές αναλογίες των παρακάτω υλικών: GM: στέμφυλα οιοποίησης, OL: φύλλα ελιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων και WHS: άχυρο σίτου. Όλες οι αναλογίες εκφράζονται κατά βάρος. Τα γράμματα απάνω από κάθε μπάρα εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Παρόμοια επίδραση αν και λιγότερο έντονη, παρατηρήθηκε στην περίπτωση του *P. nebrodensis* (από 338 έως 583 mg/100 g ξ.β.) σε υποστρώματα που περιείχαν στέμφυλα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο εμπλουτισμός του αχύρου με αυξανόμενη αναλογία σε στέμφυλα συντέλεσε στην προοδευτική/σταθερή αύξηση της εργοστερόλης σε όλα τα είδη μανιταριών, ενώ η προσθήκη διφασικού αποβλήτου ελαιοτριβείου στο βασικό υλικό (φύλλα ελιάς, OL) οδήγησε σε αύξηση της περιεχόμενης εργοστερόλης, η οποία όμως φάνηκε να εξαρτάται από το είδος/στέλεχος (καμία αύξηση στο *P. eryngii*, αύξηση και μείωση στα *P. ostreatus* και *P. nebrodensis* αντίστοιχα, όσο αυξανόταν η περιεκτικότητα σε TPOMW). Η συγκέντρωση της εργοστερόλης σε εμπορικά καλλιεργούμενα μανιτάρια έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 419 έως 440 mg/100 g ξ.β. (Jasinghe and Perera, 2005, Teichmann et al., 2007), τιμές που βρίσκονται εντός του εύρους που προσδιορίστηκε στην παρούσα εργασία.

Το σκουαλένιο, λειτουργεί ως πρόδρομη ένωση στο μεταβολικό μονοπάτι για τη σύνθεση τη εργοστερόλης στα κύτταρα των μυκήτων (Alcazar et al., 2012, Lees et al., 1995). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι παρά το γεγονός ότι τα υποστρώματα που αποτελούνταν από ελαιουργικά παραπροϊόντα περιέχουν πολύ υψηλότερες ποσότητες σκουαλενίου συγκριτικά με τα WS/GM (πάνω από 8 φορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη υψηλότερη συγκέντρωση, Πίνακας 2.3.3) και παρόλο που η υψηλότερη αναλογία σε διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου οδήγησε σε τριπλασιασμό της συγκέντρωσης σκουαλενίου, η συγκέντρωση της εργοστερόλης σταμανιτάρια *Pleurotus* που παρήχθησαν στα αντίστοιχα υποστρώματα δεν παρουσίασε ανάλογη αύξηση. Απεναντίας, οδήγησε σε διπλασιασμό της συγκέντρωσης μόνο σταμανιτάρια του *P. ostreatus*, δεν επηρέασε τη συγκέντρωση στο είδος *P. eryngii*, ενώ στο *P. nebrodensis* οδήγησε σε μείωση κατά το ήμισυ της περιεκτικότητας σε εργοστερόλη. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το σκουαλένιο του υποστρώματος επιδρά στην συγκέντρωση της εργοστερόλης στις καρποφορίες δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά φαίνεται ότι κάθε είδος συμπεριφέρεται με διαφορετικό τρόπο (π.χ. η συγκέντρωση της εργοστερόλης στο *P. nebrodensis* δείχνει αρχικά να επηρεάζεται ελάχιστα από την παρουσία του σκουαλενίου στο υπόστρωμα, ενώ σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις του επηρεάζεται αρνητικά). Είναι ωστόσο προφανές ότι απαιτείται περαιτέρω πειραματισμός για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και την αύξηση της περιεκτικότητας εργοστερόλης (και κατ' επέκταση της βιταμίνης D) στα καλλιεργούμεναμανιτάρια.

Στο πρόσφατο παρελθόν πολυσακχαρίτες απόμανιτάρια *Pleurotus* (ειδικά κάποιες β-D-γλουκάνες όπως η Pleuran) έχουν ταυτοποιηθεί, χαρακτηριστεί και αξιολογηθεί ως προς τις πρεβιοτικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες τους (Gargano et al., 2017). Ωστόσο, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι η πρώτη φορά που οι γλουκάνες ποσοτικοποιούνται και αξιολογούνται σεμανιτάρια που προέρχονται από διαφορετικά υποστρώματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι β-γλουκάνες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των ολικών γλουκανών (80-91% στο *P. ostreatus* και στο *P. eryngii* και 70 – 77% στο *P. nebrodensis* ανάλογα με το υπόστρωμα, Πίνακας 2.3.5) και οι εν λόγω τιμές είναι ανάμεσα στις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί γιαμανιτάρια *Pleurotus* (Carrasco-González et al., 2017). Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος, οι συγκεντρώσεις των α-γλουκανών δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τωνμανιταριών που προέρχονταν από διαφορετικά υποστρώματα. Αντίθετα, η προσθήκη στέμφυλων στο άχυρο (ειδικά στην αναλογία 1:3) οδήγησε σε αξιοσημείωτη αύξηση στην περιεκτικότητα των β-γλουκανών (8-23%, ανάλογα με το είδος τουμανιταριού). Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε στο είδος *H. erinaceus*, όταν καλλιεργήθηκε σε υποστρώματα τα οποία αποτελούνταν από

υπολείμματα κλαδεμάτων ελιάς σε σύγκριση με το συμβατικό υπόστρωμα αποτελούμενο από πριονίδι οξιάς (βλ. Κεφάλαιο 2.5). Επιπλέον, η χρήση των υπολειμμάτων ελαιουργίας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση μέχρι και κατά 27% (στο υπόστρωμα OL:TPOMW 3:1 συγκριτικά με το άχυρο στο είδος *P. ostreatus*) στην περιεκτικότητα σε β-γλουκάνες. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αξίζει να τονιστεί, ότι κάτω από αντίξοες συνθήκες, οι μύκητες αντιδρούν διατηρώντας την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου συνθάση της β-γλουκάνης (Malavazi et al., 2014, Smits et al., 2001), η οποία εξηγεί την αυξημένη περιεκτικότητα των β-γλουκανών στα μανιτάρια *Pleurotus* που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες στρες στα υποστρώματα που περιείχαν παραπροϊόντα ελαιουργίας ή οινοποίησης (λόγω της τοξικότητας των περιεχόμενων οξειδωτικών φαινολικών ουσιών). Στην υψηλή συγκέντρωση τέτοιων συστατικών στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων φαίνεται να οφείλονται οι πολύ υψηλές τιμές ενεργότητας του ενζύμου συνθάση της β-γλουκάνης που μετρήθηκαν στο μυκήλιο των ειδών *Lentinula edodes* και *P. ostreatus* (ενώ το *P. eryngii* δεν επηρεάστηκε), το οποίο αναπτύχθηκε στο συγκεκριμένο μέσο καλλιέργειας (Reverberi et al., 2004).

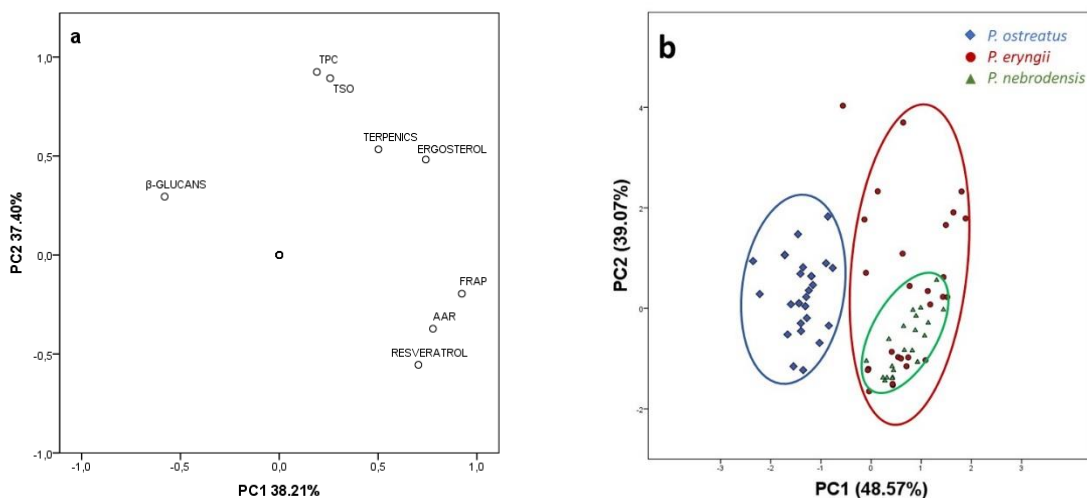
### 2.3.3.5 Συσχετίσεις μεταξύ της σύστασης του υποστρώματος και των ιδιοτήτων των μανιταριών

Σε όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις των φαινολικών οξέων, της ρεσβερατρόλης, των τερπενικών οξέων και του σκουαλενίου (Πίνακας 2.3.3) με σκοπό τη διερεύνηση των πιθανών συσχετίσεων τους με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα μανιτάρια και την αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών (Πίνακες 2.3.4 και 2.3.5), όπως επίσης και τη μελέτη οποιασδήποτε άλλης πιθανής συσχέτισης μεταξύ συστατικών των υποστρωμάτων και των μανιταριών. Τελικά, προέκυψαν πολύ υψηλές συσχετίσεις μεταξύ των ολικών φαινολικών στο υπόστρωμα, καθώς και των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAR και FRAP) στα μανιτάρια των ειδών *P. eryngii* και *P. nebrodensis* ( $r = 0,919$  και  $r = 0,965$ ,  $r = 0,959$  και  $r = 0,927$ , και  $r = 0,868$  και  $r = 0,941$ ,  $p < 0,01$ , αντίστοιχα). Όμως, στην περίπτωση του *P. ostreatus*, υψηλές συσχετίσεις προέκυψαν μόνο όταν τα υποστρώματα που περιείχαν παραπροϊόντα ελαιουργίας και οινοποίησης εξετάστηκαν χωριστά. Σε αυτή την περίπτωση, υψηλή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των ολικών φαινολικών στα υποστρώματα και στα μανιτάρια ( $r = 0,958$  έως  $0,978$ ,  $p < 0,05$ ). Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση της εργοστερόλης στα μανιτάρια *P. ostreatus* και *P. eryngii*, τα οποία προήλθαν από παραπροϊόντα ελαιουργίας

και οινοποιίας αντίστοιχα, εμφάνισε υψηλή συσχέτιση με τη συγκέντρωση του σκουαλενίου στα αντίστοιχα υποστρώματα ( $r = 0,991, p < 0,01$  και  $r = 0,961, p < 0,05$ ).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα συστατικά που μελετήθηκαν, υψηλές τιμές του συντελεστή συσχέτισης Pearson παρατηρήθηκαν μεταξύ των τερπενικών οξέων (ουρσολικό και ολεανολικό) σε όλα τα υποστρώματα και είδη που μελετήθηκαν ( $r = 0,683$  έως  $0,982, p < 0,05$ ), όπως και σε αρκετά από τα υπόλοιπα συστατικά (συμπεριλαμβανομένων των υδροξυβενζοϊκών οξέων και των τερπενικών αλκοολών) που προσδιορίστηκαν στα υποστρώματα και τα μανιτάρια του είδους *P. eryngii* ( $r = 0,746$  έως  $0,988, p < 0,05$ ). Από τις παραπάνω παρατηρήσεις αποδεικνύεται η σημαντική επίδραση του υποστρώματος στην περιεκτικότητα των μανιταριών σε βιοδραστικά συστατικά και στις λειτουργικές ιδιότητες τους.

Για την απόκτηση της συνολικής εικόνας των πιθανών σχέσεων μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας (AAR, FRAP και TSO), των β-γλουκανών, των ολικών φαινολικών και της εργοστερόλης πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA). Προέκυψαν δύο κύριες συνιστώσες οι οποίες αθροιστικά εξηγούν το 87,56% της ολικής διακύμανσης η οποία παρατηρείται στο σύνολο των δεδομένων. Η προβολή των μεταβλητών που μετρήθηκαν στο καθορισμένο επίπεδο των κύριων συνιστωσών παρουσιάζεται στο Γράφημα 2.3.2.α. Λαμβάνοντας υπόψιν τόσο την PC1 όσο και την PC2, οι παράμετροι TPC και TSO, όπως και οι AAR, FRAP και εργοστερόλη, εμφανίζουν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ τους. Αντίθετα, οι β-γλουκάνες τοποθετούνται στην απέναντι πλευρά του PC2 σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους, υποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάζουν την συγκέντρωση σε άλλα συστατικά ή την αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι όταν τα αποτελέσματα (από όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν) χρησιμοποιήθηκαν για την ομαδοποίηση των δειγμάτων προέκυψαν δύο ανεξάρτητες ομάδες οι οποίες αντιπροσωπεύονταν από τα είδη *P. ostreatus* και *P. eryngii* (Γράφημα 2.3.2.β). Τα δείγματα του *P. nebrodensis* σχημάτισαν μια υποομάδα εντός του *P. eryngii*, η οποία συμφωνεί με την υψηλή φυλογενετική συγγένεια μεταξύ αυτών των δύο ειδών (Zervakis et al., 2014).



**Γράφημα 2.3.2.** Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) που αφορούν α) το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα (AAR, FRAP και TSO), τη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης, εργοστερόλης, τερπενικών συστατικών και β-γλουκανών που προήλθαν από καλλιεργούμενα μανιτάρια των ειδών *P. ostreatus*, *P. eryngii* και *P. nebrodensis* και β) ομαδοποίηση των ανεξάρτητων δειγμάτων μανιταριών σε επίπεδο είδους με βάση τις τιμές των προαναφερθέντων παραμέτρων.

### 2.3.4 Συμπεράσματα

Τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την παραπάνω εργασία υποδεικνύουν ότι τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας και οινοποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την παραγωγή μανιταριών *Pleurotus*. Ειδικότερα τα υποστρώματα που περιείχαν στέμφυλα εμφάνισαν ισάξιες ή και καλύτερες τιμές αναφορικά με την πρωιμότητα εμφάνισης των καρποφοριών και την παραγωγικότητα στα είδη *P. eryngii* και *P. nebrodensis*. Επιπροσθέτως, η παραγωγή του πρώτου εκ των προαναφερθέντων ειδών ενισχύθηκε από τη χρήση παραπροϊόντων ελαιουργίας, ενώ για το δεύτερο διερευνήθηκε για πρώτη φορά η καλλιέργεια του με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η χρήση των στέμφυλων και των ελαιουργικών παραπροϊόντων επέφερε σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητα βιοδραστικών συστατικών των μανιταριών *Pleurotus*. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση στην περιεκτικότητα των εν λόγω υλικών είχε σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση σε απλές πολυφαινόλες, ρεσβερατρόλη και τερπενικά οξέα, η οποία ήταν ιδιαίτερα αξιοσημείωτη στα μανιτάρια *P. eryngii*. Επιπλέον, στο συγκεκριμένο είδος, η χρήση των εναλλακτικών υποστρωμάτων επέφερε αξιοσημείωτη αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των παραγόμενων μανιταριών (AAR, FRAP), όπως και στις συγκεντρώσεις σε ολικές πολυφαινόλες και εργοστερόλη. Παρόμοια αύξηση στις

προαναφερθείσες ενώσεις, αλλά με λιγότερο εμφατικό τρόπο, παρατηρήθηκε και στα είδη *P. ostreatus* και *P. nebrodensis* όταν καλλιεργήθηκαν σε εναλλακτικά υποστρώματα. Επιπροσθέτως ο εμπλουτισμός των υποστρωμάτων με στέμφυλα ή ελαιουργικά παραπροϊόντα οδήγησε σε αύξηση της περιεκτικότητας των μανιταριών σε β-γλουκάνες. Γενικά, η απόκριση που εμφανίζουν μύκητες *Pleurotus* στη χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας εξαρτάται σημαντικά από το υπό εξέταση είδος και την δυνατότητα επιλεκτικής απορρόφησης οργανικών συστατικών που αυτό εμφανίζει.

---

## Κεφάλαιο 2.4

---

**Βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων  
παραπροϊόντων από τον μύκητα  
*Cyclocybe cylindracea* - Αξιολόγηση  
της επίδρασης στο τελικό προϊόν και  
στο εξαντλημένο υπόστρωμα**

## 2.4.1 Εισαγωγή

Στο παρόν Κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση υποστρωμάτων αποτελούμενα από παραπροϊόντα της ελαιοκομικής και ελαιουργικής διαδικασίας (κλαδέματα ελιάς, φύλλα ελιάς και ημίρρευστο απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων) στις καλλιεργητικές παραμέτρους και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά αυτόχθονων στελεχών του *C. cylindracea*. Τον κύριο στόχο της παρούσας εργασίας, αποτέλεσε η αξιολόγηση μειγμάτων των παραπάνω υλικών αυτούσια, ή σε μείγματα με άχυρο αλλά και μεταξύ τους, ώστε να μελετηθεί η διαδικασία βιομετατροπής τους σε μυκηλιακή βιομάζα και να αποκτηθεί γνώση σχετική με τον τρόπο ανάπτυξης και την ικανότητα αποδόμησης διαφορετικών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων από τον μύκητα *C. cylindracea*. Για το λόγο αυτό μετρήθηκε η αρχική περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε ινώδη συστατικά και η σταδιακή μεταβολή της περιεκτικότητας τους καθώς εξελίσσεται ο αποικισμός από δύο επιλεγμένα στελέχη του μύκητα, σε συνδυασμό με την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και την ενεργότητα των λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών υποστρωμάτων στη βασική σύσταση (“crude composition”), στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των παραγόμενων μανιταριών.

## 2.4.2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.4.2.1 Βιολογικό υλικό

Πέντε στελέχη του είδους *C. cylindracea cylindracea* (*C. cylindracea* LGAM 281, *C. cylindracea* LGAM 445, *C. cylindracea* LGAM 446, *C. cylindracea* LGAM 452 και *C. cylindracea* SIEF 0834) εξετάστηκαν στα πλαίσια του παρόντος πειράματος. Όλα προέρχονται από απομονώσεις αυτοφυών μανιταριών και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στη συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.



## 2.4.2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Οι εργασίες του παρόντος Κεφαλαίου οργανώθηκαν σε δύο στάδια. Αρχικά έγινε συγκριτική αξιολόγηση της γραμμικής ταχύτητας αύξησης των πέντε στελεχών σε διάφορες θερμοκρασίες σε τρυβλία που περιείχαν τα θρεπτικά υλικά Czapek Dox Agar (CDA), Cellulose Medium Agar (CMA) και Lignin Medium Agar (LMA). Στη συνέχεια τα ίδια στελέχη αναπτύχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες ("race tubes") που περιείχαν μείγματα αχύρου και ΤΡΟΜW με σκοπό την μελέτη της ταχύτητας αύξησης και της δυνατότητα σχηματισμού καρποφοριών.

Στο δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, επιλέχθηκαν τα δύο πιο αποδοτικά στελέχη και καλλιεργήθηκαν -σε μεγαλύτερη κλίμακα- σε έντεκα διαφορετικά υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιουργίας και ελαιοκομίας. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας έγιναν μετρήσεις της μείωσης των ινωδών και φαινολικών συστατικών κατά τον αποικισμό του υποστρώματος, καθώς και προσδιορισμός των λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων που ευθύνονται για την αποδόμησή τους. Επιπλέον χημικές αναλύσεις που αφορούσαν την κύρια σύσταση (crude composition) και επιλεγμένα βιοδραστικά συστατικά πραγματοποιήθηκαν στα παραγόμενα μανιτάρια. Τέλος φασματοσκοπικές αναλύσεις έγιναν τόσο στα δείγματα των υποστρωμάτων που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας με σκοπό την αποτίμηση των μεταβολών που προκλήθηκαν κατά την καλλιεργητική διαδικασία, όσο και στις καρποφορίες για την πληρέστερη μελέτη της επίδρασης της σύστασης του υποστρώματος στο τελικό προϊόν (μανιτάρια).

## 2.4.2.3 Θρεπτικά υλικά

### 2.4.2.3.1 Czapek Dox Agar

Αποτελεί ημισυνθετικό θρεπτικό υλικό με μοναδική πηγή αζώτου το νιτρικό νάτριο. Χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια μυκήτων και μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη όλων των σαπροτροφικών μυκήτων.

<u>Συστατικά</u>	g/l
Σουκρόζη	30,00
Νιτρικό νάτριο (NaNO <sub>3</sub> )	2,00
Φωσφορικό δικάλιο (K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,00
Θειικό μαγνήσιο (MgSO <sub>4</sub> )	0,50

Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,50
Θειικός σίδηρος (FeSO <sub>4</sub> )	0,01
Άγαρ	15,00

#### 2.4.2.3.2 Cellulose Medium Agar

Πρόκειται για συνθετικό θρεπτικό υλικό με μοναδική πηγή άνθρακα την κυτταρίνη. Χρησιμοποιείται τόσο για την απομόνωση κυτταρινολυτικών μυκήτων όσο και για την μελέτη της δυνατότητας αποδόμησης της κυτταρίνης από διάφορους μύκητες

<u>Συστατικά</u>	g/l
Κυτταρίνη	20,00
Φωσφορικό δικάλιο (K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,00
Θειικό αμμώνιο (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50
L-ασπαραγγίνη	0,50
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,50
Εκχύλισμα ζύμης (malt extract)	0,50
Θειικό μαγνήσιο (MgSO <sub>4</sub> )	0,20
Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl <sub>2</sub> )	0,10
Άγαρ	15,00

#### 2.4.2.3.3 Basal Lignin Medium Agar

Αποτελεί συνθετικό θρεπτικό διάλυμα με μοναδική πηγή άνθρακα τη λιγνίνη. Χρησιμοποιείται συχνά για την απομόνωση λιγνινολυτικών μυκήτων και βακτηρίων, καθώς και για την εξέταση της δυνατότητας αποδόμησης της λιγνίνης από διάφορους μικροοργανισμούς

<u>Συστατικά</u>	g/l
Φωσφορικό δικάλιο (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,50
Θειικό μαγνήσιο (MgSO <sub>4</sub> )	0,20
Νιτρικό αμμώνιο (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	0,10
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0,10
Θειικός σίδηρος (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,02
Νιτρικό ασβέστιο (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )·4H <sub>2</sub> O	0,05
Εκχύλισμα ζύμης (malt extract)	2,00

Άγαρ 15,00

Μετά την αποστείρωση του παραπάνω διαλύματος προστίθενται ασηπτικά:

KOH 1M	5 ml
Γουαϊακόλη	0,4 ml
Λιγνίνη	1g (σε 10 ml διοξάνης)

#### 2.4.2.4 Προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης

Αρχικά, οι μετρήσεις της γραμμικής ταχύτητας αύξησης πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ικανότητας διαφόρων στελεχών να αποικίζουν θρεπτικά υλικά που περιείχαν διαφορετική πηγή άνθρακα. Ταυτόχρονα προσδιορίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μετρώντας την ταχύτητα αύξησης σε διάφορες θερμοκρασίες (15, 18, 21, 24, 27, 30 και 33°C). Για το σκοπό αυτό, στο κέντρο τρυβλίου που περιείχε 10ml από τα προαναφερθέντα θρεπτικά υλικά τοποθετήθηκε κυκλικό εμβόλιο διαμέτρου 6mm. Ο υπολογισμός της μέσης ταχύτητας αύξησης, έγινε μέσω της καθημερινής μέτρησης της αύξησης του μυκηλίου σε δύο (κάθετους μεταξύ τους) άξονες για συνολικό διάστημα 10 ημερών.

Για τη συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών όσον αφορά τη γραμμική ταχύτητα αύξησης και τη δυνατότητα σχηματισμού καρποφοριών σε μείγματα αχύρου και TPOMW, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες ("race tubes") διαστάσεων 200 × 30 mm, όπως περιγράφεται από τους Zervakis et al. (2001). Για κάθε στέλεχος και υπόστρωμα, 4 σωλήνες γεμίστηκαν με υπόστρωμα σε μήκος (ύψος) 10 cm, αποστειρώθηκαν (121 °C, 1,1, atm, 30 min) και ακολούθησε εμβολιασμός των υποστρωμάτων με κυκλικό δίσκο διαμέτρου 10 mm που παραλήφθηκε από την περιφέρεια ενεργά αναπτυσσόμενης αποικίας σε PDA. Ο αποικισμός έλαβε χώρα στους 27°C και η γραμμική αύξηση προσδιοριζόταν με καθημερινές μετρήσεις του 'μετώπου' της αποικίας σε τέσσερα αντιδιαμετρικά ευρισκόμενα σημεία πάνω στην πλευρική επιφάνεια κάθε δοκιμαστικού σωλήνα και για χρονικό διάστημα 7 ημερών.

#### 2.4.2.5 Προετοιμασία υποστρωμάτων και διαδικασία καλλιέργειας μανιταριών

Συνολικά προετοιμάστηκαν έντεκα υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα των ακόλουθων παραπροϊόντων: Άχυρο σίτου (WS), κλαδέματα ελιάς (OLPR), και φύλλα ελιάς

(OL) τα οποία συλλέχθηκαν από τον ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και απόβλητα ελαιοτριβείων δύο φάσεων (TROMW) τα οποία προήλθαν από ελαιοτριβείο της Καλαμάτας. Στα υποστρώματα προστέθηκαν ανθρακικό ασβέστιο (CaCO<sub>3</sub>) 2% w/w για την ρύθμιση του pH και πίτουρο σε αναλογία 5% (β/β) για τον εμπλουτισμό σε άζωτο και άλλα ιχνοστοιχεία. Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις (βάρους 2 kg η κάθε μία). Η προετοιμασία του πολλαπλασιαστικού υλικού, ο εμβολιασμός, οι συνθήκες καλλιέργειας καθώς και οι καλλιεργητικές παράμετροι που μελετήθηκαν είναι όμοιες με αυτές που περιγράφονται στις Παραγράφους 2.1.2.2 και 2.1.2.3.

Το ποσοστό βιομετατρεψιμότητας του υποστρώματος σε μυκητιακή βιομάζα υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Βιομετατρεψιμότητα υποστρώματος (\%)} = \frac{\text{Μυκητιακή βιομάζα υποστρώματος} + \text{Βάρος καρποφοριών}}{\text{Αρχικό βάρος υποστρώματος}}$$

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το ξηρό βάρος των επιμέρους παραμέτρων.

#### 2.4.2.6 Χημικές αναλύσεις στα μανιτάρια και τα υποστρώματα ανάπτυξης

Ο προσδιορισμός της βασικής σύστασης (τέφρα, φυτικές ίνες, ολικό λίπος και ολικές πρωτεΐνες) έγινε σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από την AOAC (1995). Επιπλέον η εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας υλοποιήθηκαν όπως ακριβώς αναλύθηκε στα Κεφάλαια 2.1.2.6 και 2.1.2.8 αντίστοιχα. Τέλος, η μέτρηση των επιμέρους κλασμάτων των ινωδών συστατικών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Goering and Van Soest (1970) όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.2.6, ενώ ο υπολογισμός της μυκηλιακής βιομάζας στο υπόστρωμα, όπως στην Παράγραφο 2.2.2.8.

#### 2.4.2.7 Εκχύλιση των ενζύμων και υπολογισμός της ενζυμικής ενεργότητας

Η εκχύλιση των ενζύμων βασίστηκε στη μέθοδο των Gassara et al. (2010). Δείγμα (1 g νωπού υποστρώματος) τοποθετήθηκε σε πλαστικά δοχεία τύπου falcon. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 10 ml buffer φωσφορικού νατρίου 50 mM και ακολούθησε ανάδευση για 1 h σε 150 rpm. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 20 min στις 7000 g, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα για τις αναλύσεις των ενζύμων.

Η ενεργότητα του ενζύμου λακκάση (Lac, E.C. 1.10.3.2: benzenediol: oxygen oxidoreductase) προσδιορίστηκε στα 425nm μέσω της οξείδωσης 0,4mL ABTS (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) (1,5mM) με 0,8 mL δείγματος σε 1,2mL Na-tartrate buffer (0.1M, pH 4.5), (Bourbonnais et al., 1990).

Η ανεξάρτητη του Mn υπεροξειδάση (Manganese-independent peroxidase, MnIP) μετρήθηκε στα 590 nm από την οξειδωτική σύζευξη 0,1mL MBTH (3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone) (1mM) και 0,2mL DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) (25mM) παρουσία 0,01 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10mM) τα οποία προστέθηκαν σε 0,66 ml δείγματος και 1 mL succinate-lactate buffer (0.1M, pH 4.5), αφαιρώντας την ενεργότητα του υποβάθρου (background activity), η οποία υπολογίστηκε όπως ακριβώς η προηγούμενη χωρίς όμως την παρουσία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ntougias et al., 2012).

Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης του μαγγανίου (MnP, E.C. 1.11.1.13 (MnII): hydrogen peroxide oxidoreductase) μετρήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε για την MnIP με την παρουσία όμως 0,01mL MnSO<sub>4</sub> (20mM), και αφαιρώντας την MnIP.

Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (Lignin peroxidase, LiP, E.C. 1.11.1.14: diarylpropane: oxygen, hydrogen-peroxide oxidoreductase) μετρήθηκε στα 310 nm καταγράφοντας την οξείδωση 0,07 ml veratryl alcohol (20 mM) σε veratryl aldehyde η οποία προστέθηκε σε 0,8 ml δείγματος και 1,6 ml Na-tartrate buffer (0,1 M, pH 3) παρουσία 0,03 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (54 mM) (Tien and Kirk 1984).

Η ενεργότητα της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl alcohol oxidase, VAOx,) διερευνήθηκε όπως περιγράφεται για την Lip αλλά χωρίς την παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Η ενεργότητα της Carboxymethylcellulase (CMCase) αναλύθηκε με 1% διάλυμα carboxymethyl cellulose ως υπόστρωμα σε 0,05 M citrate buffer (pH 5.0) σύμφωνα με τις οδηγίες της IUPAC (Ghose 1987). Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 10 min σε buffer στους 50°C. Η ενεργότητα της ξυλανάσης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα 1% ξυλάνης από ξύλο σημύδας (Roth 7500) ως υπόστρωμα σε 0,05 M citrate buffer (pH 5.0). Η απελευθέρωση της γλυκόζης και ξυλόζης αντίστοιχα για 10 min στους 50°C μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέως (Bailey et al. 1992).

Η ενεργότητα της exo-1, 4-β-glucanase (EC 3.2.1.4), προσδιορίστηκε μετρώντας τον ρυθμό της υδρόλυσης του p-nitrophenyl-β-d-cellobioside σύμφωνα με τη μέθοδο των Routanen and Puls (1988). Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 1,8 ml (2,5 mM) υποστρώματος

και 0,2 ml του εκχυλίσματος ενζύμων και επώαστηκε στους 50°C για 10 min. Η αντίδραση διεκόπη με την προσθήκη 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M στο μείγμα.

Για όλα τα ένζυμα μια μονάδα ενεργότητα (U) ισοδυναμεί με την ποσότητα του ενζύμου που μετασχηματίζει 1 μmol του υποστρώματος ανά min.

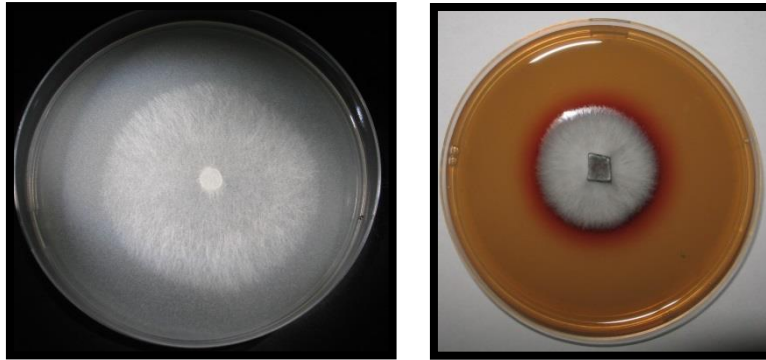
#### 2.4.2.8 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Φάσματα υπέρυθρου μετασχηματισμού FTIR ελήφθησαν από τα αρχικά (πριν τον εμβολιασμό) και τα εξαντλημένα δείγματα υποστρωμάτων καλλιέργειας μανιταριών. Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο Nicolet 6700 (ThermoScientific, USA), εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεικής τριγλυκίνης (με πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης βρωμιούχου καλίου) και λογισμικό Omnic 7.3 (ThermoScientific, USA). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν 64 σαρώσεις της υπεριώδους περιοχής μεταξύ 4000 και 400 cm<sup>-1</sup> με ανάλυση 4 cm<sup>-1</sup> και υπολογίστηκε το μέσο φάσμα. Πριν από τη φασματοσκοπική ανάλυση, τα φάσματα εξομαλύνθηκαν με τον αλγόριθμο Savitzky-Golay (Savitzky and Golay 1964) [5 σημεία σε κάθε πλευρά (συνολικά 11 σημεία εξομάλυνσης) και ένα πολυώνυμο μηδενικής τάξης]. Η baseline διορθώθηκε και ομαλοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού R-studio 1.0.136 / R3.3.3 το οποίο περιείχε τα πακέτα “prospectr” και “baseline” (Stevens and Ramirez-Lopez 2013, Liland 2015).

### 2.4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 2.4.3.1 Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης και βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης αποικιών σε στερεά υποστρώματα

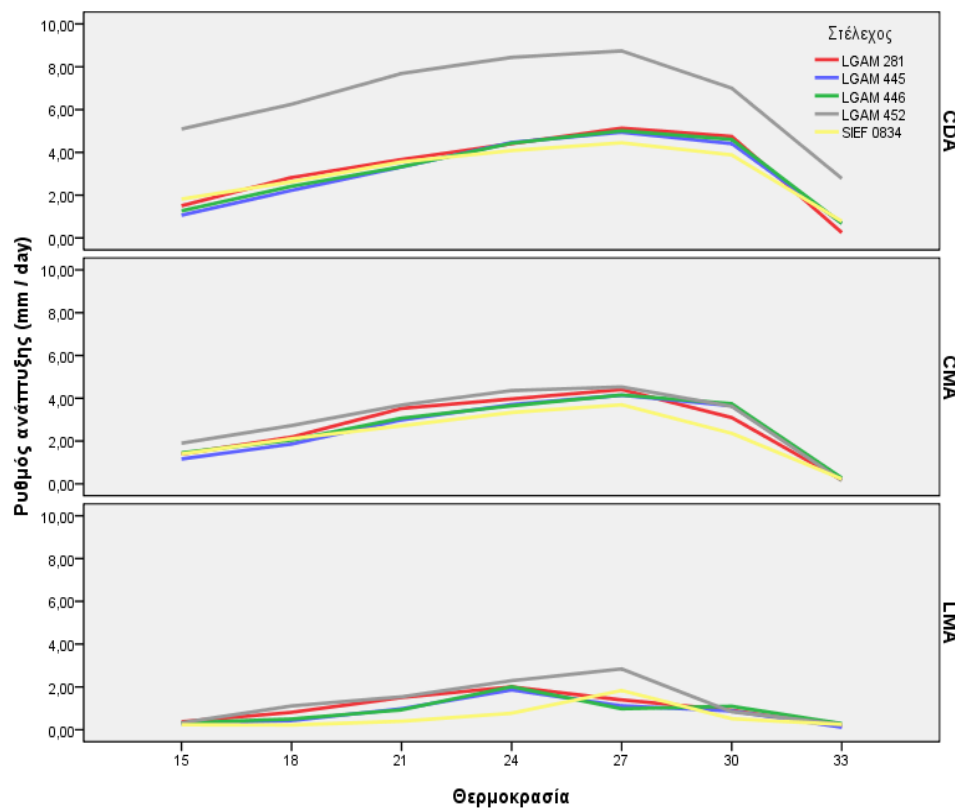
Όπως προέκυψε από την αξιολόγηση της ανάπτυξης των πέντε στελεχών *C. cylindracea*, η μέγιστη ταχύτητα γραμμικής αύξησης αποικιών του μύκητα εμφανίστηκε στο θρεπτικό υλικό Czapek Dox Agar, ακολουθούμενη από το θρεπτικό που περιείχε κυτταρίνη, ενώ οι μικρότερες τιμές καταγράφηκαν σε αυτό που περιείχε λιγνίνη. (Εικόνα 2.4.1). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση την ευκολία αποδόμησης της μοναδικής πηγής άνθρακα σε κάθε ένα από τα θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Στο μεν CDA η πηγή άνθρακα είναι η σακχαρόζη, δηλαδή δισακχαρίτης άμεσα αφομοιώσιμος από τους μύκητες, στο CMA η κυτταρίνη που αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που διασπάται σχετικά εύκολα από



Εικόνα 2.4.1 Αποικίες (8 ημερών) του στελέχους *C. cylindracea* LGAM 446 σε στερεοποιημένα θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα την κυτταρίνη (αριστερά) και τη λιγνίνη (δεξιά).

τους περισσότερους μύκητες, ενώ η λιγνίνη αποτελεί το πιο σύνθετο και δύσκολο στην αποδόμηση του συστατικό συγκριτικά με τα προηγούμενα.

Αναφορικά με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, οι μεγαλύτερες τιμές της γραμμικής ταχύτητας για όλα τα στελέχη σημειώθηκαν στους 27 °C (Γράφημα 2.4.1) με εξαίρεση τα στελέχη LGAM 445, 446 και 281 αλλά μόνο στο υπόστρωμα LMA (για το οποίο οι υψηλότεροι ρυθμοί ανάπτυξης καταγράφηκαν στους 24°C).



Γράφημα 2.4.1. Γραμμική ταχύτητα αύξησης ( $\text{mm day}^{-1}$ ) αποικιών πέντε στελεχών *C. cylindracea* σε επτά διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης. Τα τρία γραφήματα αντιστοιχούν σε ισάριθμα θρεπτικά υλικά (CDA: Czapek Dox Agar, CMA: cellulose medium agar και LMA: Lignin Medium Agar).

### 2.4.3.2 Προσδιορισμός της ταχύτητας αποικισμού υποστρωμάτων που περιέχουν απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων από τον μύκητα *C. cylindracea*

Των πειραμάτων καλλιέργειας προηγήθηκε η αξιολόγηση των πέντε προαναφερθέντων στελεχών ως προς την ικανότητα τους να αποικίζουν υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο αναμεμειγμένο ή μη με ελαιουργικά απόβλητα. Η εν λόγω δοκιμή υιοθετήθηκε λόγω της μεγάλης παραλλακτικότητας που συνήθως εμφανίζεται τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών όσο και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους όσον αφορά την ανάπτυξη τους σε λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα (βλ. Κεφάλαιο 2.1. και 2.2, Ntougias et al., 2012, Zervakis et al., 2013).

**Πίνακας 2.4.1. Ρυθμός ανάπτυξης (mm/day) πέντε στελεχών *C. cylindracea* αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο σίτου (WS) και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση. Τα κεφαλαία γράμματα στους εκθέτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών, ενώ τα πεζά μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Στέλεχος	WS	Υπόστρωμα			
		WS:TPOMW	WS:TPOMW	WS:TPOMW	WS:TPOMW
		4:1	3:2	2:3	1:4
LGAM445	11,34 $\pm$ 1,21 <sup>Aa</sup>	7,22 $\pm$ 0,37 <sup>Ab</sup>	3,51 $\pm$ 0,63 <sup>Ac</sup>	2,23 $\pm$ 1,04 <sup>Ac</sup>	-
LGAM446	11,11 $\pm$ 0,58 <sup>Aa</sup>	7,12 $\pm$ 0,20 <sup>Ab</sup>	3,52 $\pm$ 0,74 <sup>Ac</sup>	1,49 $\pm$ 1,03 <sup>Ad</sup>	-
LGAM281	10,90 $\pm$ 0,38 <sup>Aa</sup>	7,09 $\pm$ 0,89 <sup>Ab</sup>	3,29 $\pm$ 0,26 <sup>Ac</sup>	1,26 $\pm$ 1,05 <sup>Ad</sup>	-
SIEF0834	9,27 $\pm$ 0,30 <sup>Aa</sup>	6,09 $\pm$ 0,81 <sup>Ab</sup>	1,18 $\pm$ 0,57 <sup>Bc</sup>	0,10 $\pm$ 0,07 <sup>Bc</sup>	-
LGAM452	10,58 $\pm$ 0,48 <sup>Aa</sup>	7,79 $\pm$ 0,69 <sup>Ab</sup>	2,87 $\pm$ 0,57 <sup>Ac</sup>	-	-

Βάσει των μετρήσεων, σε όλα τα στελέχη ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης σημειώθηκε στο υπόστρωμα WS, ενώ η αύξηση της περιεκτικότητας σε TPOMW οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές χαμηλότερες τιμές (Πίνακας 2.4.1). Όταν η περιεκτικότητα του TPOMW ξεπέρασε το 60%, η τοξικότητα του αποβλήτου δεν επέτρεψε την μυκηλιακή ανάπτυξη. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πέντε στελεχών που εξετάστηκαν, με εξαίρεση το SIEF 0834, το οποίο αποδείχθηκε πιο αργό στα υποστρώματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε TPOMW (60%). Μετά το τέλος της επώασης (πλήρη κάλυψη του υποστρώματος από τις υφές) οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο

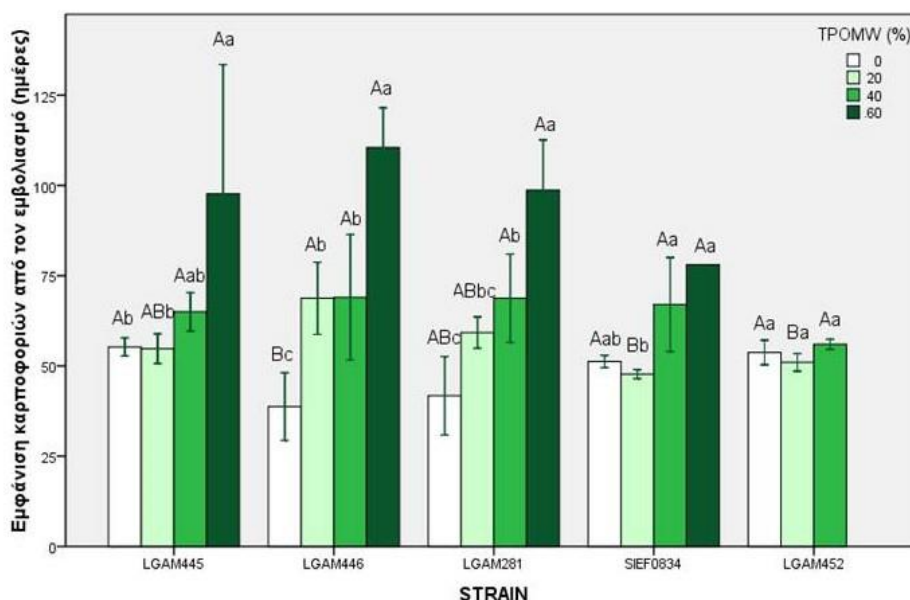


καλλιέργειας μανιταριών (15 °C, σχετική υγρασία 85%) ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα των υποστρωμάτων στον σχηματισμό και την ανάπτυξη μανιταριών.



Εικόνα 2.4.2. Καταβολές καρποφοριών και ώριμα μανιτάρια του στελέχους LGAM 446 σχηματισμένα σε "race tubes" που περιείχαν μείγμα WS:TPOMW 4:1

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις, όλα τα στελέχη σχημάτισαν καρποφορίες ακόμη και στα υποστρώματα που περιείχαν 60% TPOMW, με μόνη εξαίρεση το LGAM 452 (Γράφημα 2.4.2). Ωστόσο, ο χρόνος που απαιτήθηκε για τον σχηματισμό επηρεάστηκε σημαντικά από την ποσότητα του αποβλήτου. Συγκεκριμένα, στο άχυρο (WS) η εμφάνιση των καρποφοριών ήταν πρωιμότερη, χωρίς να διαφέρει όμως σημαντικά από τα υπόλοιπα υποστρώματα.



Γράφημα 2.4.2. Πρωιμότητα σχηματισμού καρποφοριών σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες πέντε στελεχών *C. cylindracea* αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο σίτου (WS) και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) σε διάφορες αναλογίες προσθήκης του δεύτερου (0, 20, 40 και 60%, κ.β.). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση. Τα κεφαλαία γράμματα αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών, ενώ τα πεζά μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Τελικά επιλέχθηκαν δύο στελέχη (*C. cylindracea* LGAM 281 και *C. cylindracea* LGAM 446) για περαιτέρω αξιολόγηση σε πειράματα μεγαλύτερης κλίμακας. Η επιλογή βασίστηκε τόσο στην υψηλή ταχύτητα αύξησης που παρουσίασαν τα δύο στελέχη στα διάφορα μείγματα των υποστρωμάτων όσο και στην πρωιμότερη εμφάνιση καρποφοριών συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη (Πίνακας 2.4.1, Γράφημα 2.4.2). Το στέλεχος *C. cylindracea* LGAM 445, παρόλο που εμφάνισε συγκρίσιμες τιμές στις παραπάνω παραμέτρους με τα άλλα δύο στελέχη, αποκλείστηκε από τη συνέχεια των πειραμάτων λόγω της χαμηλής ποιότητας των μανιταριών που σχημάτισε (μη φυσιολογικό σχήμα καρποφοριών).

### **2.4.3.3 Αλλαγές στη σύσταση του υποστρώματος κατά τη διάρκεια του αποικισμού του από τον μύκητα *C. cylindracea***

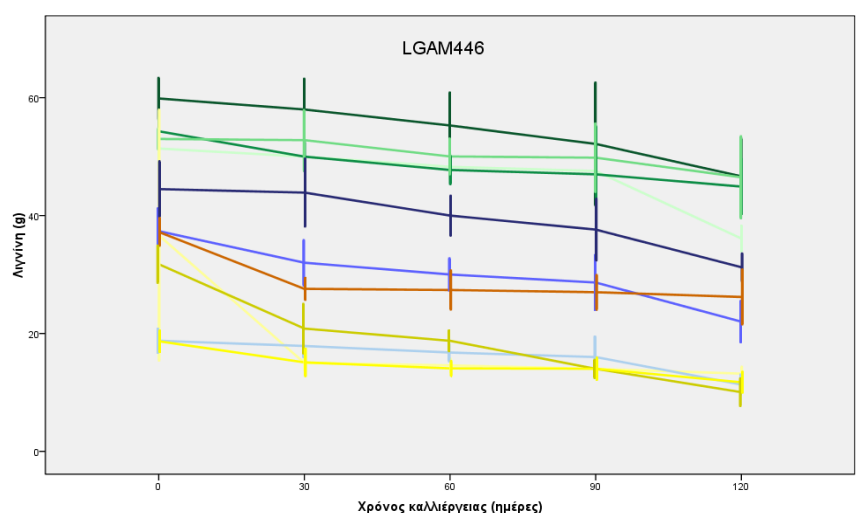
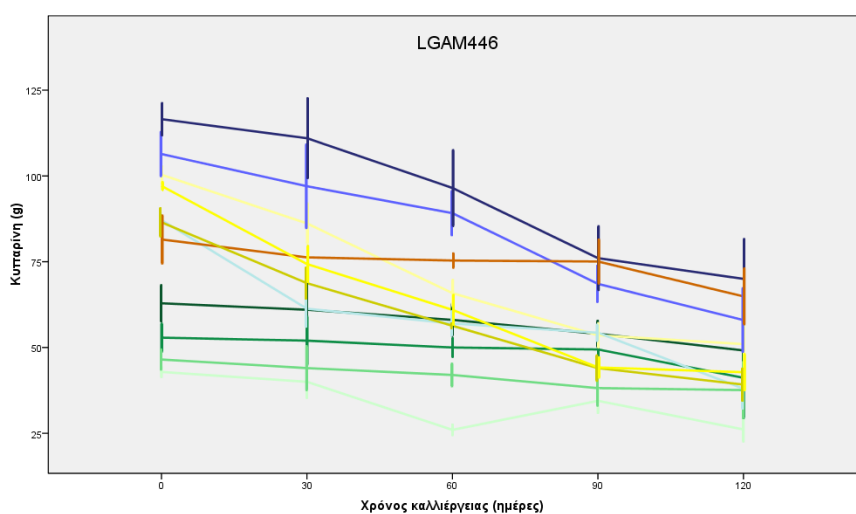
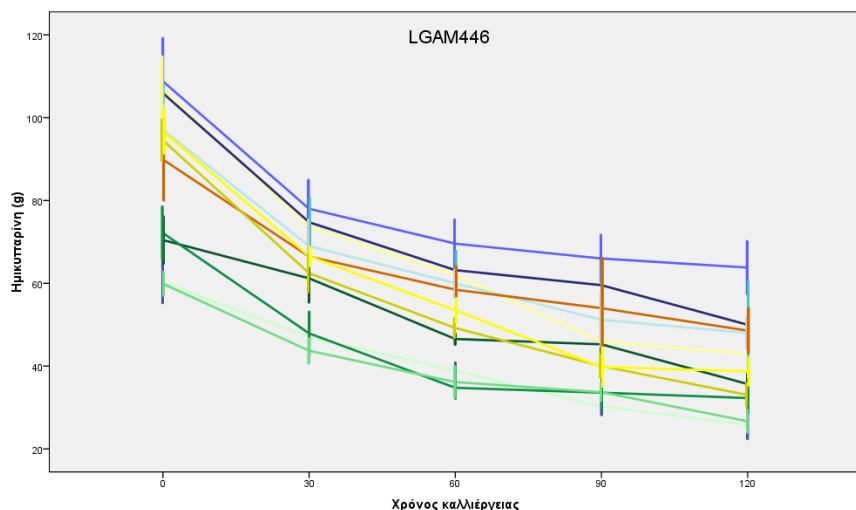
Τα υποστρώματα πριν την αποστείρωση αφέθηκαν για 24 ώρες μέσα σε νερό ώστε να αυξηθεί η υγρασία τους και έπειτα στραγγίστηκαν ώστε να απομακρυνθεί το πλεονάζον ύδωρ. Η διαφορετική υδατοϊκανότητα του κάθε υλικού που χρησιμοποιήθηκε, είχε σαν αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της ξηρής μάζας σε κάθε υπόστρωμα (Πίνακας 2.4.2.). Έτσι το αρχικό ξηρό βάρος των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκε, κυμάνθηκε από 291 έως και 430 g. Αντίστοιχα σημαντική διαφοροποίηση καταγράφηκε και στην περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά. Οι ημικυτταρίνες αποτέλεσαν την κατηγορία ενώσεων που ανιχνεύτηκε στη μεγαλύτερη αφθονία σε όλα τα υποστρώματα και κυμάνθηκε από 15,4% έως 34,4% (ξ.β.) στο αρχικό υλικό. Μεταξύ των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν το άχυρο εμφανίζει τη μεγαλύτερη ποσότητα, ενώ τα φύλλα ελιάς τη μικρότερη (Πίνακας 2.4.2). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις κυτταρίνης και λιγνίνης προσδιορίστηκαν στα μείγματα WS:OLPR και OL:TPOMW αντίστοιχα. Γενικά, η προσθήκη TPOMW στο άχυρο δείχνει να μειώνει την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε κυτταρίνη και να αυξάνει σημαντικά αυτή της λιγνίνης. Αύξηση και των δύο προαναφερθέντων ενώσεων συμβαίνει και με την αύξηση της ποσότητας των ελαιοκλαδεμάτων στο υπόστρωμα ως συνέπεια του σημαντικού ποσοστού ξυλωδών υπολειμμάτων που περιέχουν. Τέλος, η ανάμιξη του OL με TPOMW δεν οδηγεί σε σημαντικές διαφοροποιήσεις, λόγω της ομοιότητας στην ινώδη σύσταση των δυο υλικών (Πίνακας 2.4.2).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν στη μείωση του ολικού ξηρού βάρους των υποστρωμάτων μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων, όπως αυτή μετρήθηκε μετά το πέρας της καλλιεργητικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη απώλεια μάζας λό-

**Πίνακας 2.4.2. Ξηρό βάρος και περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνες, κυτταρίνη και λιγνίνη (g) στα αρχικά υποστρώματα και ποσοστιαία μείωση τους (%) από τα δύο στελέχη του μύκητα *C. cylindracea* μετά το πέρας της καλλιέργειας (120 ημέρες από τον εμβολιασμό).**

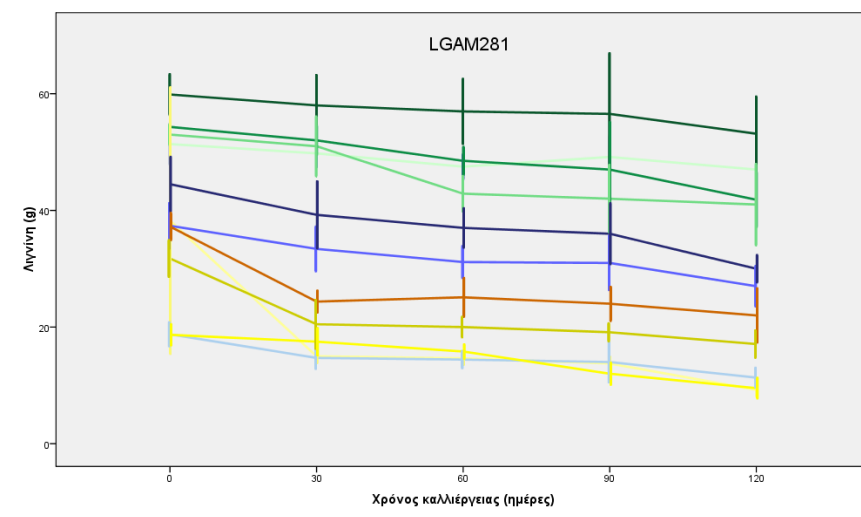
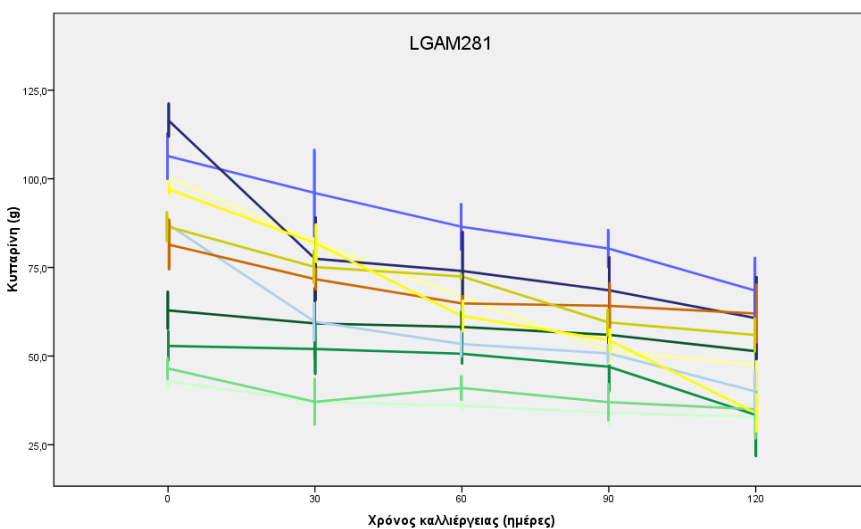
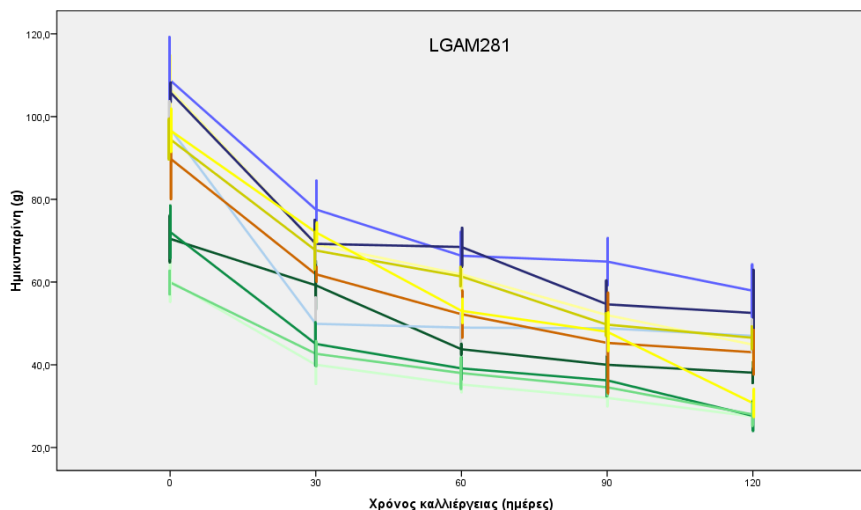
Υπόστρωμα Στέλεχος	Ξηρό βάρος υποστρώματος			Ημικυτταρίνες			Κυτταρίνη			Λιγνίνη		
	Αρχικό (g)	Μείωση %		Αρχικό (g)	Μείωση %		Αρχικό (g)	Μείωση %		Αρχικό (g)	Μείωση %	
		LGAM446	LGAM281		LGAM446	LGAM281		LGAM446	LGAM281		LGAM446	LGAM281
WS	310,3	41,4	41,1	10,7	59,7	57,9	100,4	49,2	52,6	15,5	14,7	40,3
WS:ΤΡΟΜW 7:1	399,6	42,3	56,6	9,7	59,9	68,2	97,1	55,9	65,0	18,7	37,2	49,0
WS:ΤΡΟΜW 3:1	299,5	47,5	29,1	94,6	65,1	50,8	86,5	54,7	35,3	31,8	68,4	46,2
WS:ΤΡΟΜW 1:1	330,0	23,6	33,0	89,9	45,7	51,9	81,5	20,3	23,9	37,2	29,6	40,9
OL	389,9	28,5	35,9	60,2	57,2	54,3	42,9	39,1	23,4	51,4	29,7	8,5
OL:ΤΡΟΜW 7:1	389,9	16,1	26,4	59,9	55,4	53,3	46,5	19,1	24,7	53,0	12,3	22,6
OL:ΤΡΟΜW 3:1	429,3	30,0	29,5	72,1	55,2	61,6	52,9	22,1	36,8	54,3	17,3	23,0
OL:ΤΡΟΜW 1:1	420,6	29,1	31,6	70,5	49,4	45,9	62,9	21,8	18,3	60,0	22,1	11,2
WS:OLPR 3:1	290,9	31,3	30,6	108,8	50,6	51,6	87,1	56,4	54,1	18,8	30,7	30,7
WS:OLPR 1:1	400,4	15,4	24,2	105,9	41,4	46,8	106,4	45,5	35,7	37,6	41,1	27,7
WS:OLPR 1:3	430,3	26,8	27,6	100,4	52,8	50,4	116,6	39,9	47,9	44,5	29,8	32,6

γω της ανάπτυξης του μύκητα (> 40%) σημειώθηκε στον μάρτυρα (WS) και στο μείγμα WS:TPOMW 7:1. Αντίθετα η μείωση δεν ξεπέρασε το 35% στα υποστρώματα που περιείχαν μείγματα φύλλων ή κλαδεμάτων ελιάς (Πίνακας 2.4.2. Όσον αφορά τα επιμέρους ινώδη συστατικά, η συνολική ποσοστιαία μείωση μετά το πέρας της καλλιέργειας κυμάνθηκε από 41 έως 68% στις ημικυτταρίνες, 18 – 65% στην κυτταρίνη και 9 – 68% στη λιγνίνη. Οι μεγάλες διαφορές τόσο στη μείωση της συνολικής μάζας όσο και των επιμέρους οργανικών μορίων, οφείλονται προφανώς στη διαφορετική μυκηλιακή δραστηριότητα σε καθένα από αυτά. Αυτό, εν μέρει αποδεικνύεται από τη θετική συσχέτιση της μείωσης της συνολικής φυτικής βιομάζας με τη βιολογική αποδοτικότητα των δύο στελεχών ( $r = 0,66$  και  $r = 0,38$  για τα στελέχη LGAM 446 και LGAM 281), αλλά και των επιμέρους συστατικών, με πιο χαρακτηριστικές τις περιπτώσεις της κυτταρίνης ( $r = 0,54$  και  $r = 0,46$  αντίστοιχα) και της λιγνίνης ( $r = 0,60$  και  $r = 0,83$  αντίστοιχα). Αντίθετα χαμηλή (θετική) συσχέτιση ανιχνεύθηκε μεταξύ της βιολογικής αποδοτικότητας και της μείωσης των ημικυτταρινών ( $r = 0,21 - 0,22$ ) παρόλο που οι τελευταίες αποτελούν το πιο εύκολα αποδομήσιμο οργανικό συστατικό μεταξύ των τριών που εξετάστηκαν. Όσον αφορά την πορεία της μείωσης της μάζας του υποστρώματος (μετρημένη στις 0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες από τον εμβολιασμό) φάνηκε να είναι ομοιόμορφη κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Μεταξύ των οργανικών μεγαλομορίων, οι ημικυτταρίνες διασπώνται κατά προτίμηση από τον μύκητα κατά τις πρώτες 30 ημέρες της ανάπτυξης του στα υποστρώματα, η κυτταρίνη στα ενδιάμεσα στάδια της καλλιέργειας (30-90 ημέρες), ενώ η μεγαλύτερη μείωση στο ποσοστό της λιγνίνης σημειώθηκε μετά τις 90 πρώτες ημέρες (Γράφημα 2.4.3 και 2.4.4). Επομένως, αποδεικνύεται ότι η αποδόμηση των ινωδών συστατικών χαρακτηρίζεται από μια διαδοχή, ανάλογη της ευκολίας με την οποία μπορούν οι μύκητες να αντλήσουν άνθρακα και ενέργεια από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται.



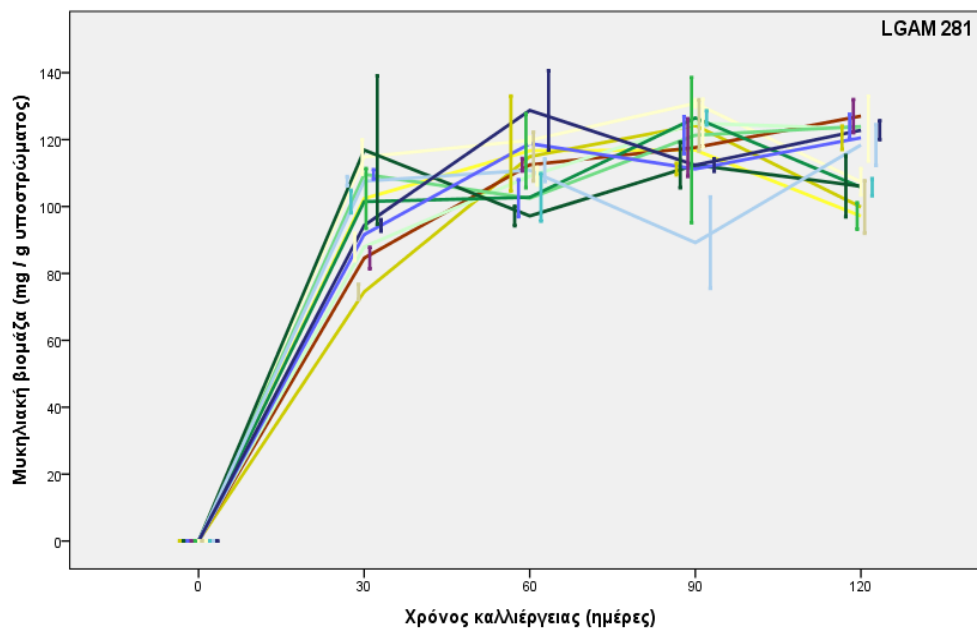
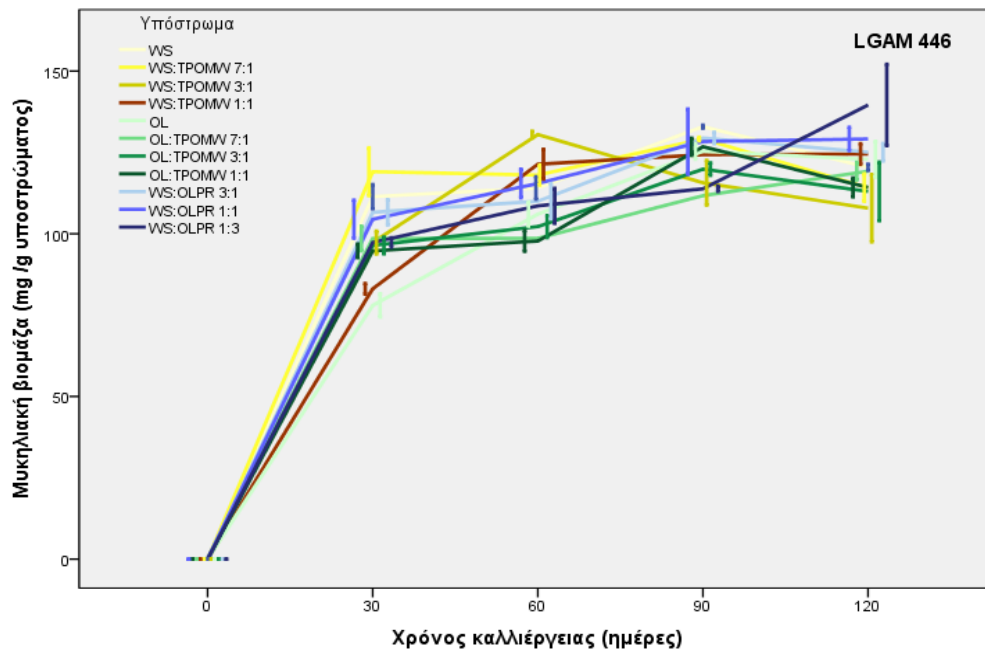
- Υπόστρωμα
- WS
  - WS:TPOMW 7:1
  - WS:TPOMW 3:1
  - WS:TPOMW 1:1
  - OL
  - OL:TPOMW 7:1
  - OL:TPOMW 3:1
  - OL:TPOMW 1:1
  - WS:OLPR 3:1
  - WS:OLPR 1:1
  - WS:OLPR 1:3

**Γράφημα 2.4.3.** Αποδόμηση των ινωδών συστατικών (ημικυτταρίνες, κυτταρίνη και λιγνίνη) κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (120 ημέρες) του μύκητα *C. cylindracea* LGAM446 σε διαφορετικά υποστρώματα ανάπτυξης αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιολιπιδίου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR), όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις που έγιναν σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές (0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες).



- Υπόστρωμα
- WS
  - WS:TPOMW 7:1
  - WS:TPOMW 3:1
  - WS:TPOMW 1:1
  - OL
  - OL:TPOMW 7:1
  - OL:TPOMW 3:1
  - OL:TPOMW 1:1
  - WS:OLPR 3:1
  - WS:OLPR 1:1
  - WS:OLPR 1:3

Γράφημα 2.4.4. Αποδόμηση των ινωδών συστατικών (ημικυτταρίνες, κυτταρίνη και λιγνίνη) κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (120 ημέρες) του μύκητα *C. cylindracea* LGAM281 σε διαφορετικά υποστρώματα ανάπτυξης αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR), όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις που έγιναν σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές (0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες).



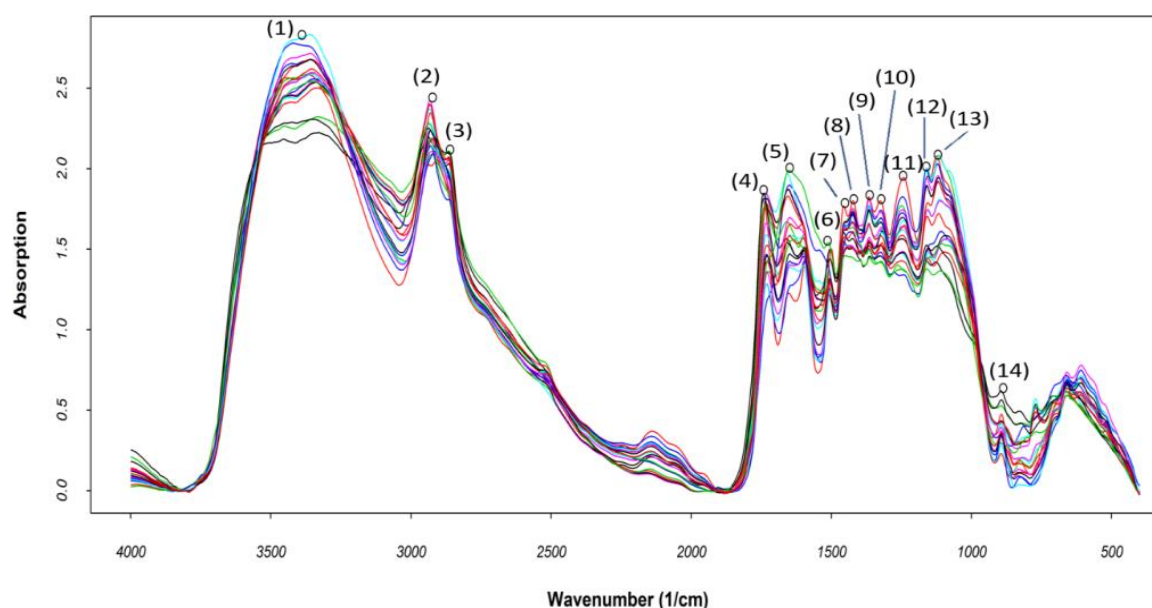
Γράφημα 2.4.5. Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (120 ημέρες) του μύκητα *C. cylindracea* σε διαφορετικά υποστρώματα ανάπτυξης αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιολιπιδίου δύο φάσεων (TROMWV), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

Εκτός των ινωδών συστατικών, στις ίδιες χρονικές στιγμές έγινε προσδιορισμός της μυκηλιακής βιομάζας σε κάθε ένα από τα υποστρώματα ανάπτυξης. Παρόλο που καταγράφηκε διαφορετικός ρυθμός ανάπτυξης, δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων αλλά και μεταξύ των δύο στελεχών (Γράφημα 2.4.5). Είναι αξιοσημείωτο ότι τις πρώτες 30 ημέρες (που περιλαμβάνουν το στάδιο της επώασης)

σημειώνεται ταχεία αύξηση της μυκηλιακής βιομάζας, ενώ μετά την πλήρη κάλυψη όλου του όγκου του υποστρώματος από τις μυκηλιακές υφές μέχρι και το τέλος τις καλλιέργειας παρατηρούνται πολύ μικρές διακυμάνσεις. Για τα περισσότερα από τα υποστρώματα η μέγιστες τιμές της μυκηλιακής βιομάζας μετρήθηκαν στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου και οι αντίστοιχες τιμές κυμάνθηκαν από 108 έως 140 mg g<sup>-1</sup> υποστρώματος για το LGAM446 και από 97 έως 124 mg g<sup>-1</sup> υποστρώματος για το LGAM281.

#### 2.4.3.4 Χρήση της φασματοσκοπίας μέσου υπέρυθρου φωτός για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ των αρχικών υποστρωμάτων.

Η φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου φωτός (FTIR) αποτελεί ένα ιδανικό “εργαλείο” το οποίο γρήγορα, με ακρίβεια και με τρόπο μη καταστρεπτικό μπορεί να συνεισφέρει στη μελέτη της ποιότητας και των λειτουργικών ιδιοτήτων πληθώρας οργανικών δειγμάτων (Fagan, 2014). Η FTIR έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον χαρακτηρισμό και τον προσδιορισμό του σταδίου ωρίμανσης κομπόστ (Bekiaris et al., 2015, Smidt et al., 2005), την βιοσυσσώρευση φωσφόρου (Bekiaris et al., 2016), την ταυτοποίηση διάφορων ειδών μυκήτων (Zervakis et al., 2012) κ.α.



Γράφημα 2.4.6. FTIR φάσματα των αρχικών (μη εμβολιασμένων) υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του *C. cylindracea*. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν μήκη κύματος στα οποία παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές. (1) 3389, (2) 2922, (3) 2860, (4) 1740, (5) 1650, (6) 1510, (7) 1451, (8) 1420, (9) 1365, (10) 1320, (11) 1244, (12) 1161, (13) 1120 και (14) 890 cm<sup>-1</sup>.

Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε -σε συνδυασμό με τις αναλύσεις που περιγράφηκαν παραπάνω- για να διερευνηθεί αν και κατά πόσο μπορεί να αποτυπώσει τις



μεταβολές στη σύσταση των ινωδών συστατικών μεταξύ του αρχικού και του εξαντλημένου υποστρώματος. Επιπλέον έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν και άλλες χημικές ομάδες/ενώσεις, καθώς και οι διαφοροποιήσεις αυτών μετά τη βιοεπεξεργασία των υποστρωμάτων με τον μύκητα *C. cylindracea*.

Από την παρατήρηση των FTIR φασμάτων των αρχικών υποστρωμάτων γίνεται αντιληπτή η μεγάλη παραλλακτικότητα των IR ζωνών απορρόφησης μεταξύ των υλικών διαφορετικής προέλευσης (Γράφημα 2.4.6).

Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα των αρχικών υποστρωμάτων καθώς και η οι ενώσεις με τις οποίες έχουν συσχετιστεί παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.3. Η κορυφή γύρω στα  $3389\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται συνήθως στη δόνηση των δεσμών O-H του νερού, των αλκοολών και των φαινολών, καθώς επίσης και του N-H των πρωτογενών αμινών (Socrates, 2001).

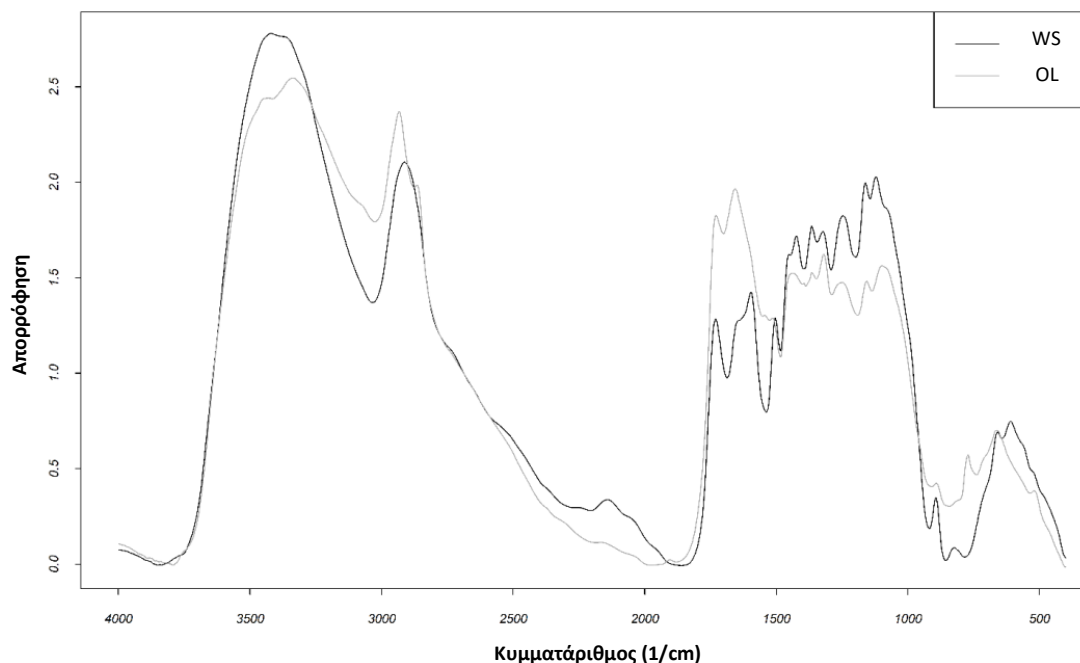
**Πίνακας 2.4.3. Μήκος κύματος των πιο χαρακτηριστικών κορυφών σε φάσματα των αρχικών (μη εμβολιασμένων) υποστρωμάτων, δεσμοί τους οποίους αντιπροσωπεύουν και ενώσεις ή συστατικά με τα οποία σχετίζονται.**

Μήκος κύματος ( $\text{cm}^{-1}$ )	Δόνηση	Ένωση ή χημική ομάδα	Βιβλιογραφία
3389	O-H stretching N-H stretching	Νερό, αλκοόλες και φαινόλες Πρωτοταγείς αμίνες	Socrates, 2001
2922	Asymmetric C-H stretching	Αλειφατικό μεθυλένιο	Coates, 2000
2860	Symmetric C-H stretching	Αλειφατικό μεθυλένιο	Coates, 2000
1740	C=O stretching	Κετόνες, αλδεΐδες και καρβοξυλικά οξέα	Socrates 2001
1650	Conjugated C–O stretching C=O stretching	Υδατάνθρακες Πρωτοταγή και δευτερογενή αμίδια	Pandey and Pitman, 2003, Socrates 2001
1600	C=C stretching N-H deformation	Αρωματικά συστατικά και λιγνίνη	Coates, 2000, Pandey and Pitman, 2003

Αμίνες			
1510	C=C stretching	Αρωματικά συστατικά και λιγνίνη	Bekiaris et al., 2015, Sills and Gossett, 2012
1451	Asymmetric C-H bending	Αλειφατικό μεθυλένιο	Coates, 2000
1420	Symmetric C-H bending	Λιγνίνη και φυτικοί πολυσακχαρίτες	Bekiaris et al., 2015, Pandey and Pitman, 2003, Sills and Gossett, 2012
	O-H deformation / C-O stretching	Φαινολικά συστατικά σε ελαιουργικά απόβλητα	Droussi et al., 2009
1365	Symmetric CH <sub>3</sub> bending	Πολυσακχαρίτες και λιγνίνη	Droussi et al., 2009, Pandey and Pitman, 2003, Sills and Gossett, 2012
1320	C-N stretching	Δευτερογενή αμίδια (amide III region)	Socrates 2001
1244	C-O stretching	Ημικυτταρίνες ή συρινγκυλ-δακτύλιος στη λιγνίνη	Pandey and Pitman, 2003
1161	C-O stretching	Πολυσακχαρίτες, κυτταρίνη	Ciolicou et al., 2011, Socrates 2001
1120	C-O stretching	Πολυσακχαρίτες, κυτταρίνη	Ciolicou et al., 2011, Socrates 2001
890	C-H deformation	Ενώσεις β-πυρανόζης, κυτταρίνη	Ciolicou et al., 2011, Socrates 2001

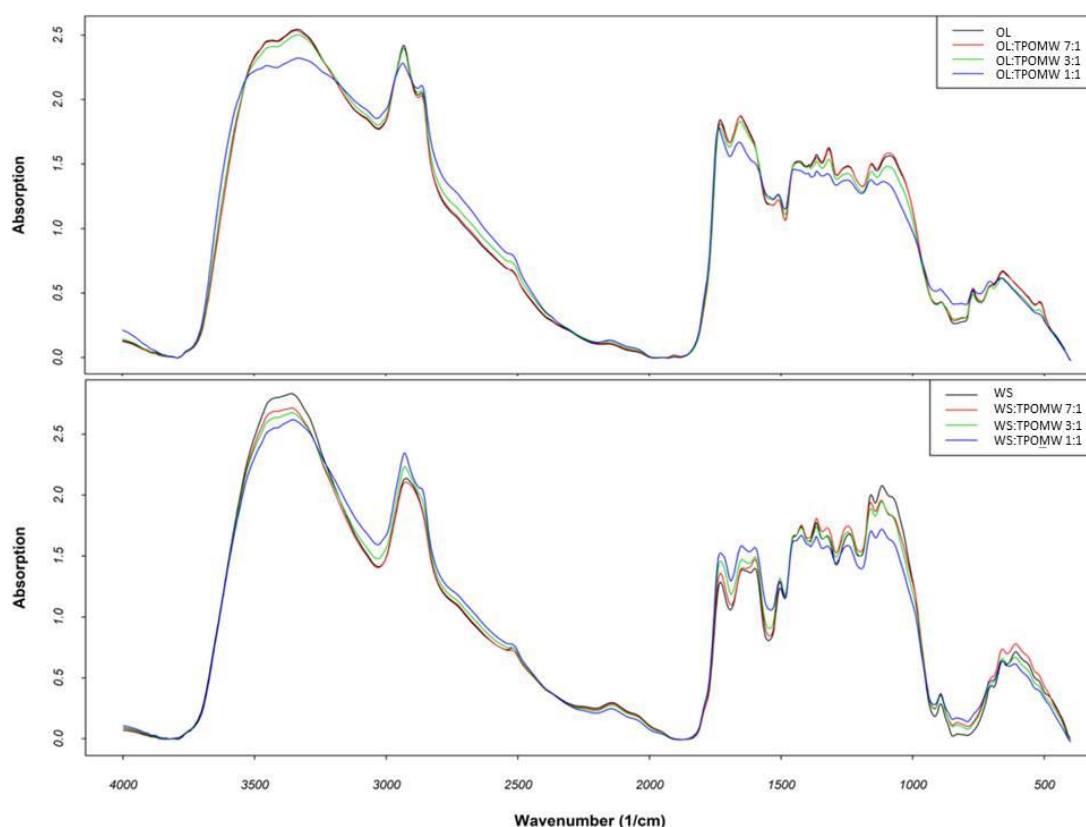
Οι ζώνες στα 2922 και 2860  $\text{cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύουν συμμετρικούς και ασύμμετρους δεσμούς  $\nu\text{C-H}$  των αλειφατικών μεθυλενίων σε συνδυασμό με τη ζώνη 1451  $\text{cm}^{-1}$  για τους δεσμούς  $\delta\text{C-H}$  (Coates, 2000). Η περιοχή 1740  $\text{cm}^{-1}$  έχει αποδοθεί στην παρουσία καρβονυλ  $\nu\text{C=O}$  σε κετόνες, αλδεΐδες και καρβοξυλικά οξέα (Socrates 2001). Η εν λόγω ζώνη έχει συσχετιστεί στο παρελθόν με την παρουσία ημικυτταρινών σε άχυρο, ξύλο οξιάς καθώς και άλλα φυτικά δείγματα (Bekiaris et al., 2015, Pandey and Pitman, 2003, Sills and Gossett, 2012). Η κορυφή που παρατηρείται στα 1650  $\text{cm}^{-1}$  αντιπροσωπεύει τους δεσμούς O-H του νερού, τους συζευγμένους  $\nu\text{C-O}$  των υδατανθράκων και το καρβονύλιο ( $\nu\text{C=O}$ ) των πρωτογενών και δευτερογενών αμιδίων (Pandey and Pitman, 2003, Socrates 2001). Σε ορισμένα φάσματα αυτή η κορυφή συνοδεύτηκε από μια δεύτερη γύρω στα 1620  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία είναι ενδεικτική της παραμόρφωσης του  $\text{NH}_2$  και ενίσχυσε την παραδοχή της

παρουσίας πρωτογενών αμιδίων (Socrates 2001). Η μονή και στενή κορυφή στα  $1510\text{ cm}^{-1}$ , μπορεί να συνδεθεί με το  $\nu\text{C}=\text{C}$  των αρωματικών συστατικών και στο παρελθόν αποδόθηκε στην παρουσία λιγνίνης σε φυτικά υπολείμματα (Bekiaris et al., 2015, Sills and Gossett, 2012). Οι περιοχές στα  $1451$  και  $1420\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστικές των συμμετρικών και ασύμμετρων  $\delta\text{C}-\text{H}$  σε αλειφατικές ενώσεις. Οι κορυφές αυτές έχουν στο παρελθόν αποδοθεί στην παρουσία λιγνίνης και υδατανθράκων της φυτικής βιομάζας, ενώ η κορυφή στα  $1420\text{ cm}^{-1}$  έχει συνδεθεί με την παρουσία φαινολικών ενώσεων σε ελαιουργικά απόβλητα (Droussi et al., 2009). Οι κορυφές στα  $1365$  και  $1320\text{ cm}^{-1}$  συνδέονται με τους συμμετρικούς δεσμούς  $\nu\text{C}-\text{N}$  των δευτερογενών αμιδίων και έχουν συσχετιστεί με την παρουσία λιγνίνης και υδατανθράκων σε φυτικά δείγματα (Bekiaris et al., 2015, Droussi et al., 2009, Pandey and Pitman, 2003, Sills and Gossett, 2012). Η περιοχή  $1244\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση του δεσμού  $\nu\text{C}-\text{O}$  μορίων ημικυτταρινών ή του συρινγκυλ-δακτύλιου της λιγνίνης (Bekiaris et al., 2015, Pandey and Pitman, 2003). Η μετατόπιση της παραπάνω ζώνης σε χαμηλότερα μήκη κύματος ( $1227-1220\text{ cm}^{-1}$ ) ή η παρουσία της ως διπλή με αυτή στα  $1220\text{ cm}^{-1}$  έχει παρατηρηθεί σε ελαιουργικά παραπροϊόντα λόγω των δεσμών  $\nu\text{C}-\text{O}$  των αρυλ-αιθέρων και των φαινολών (Coates 2000, Droussi et al., 2009). Τέλος, οι κορυφές στα  $1160$  και  $1120\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στους  $\nu\text{C}-\text{O}$  δεσμούς των υδατανθράκων, ενώ αυτή στα  $890\text{ cm}^{-1}$  στην κάμψη των ενώσεων β-πυρανόσης. Οι Ciolacu et al., (2011) έχουν αποδείξει ότι οι εν λόγω κορυφές συνδέονται με την παρουσία της κρυσταλλικής και άμορφης κυτταρίνης.



Γράφημα 2.4.7. Φάσματα FTIR των αρχικών υποστρωμάτων (πριν τον εμβολιασμό με τον μύκητα *C. cylindracea*) αποτελούμενα από άχυρο σίτου (WS) και φύλλα ελιάς (OL).

Από την σύγκριση των φασμάτων FTIR μετά την ανάλυση υποστρωμάτων με εντελώς διαφορετική σύσταση (για παράδειγμα των WS και OL, Γράφημα 2.4.7) διαπιστώνονται μεγάλες διαφορές. Ως εκ τούτου και σε συμφωνία με τη σύσταση/ιδιότητες τους, το φάσμα του υποστρώματος WS χαρακτηρίζεται από διακριτές κορυφές σε περιοχές που αντιπροσωπεύουν ινώδη συστατικά ( $1731, 1596, 1503, 1425, 1363, 1254, 1161, 1119, 890 \text{ cm}^{-1}$ ), ενώ στο OL ιδιαίτερα έντονες ήταν οι κορυφές που σχετίζονται με την παρουσία φαινολικών συστατικών ( $3440 \text{ cm}^{-1}$ ) αμιδίων ( $1658$  και  $1316 \text{ cm}^{-1}$ ) καθώς και κορυφές μικρότερης έντασης χαρακτηριστικές των αρωματικών ενώσεων ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ) και της λιγνίνης ( $1503 \text{ cm}^{-1}$ ). Η αύξηση της περιεκτικότητας σε TPOMW στα υποστρώματα OL και WS είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της IR απορρόφησης στην περιοχή  $1200-900 \text{ cm}^{-1}$  (Γράφημα 2.4.8) και θα μπορούσε να αποδοθεί στη χαμηλή περιεκτικότητα του TPOMW σε πολυσακχαρίτες συγκριτικά με τα άλλα δύο υλικά (Dermeche et al., 2013).



**Γράφημα 2.4.8. Φάσματα FTIR των αρχικών υποστρωμάτων (πριν τον εμβολιασμό) αποτελούμενα από άχυρο σίτου (WS) και φύλλα ελιάς (OL) εμπλουτισμένα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) σε διάφορες αναλογίες.**

Επιπλέον, ο υψηλός λόγος του TPOMW οδήγησε σε σημαντική μείωση στα  $1653 \text{ cm}^{-1}$  (περιοχή του αμιδίου I και των υδατανθράκων), στα  $1363 \text{ cm}^{-1}$  (πολυσακχαρίτες και λιγνίνη) και στα  $1316 \text{ cm}^{-1}$  (περιοχή του αμιδίου III). Σημαντική μείωση επίσης παρατηρήθηκε στη χαρακτηριστική περιοχή της λιγνίνης ( $1510 \text{ cm}^{-1}$ ), όταν μειώθηκε η περιεκτικότητά του –

πλούσιου σε λιγνίνη- αχύρου. Αντιθέτως, δεν σημειώθηκε ανάλογη μείωση στα υποστρώματα που είχαν σαν βασικό υλικό τα φύλλα ελιάς, λόγω της παρόμοιας περιεκτικότητας σε λιγνίνη των υλικών OL και TPOMW (Garcia-Gómez et al., 2003).

#### 2.4.3.5 Συγκριτική αξιολόγηση των FTIR φασμάτων πριν και μετά την καλλιέργεια των μανιταριών

Η συγκριτική αξιολόγηση των FTIR φασμάτων, που προήλθαν από υποστρώματα πριν τον εμβολιασμό και μετά το πέρας της καλλιέργειας του μύκητα *C. cylindracea*, κατέδειξε μια σταθερή μείωση των κορυφών  $2940-2850\text{ cm}^{-1}$  (αλειφατικές ενώσεις),  $1740\text{ cm}^{-1}$  (ημικυτταρίνες) και  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  (πολυσακχαρίτες, κυτταρίνη) για όλους τους τύπους των υποστρωμάτων. Αυτό ήταν μάλλον αναμενόμενο, καθώς ο μύκητας *C. cylindracea* αποδομεί πρωτίστως τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη για να καλύψει τις μεταβολικές του ανάγκες σε οργανικές ενώσεις. Επιπροσθέτως, μικρή μείωση καταγράφηκε στην κορυφή που αντιστοιχεί στη λιγνίνη ( $1510\text{ cm}^{-1}$ ) σε όλα τα υποστρώματα. Το τελευταίο, θα μπορούσε να οφείλεται στη μερική αποδόμηση της λιγνίνης και τον σχηματισμό μικρότερων μορίων, που εμφανίζουν υψηλότερη IR απορρόφηση σε ελαφρώς χαμηλότερο κυματάριθμο. Σε πρόσφατη εργασία των Corrêa et al. (2016), σημειώθηκε μείωση στην κορυφή της λιγνίνης ( $1515\text{ cm}^{-1}$ ) σε υπόστρωμα αποτελούμενο από σπάδικες καλαμποκιού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *P. pulmonarius*. Στην προκειμένη περίπτωση, η παρουσία σογιάλευρου (χρησιμοποιείται ως πρόσθετο) σε συνδυασμό με το διαφορετικό είδος του μύκητα και το υπόστρωμα οδήγησαν σε αρκετά διαφορετικά φάσματα πριν και μετά την καλλιέργεια.

Γενικά, στα εξαντλημένα υποστρώματα, αύξηση σημειώθηκε σε κορυφές, των οποίων η απορρόφηση σχετίζεται με την παρουσία πρωτεϊνών ( $1680, 1560$  και  $1320\text{ cm}^{-1}$  για τις περιοχές του αμιδίου I, II και III αντίστοιχα) και των πολυσακχαριτών ( $1450, 1420$  και  $1240\text{ cm}^{-1}$ ). Το πρώτο μπορεί να εξηγηθεί λόγω του πρωτεϊνικού περιεχομένου της μυκηλιακής βιομάζας η οποία αποικίζει το υπόστρωμα, ενώ το δεύτερο, λόγω της αποδόμησης του μεγαλύτερου ποσοστού -πριν τον εμβολιασμό- μακρομορίων και την επακόλουθη συσσώρευση υδατανθράκων μικρότερου μοριακού βάρους στο παραγόμενο μυκήλιο (Zervakis et al., 2012, Ma et al., 2018).

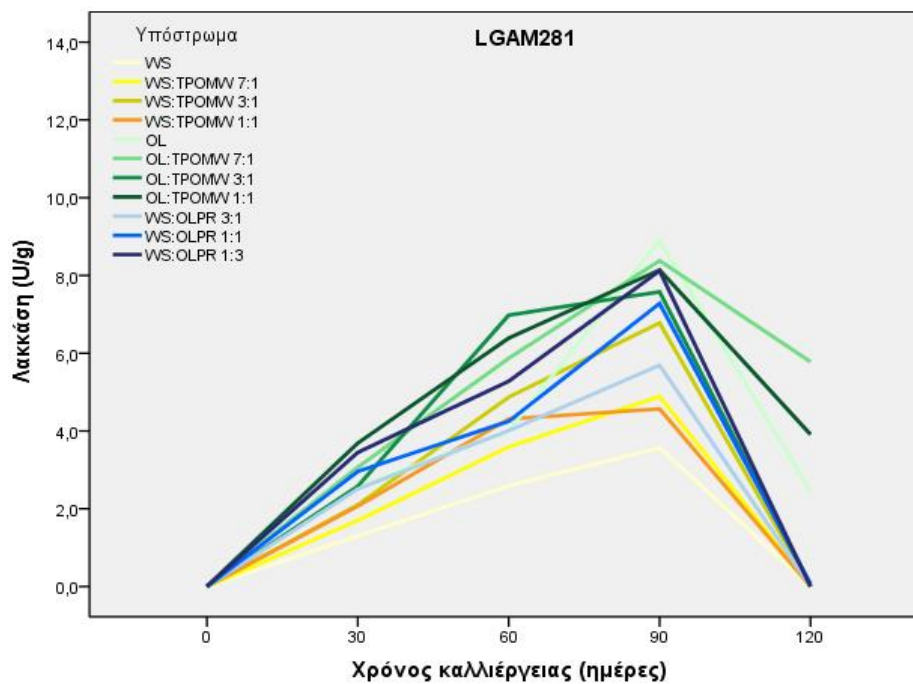
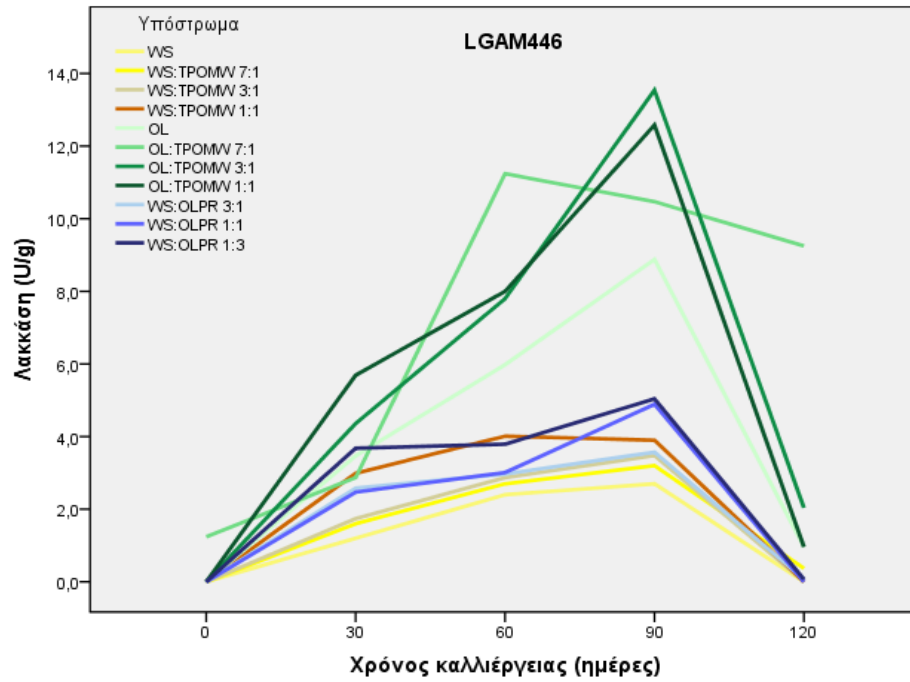
Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση τριών υποστρωμάτων αντιπροσωπευτικών των ακραίων τιμών βιολογικής αποδοτικότητας (OL:TPOMW 7:1 ως αυτό με τη μικρότερη, OL:TPOMW 1:1 ενδεικτικό της μέσης τιμής και WS:TPOMW 3:1 ως ένα από τα πιο

παραγωγικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν), ώστε να ανιχνευτούν διαφορές στην αποδόμηση συγκεκριμένων συστατικών που σχετίζονται με την υψηλή απόδοση σε μανιτάρια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η βιολογική αποδοτικότητα συσχετίστηκε σημαντικά με κορυφές που συνδέονται με αλειφατικές ενώσεις ( $2860\text{ cm}^{-1}$ ), ημικυτταρίνες ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ), αρωματικές ενώσεις ( $1604\text{ cm}^{-1}$ ), λιγνίνη ( $1508\text{ cm}^{-1}$ ) και κυτταρίνη ( $1156\text{ cm}^{-1}$ ). Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τα ευρήματα από τις κλασσικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, σύμφωνα με τα οποία η μείωση της λιγνίνης, της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών συνδέεται με την αύξηση της βιολογικής αποδοτικότητας.

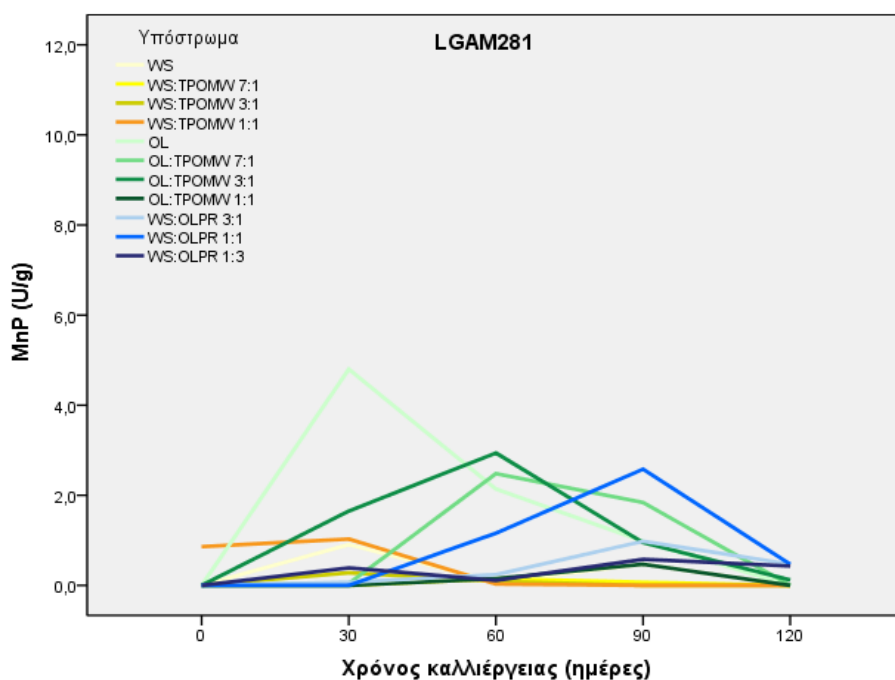
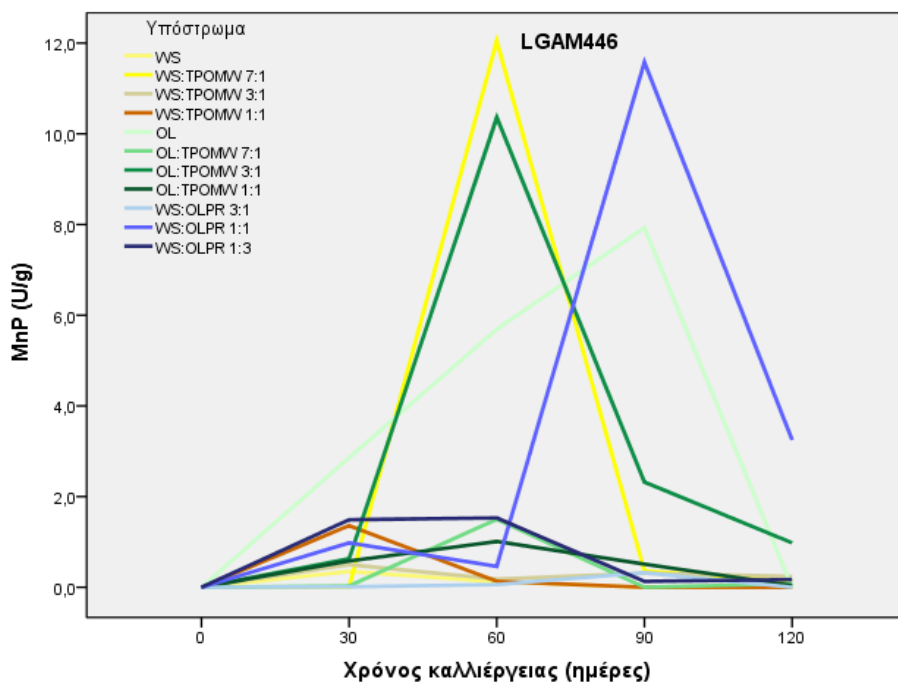
#### 2.4.3.6 Παραγωγή λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής διαδικασίας του *C. cylindracea*

Ειδικά όσον αφορά στα ένζυμα που σχετίζονται με την αποδόμηση της λιγνίνης, σχετικά χαμηλές τιμές ενεργότητας του ενζύμου λακκάση ανιχνεύτηκαν στα δύο στελέχη του *C. cylindracea* που μελετήθηκαν (έως  $13,5\text{ U g}^{-1}$  και  $8,9\text{ U g}^{-1}$  για τα LGAM446 και LGAM281 αντίστοιχα). Μεταξύ των δύο στελεχών που εξετάστηκαν, στο LGAM 446 μετρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας, μόνο όμως για τα υποστρώματα που περιείχαν φύλλα ελιάς (OL) ως βασικό υλικό. Ανάμεσα στα έντεκα διαφορετικά υποστρώματα, σημαντικά μεγαλύτερη παραγωγή μετρήθηκε σε αυτά που αποτελούνταν κατά βάση από φύλλα ελιάς, ενώ η προσθήκη ΤΡΟΜW τόσο στο άχυρο όσο και στα φύλλα ελιάς, συνέβαλε στην αύξηση της ενεργότητας και στα δύο στελέχη (Γράφημα 4.2.9). Αντίθετα η προσθήκη κλαδεμάτων ελιάς δεν διαφοροποίησε σημαντικά την παραγωγή της λακκάσης.

Τέλος, η μικρότερη παραγωγή του παραπάνω ενζύμου μετρήθηκε στο υπόστρωμα WS (μάρτυρας), όπου απουσίαζαν πλήρως τα ελαιοκομικά υπολείμματα. Στο παρελθόν έχει αποδειχθεί ότι η επαγωγή του εν λόγω ενζύμου αυξάνεται κατά πολύ από την παρουσία φαινολικών συστατικών όπως το φερουλικό οξύ και η βανιλίνη σε είδη του γένους *Pleurotus* (Giatti Marques De Souza et al., 2004). Όσον αφορά τη χρονική μεταβολή στην παραγωγή της λακκάσης, σημειώθηκε σταδιακή αύξηση μέχρι και την εννενηκοστή ημέρα σε όλα τα υποστρώματα (χρονική περίοδος που συμπίπτει με τον μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης της λιγνίνης), ενώ στη συνέχεια η ενεργότητα μειώθηκε απότομα ή και μηδενίστηκε (Γράφημα 4.2.9).



Γράφημα 2.4.9. Ενεργότητα ( $U\ l^{-1}$ ) του ενζύμου λακκάση (Lac) σε δύο στελέχη *C. cylindracea* αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).



Γράφημα 2.4.10. Ενεργότητα ( $U l^{-1}$ ) του ενζύμων υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) σε δύο στελέχη *C. cylindracea* αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

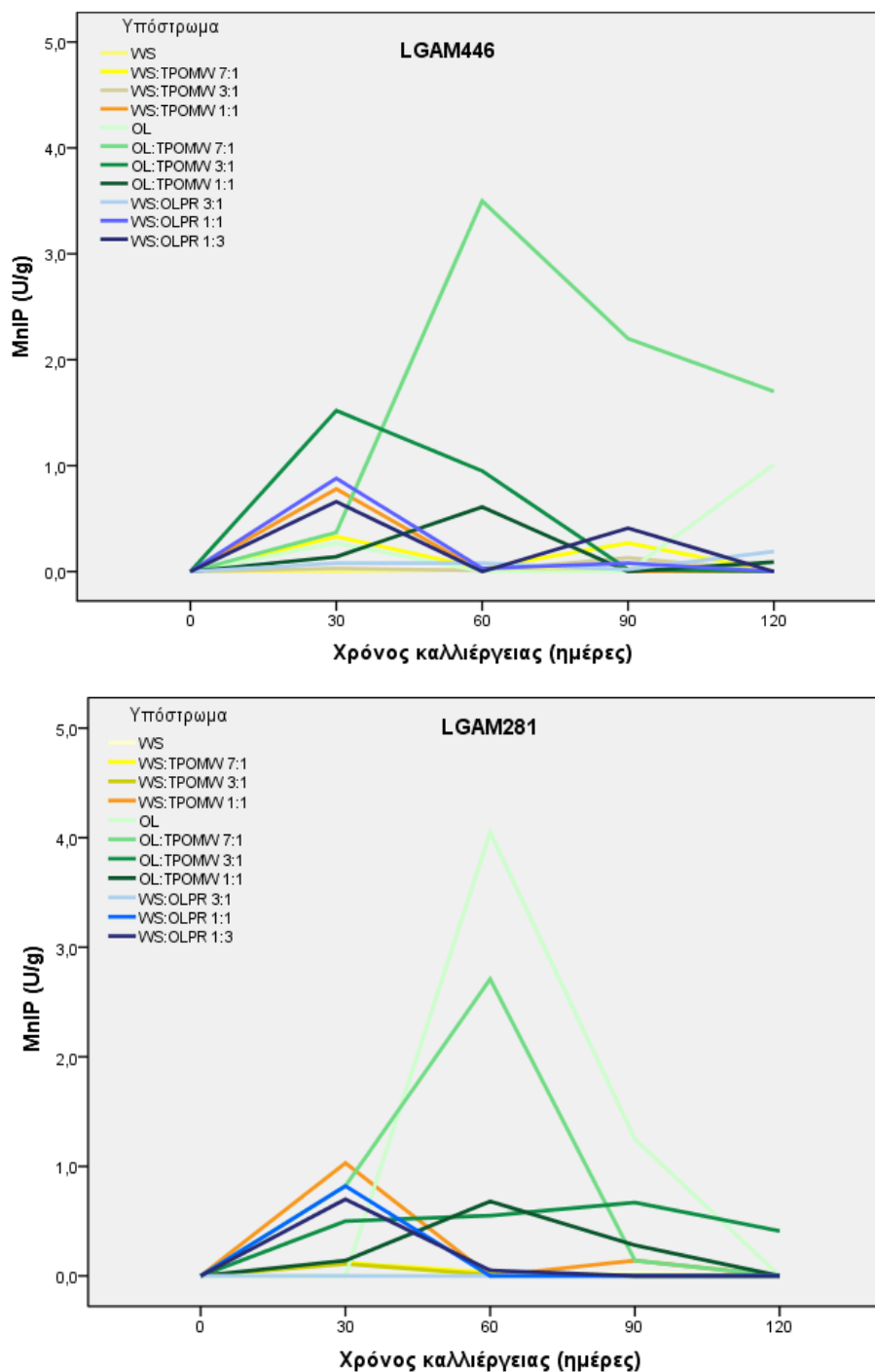
Αρκετά χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στην περίπτωση των υπεροξειδασών στα υπό μελέτη υποστρώματα (μέχρι και  $12 U g^{-1}$ ). Η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη παραγωγή στο στέλεχος LGAM446 (έως  $12 U g^{-1}$  στο υπόστρωμα WS:TPOMW 7:1) συγκριτικά με το LGAM 281 (έως  $4,8 U g^{-1}$  στο υπόστρωμα OL). Αξιοσημείωτη είναι και για τα δύο στελέχη, η χαμηλή τιμή της ενεργότητας της MnP στο



συμβατικό υποστρώμα (WS), (έως 0,35 και έως 1,46 για τα LGAM 446 και LGAM 281 αντίστοιχα), ενώ η αύξηση της παραγωγής δεν φαίνεται να σχετίζεται με την περιεκτικότητα κάποιου από τα υλικά του υποστρώματος (Γράφημα 2.4.10). Και στις δύο περιπτώσεις, φαίνεται ότι η μέγιστη ενεργότητα σημειώνεται κατά τη διάρκεια της παραγωγής του 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> κύματος μανιταριών (30-60 ημέρες). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση της λακκάσης, η αντικατάσταση του συμβατικού υλικού (WS) από φύλλα ελιάς (OL) οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας, ειδικά για το στέλεχος LGAM281. Από τα τρία μείγματα WS:OLPR που δοκιμάστηκαν, αυτό που φαίνεται να μεγιστοποιεί την παραγωγή του παραπάνω ενζύμου είναι το 1:1 και για τα δύο στελέχη (Γράφημα 2.4.10).

Αναφορικά με την υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (MnIP), οι τιμές της ενεργότητας δεν ξεπέρασαν το 1 U g<sup>-1</sup> για τα περισσότερα υποστρώματα (Γράφημα 2.4.11). Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσαν τα υποστρώματα στα οποία το άχυρο (WS) αντικαταστάθηκε από φύλλα ελιάς (OL), όπου η ενεργότητα έφτασε τα 3-4 U g<sup>-1</sup>. Μεταξύ των έντεκα διαφορετικών υποστρωμάτων δεν εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές μέχρι και την τριακοστή ημέρα της καλλιέργειας. Αντίθετα, από την εξηκοστή ημέρα έως και το τέλος του καλλιεργητικού κύκλου, ενώ η ενεργότητα μειώθηκε σημαντικά ή και μηδενίστηκε στα περισσότερα υποστρώματα, συνέχισε να αυξάνει σε αυτά που περιείχαν φύλλα ελιάς ως κύριο υλικό του υποστρώματος. Τέλος, η αύξηση του περιεχόμενου αποβλήτου (TPOMW) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 12,5%, οδήγησε στην σημαντική μείωση της παραγωγής MnIP και στα δύο στελέχη.

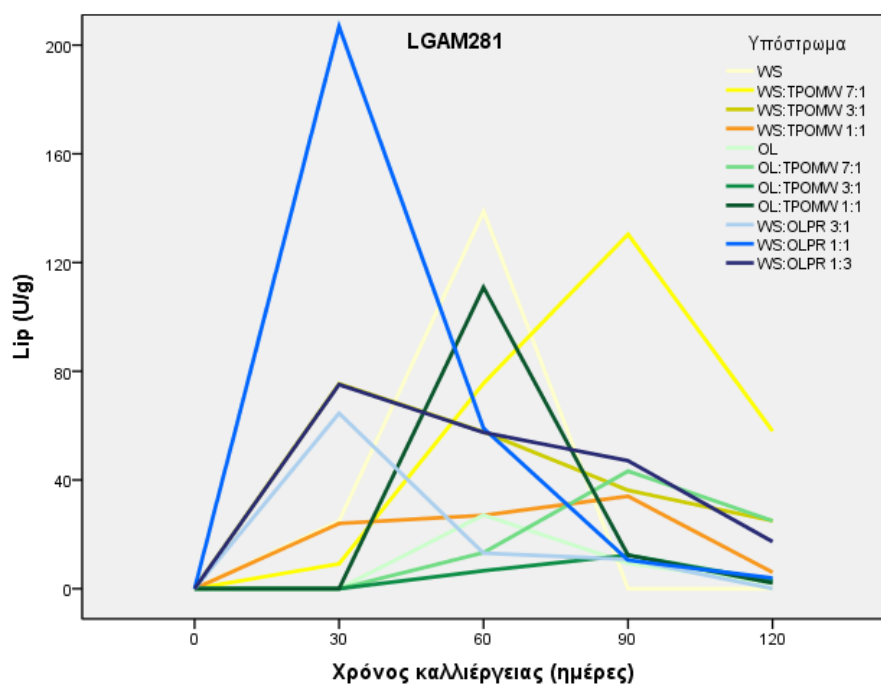
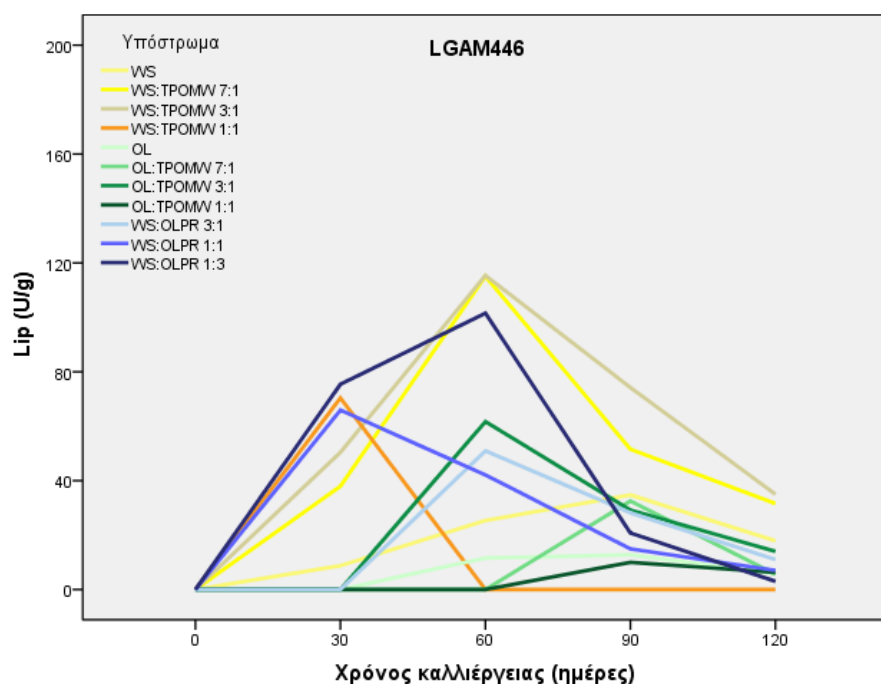
Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι σε καλλιέργειες του ίδιου είδους (*C. cylindracea* LGAM 341, Ntougias et al., 2015) σε θρεπτικό διάλυμα που περιείχε 25% υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου, έγινε δυνατός ο προσδιορισμός της λακκάσης, αλλά όχι των άλλων δύο ενζύμων που μελετήθηκαν (MnP και MnIP). Το γεγονός αυτό, μπορεί να οφείλεται ή στο διαφορετικό στέλεχος που εξετάστηκε είτε στην διαφορετική φύση του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε στα δύο πειράματα.



**Γράφημα 2.4.11.** Ενεργότητα ( $U\ l^{-1}$ ) του ενζύμων υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (MnIP) σε δύο στελέχη *C. cylindracea* αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

Από τα ένζυμα για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την αποδόμηση της λιγνίνης και των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος, η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας στην παρούσα εργασία. Πιο συγκεκριμένα

οι μέγιστες τιμές καταγράφηκαν στα υποστρώματα WS:TPOMW 7:1 και 3:1 για το στέλεχος LGAM446 (115 U g<sup>-1</sup>) και στο WS:OLPR 1:1 για το LGAM281 (207 U g<sup>-1</sup>).



Γράφημα 2.4.12. Ενεργότητα (U l<sup>-1</sup>) του ενζύμων υπεροξειδάση της λιγνίνης (Lip) σε δύο στελέχη *C. cylindracea* αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

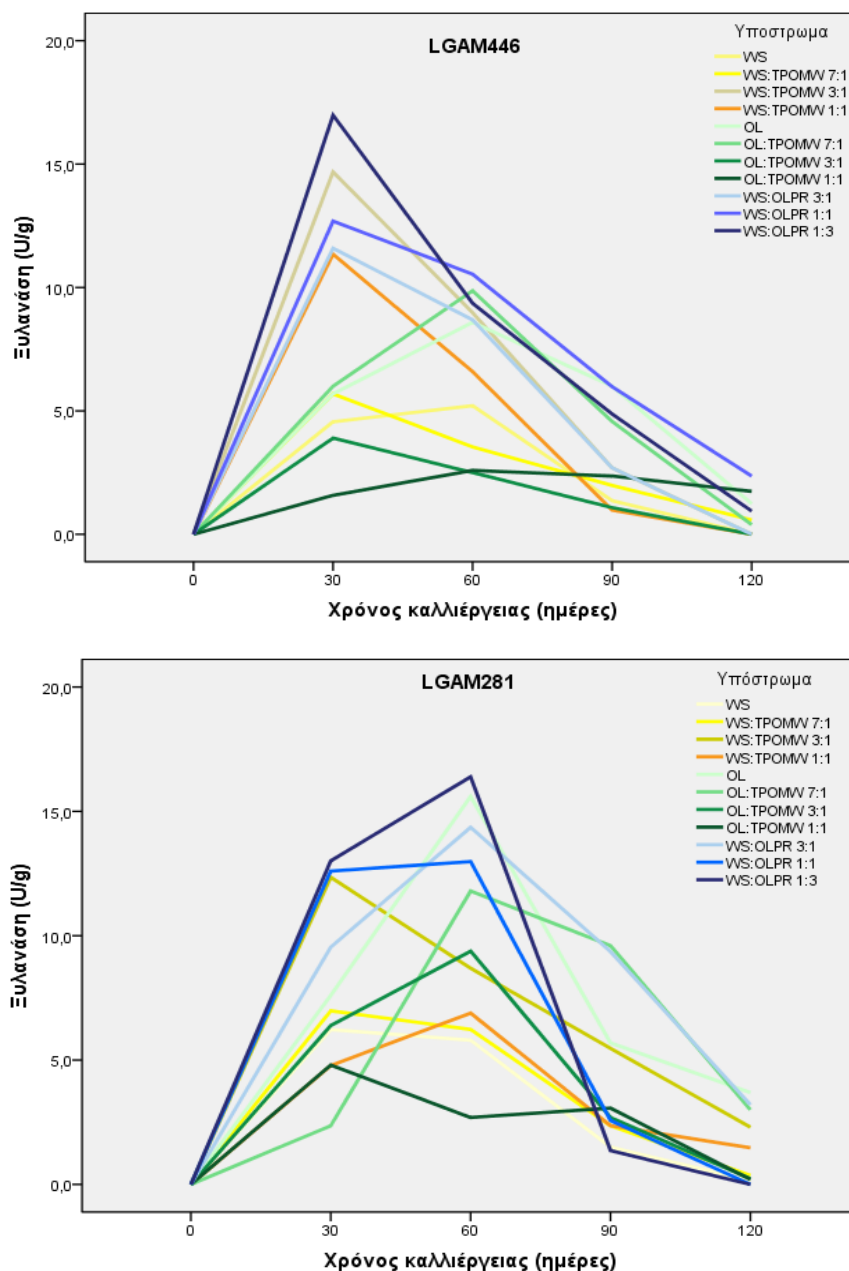
Σε αντίθεση με την συμπεριφορά των ενζύμων που περιεγράφηκαν προηγουμένως, η Lip παρουσίασε μικρότερες τιμές στα υποστρώματα που το βασικό υλικό αποτελούσαν τα

φύλλα ελιάς. Η προσθήκη όμως ΤΡΟΜΩ συνέβαλε στην αύξηση της παραγωγής της τόσο όταν βασικό υλικό ήταν το άχυρο (WS) όσο και στην περίπτωση των φύλλων (OL), ενώ το ίδιο συνέβη και με την αντικατάσταση μέρους του συμβατικού υποστρώματος από κλαδέματα ελιάς (Γράφημα 2.4.12). Αναφορικά με τη χρονική διακύμανση της παραγωγής της LiP, φαίνεται να ταυτίζεται με τη συμπεριφορά των MnP και MnIP, δηλαδή η μέγιστη παραγωγή παρατηρείται μεταξύ 30 και 60 ημερών από τον εμβολιασμό και έπειτα μειώνεται σημαντικά η ενεργότητα της (Γράφημα 2.4.12).

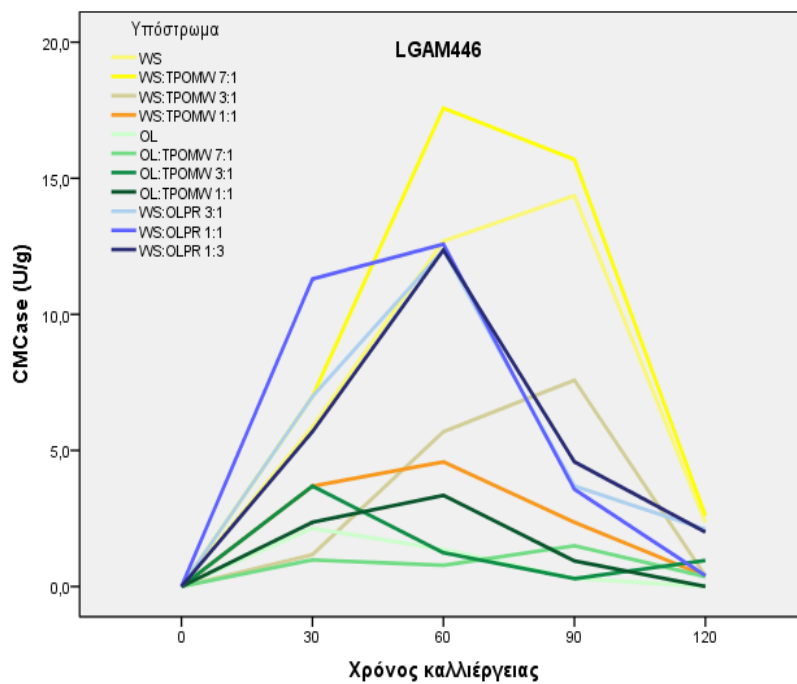
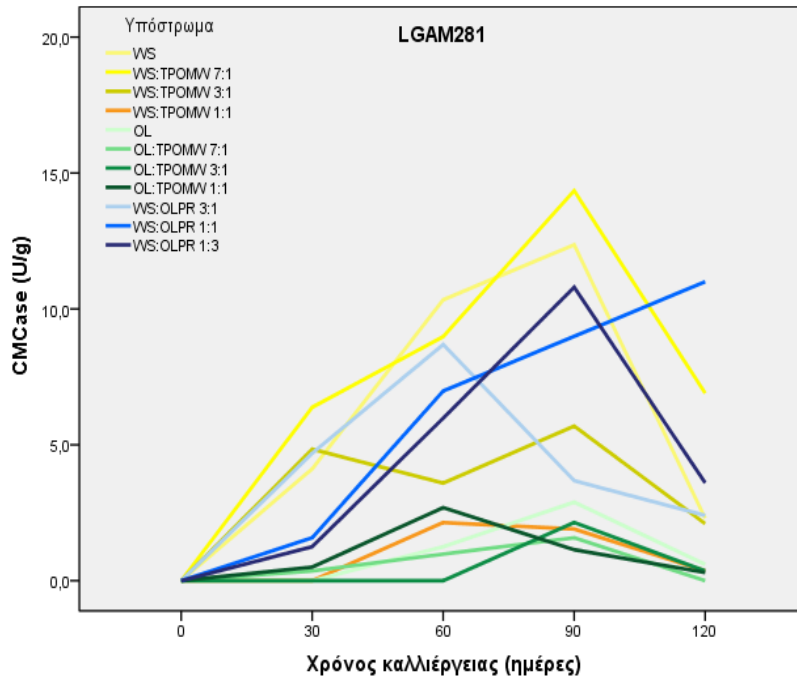
Από τα τέσσερα ένζυμα που περιγράφηκαν παραπάνω μόνο η λακκάση επέδειξε σημαντική συσχέτιση με τη μείωση της λιγνίνης ( $r = 0,82$  και  $r = 0,74$ ,  $p < 0,05$ , για τα δύο στελέχη αντίστοιχα). Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επαγωγή του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης καταγράφεται για πρώτη φορά στο είδος *C. cylindracea*. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την -έστω και μικρή- ενεργότητα της λακκάσης και των υπόλοιπων υπεροξειδασών κατατάσσουν το είδος *C. cylindracea* στην κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψης. Αντίθετα έχει αναφερθεί η επαγωγή τόσο της λακάσης (με παρόμοιες τιμές ενεργότητας) όσο και των MnP και MnIP (με τιμές  $< 1 \text{ U g}^{-1}$ ) σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης αλλά και σε υγρά θρεπτικά διαλύματα (Aranda et al., 2009, Isikhuemhen et al., 2009, Wang et al., 2000). Μεταξύ αυτών, σε υποστρώματα που αποτελούνταν από μείγματα αχύρου και χωνεμένης κοπριάς πουλερικών, αποδείχθηκε ότι η αύξηση του αζώτου στο υπόστρωμα οδηγεί σε μεγιστοποίηση της ενεργότητας της λακκάσης (Isikhuemhen et al., 2009). Το παραπάνω, σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα των φύλλων ελιάς σε φαινολικά συστατικά συγκριτικά με το άχυρο, μπορούν να εξηγήσουν σε μεγάλο βαθμό τις παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στην ενεργότητα της λακκάσης στο παρόν πείραμα.

Η αυξημένη περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε ημικυτταρίνες (Πίνακας 2.4.2) οδήγησε σε υψηλή παραγωγή του ενζύμου ξυλανάση. Η μέγιστη ενεργότητα σημειώθηκε κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του μύκητα (μέγιστη τιμή στις 30 ημέρες για τα περισσότερα υποστρώματα στο LGAM446 και στις 30 ή τις 60 για το LGAM 281) ακολουθώντας στη συνέχεια φθίνουσα πορεία μέχρι την παύση της παραγωγής προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Μεταξύ των έντεκα υποστρωμάτων, οι μέγιστες τιμές ενεργότητας καταγράφηκαν στα μείγματα WS:OLPR τα οποία περιείχαν και το μεγαλύτερο ποσοστό ημικυτταρινών (Πίνακας 2.4.2, Γράφημα 2.4.13). Η ενεργότητα της ξυλανάσης συνάδει χρονικά με τον ρυθμό μείωσης των ημικυτταρινών στα έντεκα υποστρώματα εμφανίζοντας υψηλούς συντελεστές συσχέτισης για τα δύο στελέχη ( $r = 0,89$   $p < 0,01$  και  $r = 0,81$ ,  $p < 0,05$ ). Η παραπάνω παρατήρηση αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο ένζυμο είναι

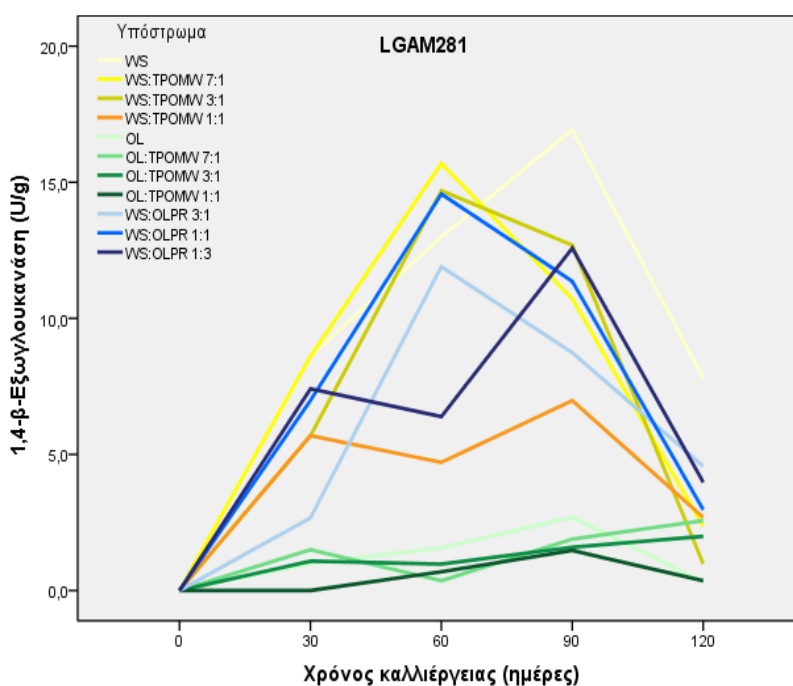
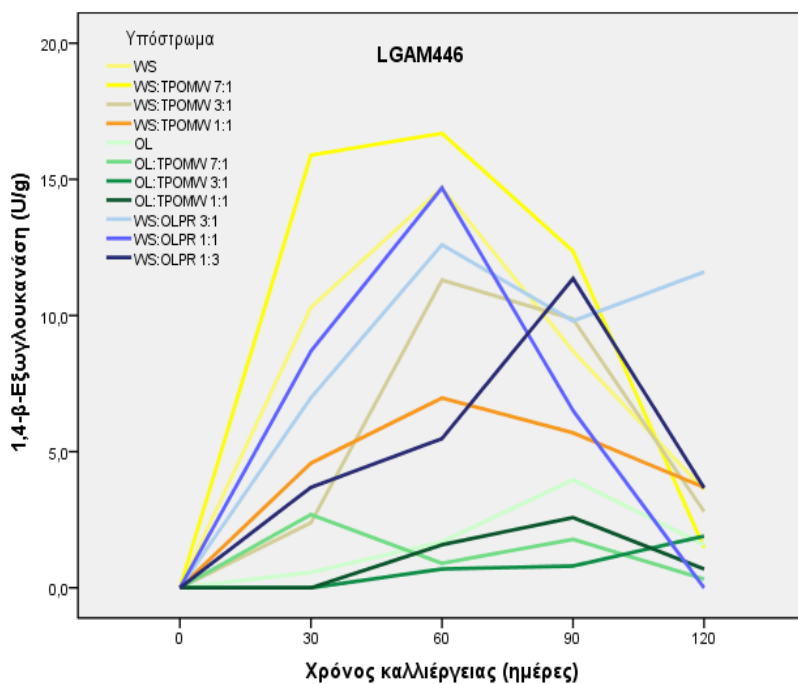
κυρίως υπεύθυνο για την αποδόμηση των ημικυτταρινών από τον μύκητα *C. cylindracea*. Σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, οι Isikhuemhen et al. (2009), κατέγραψαν αύξηση της ενεργότητας του εν λόγω ενζύμου μετά την συλλογή των καρποφοριών του *C. cylindracea*. Παρόμοια συμπεριφορά με την παρούσα εργασία, εμφανίστηκε κατά την καλλιέργεια του *Hypsizygus marmoreus*, όπου σημαντική αύξηση της ενεργότητας της ξυλανάσης καταγράφηκε κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των καρποφοριών του (Tereshita et al., 1998).



Γράφημα 2.4.13. Ενεργότητα του ενζύμου ξυλανάση κατά την ανάπτυξη δύο στελεχών *C. cylindracea* σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).



Γράφημα 2.4.14. Ενεργότητα του ενζύμου κυτταρινάση (CMCase) κατά την ανάπτυξη δύο στελεχών *C. cylindracea* σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).



**Γράφημα 2.4.15.** Ενεργότητα του ενζύμου 1,4-β-εξωγλουκανάση κατά την ανάπτυξη δύο στελεχών *C. cylindracea* σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

Τέλος, παρόμοια συμπεριφορά μεταξύ τους εμφάνισαν τα δύο ένζυμα που σχετίζονται με την αποδόμηση της κυτταρίνης (Γράφημα 2.4.14 και 2.4.15), δηλαδή η CMCase και η 1,4-β-εξωγλουκανάση. Και στα δύο στελέχη, σημαντικά μειωμένη ενεργότητα μετρήθηκε στα υποστρώματα που αποτελούνταν από OL με ή χωρίς την προσθήκη TPOMW, για τα οποία είχε προσδιοριστεί και η μικρότερη ποσοστιαία μείωση της κυτταρίνης στο

εξαντλημένο υπόστρωμα (Πίνακας 2.4.2). Αντίθετα η μεγαλύτερη παραγωγή υπολογίστηκε στο μάρτυρα (WS) και στο υπόστρωμα WS:TPOMW 7:1 (Γράφημα 2.4.14 και 2.4.15). Γενικά η προσθήκη TPOMW στο άχυρο οδήγησε στην μείωση της παραγωγής των κυτταρινολυτικών ενζύμων, ενώ το αντίθετο αποτέλεσμα είχε η προσθήκη κλαδεμάτων ελιάς και για τα δύο στελέχη.

Η παραπάνω διαπίστωση μπορεί να εξηγηθεί μέσω της χαμηλής περιεκτικότητας των αποβλήτων σε κυτταρίνη και αντίθετα της υψηλής περιεκτικότητας των κλαδεμάτων σε σχέση με το άχυρο (Πίνακας 2.4.2). Στο στέλεχος LGAM281 η μέγιστη παραγωγή της CMCase εμφανίστηκε πιο όψιμα από ότι στο LGAM446 (Γράφημα 2.4.15). Όσον αφορά την 1,4-β-εξωγλουκανάση, το μέγιστο της παραγωγής παρατηρήθηκε στις 60 ημέρες και για τα δύο στελέχη. Γενικά, τα δύο προαναφερθέντα ένζυμα (CMCase και 1,4-β-εξωγλουκανάση) φαίνεται να παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες μετά την συλλογή του 1ου κύματος μανιταριών. Σε προγενέστερη εργασία αναφέρθηκαν παρόμοιες τιμές ενεργότητας των δύο ενζύμων σε υποστρώματα με πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα σε άζωτο, αλλά οι μέγιστες τιμές της CMCase σημειώθηκαν στο αρχικό στάδιο της καλλιέργειας πριν την εμφάνιση των καρποφοριών (Isikhuemhen et al., 2009).

#### 2.4.3.7 Προσδιορισμός καλλιεργητικών παραμέτρων επιλεγμένων στελεχών του μύκητα *C. cylindracea* ανεπτυγμένων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιουργίας και ελαιοκομίας

Το συμβατικό υπόστρωμα (WS) καθώς και αυτά που περιείχαν απόβλητο σε αναλογία μέχρι και 25% ήταν αυτά που επώαστηκαν γρηγορότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα (36-42 ημέρες). Επιπλέον, η αντικατάσταση του άχυρου από φύλλα ελιάς επιμήκυνε τη διάρκεια επώασης κατά 13-33 ημέρες. Αντίθετα η προσθήκη υπολειμμάτων κλαδέματος είχε μικρότερη επίπτωση στο χρόνο που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της επώασης (44-52 ημέρες). Όσον αφορά την εμφάνιση των καρποφοριών απαιτήθηκαν επιπλέον 3-4 ημέρες στο συμβατικό υπόστρωμα και 3-10 ημέρες στα μείγματα WS:TPOMW. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των υποστρωμάτων που περιείχαν μέχρι και 25% TPOMW. Αντίθετα όταν το βασικό υλικό αντικαταστάθηκε από φύλλα ελιάς (OL) χρειάστηκαν 12 έως 31 ημέρες επιπλέον από την ολοκλήρωση της επώασης έως την εμφάνιση των καρποφοριών, ενώ ενδιάμεσες τιμές υπολογίστηκαν για τα μείγματα WS:OLPR (50 – 71 ημέρες από τον εμβολιασμό). Η συγκέντρωση των φαινολικών στα φύλλα και το TPOMW καθώς και αύξηση της περιεκτικό-

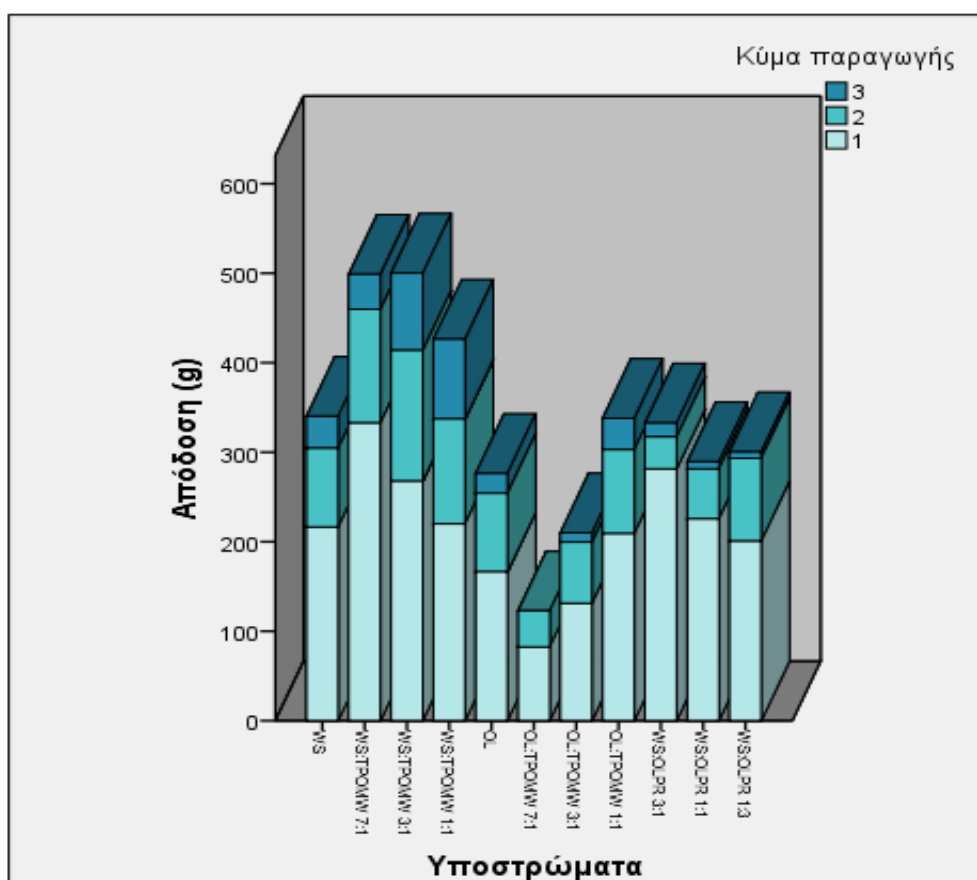


**Πίνακας 2.4.4. Καλλιεργητικοί παράμετροι δυο στελεχών του *C. cylindracea* (LGAM446 και LGAM281) κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα άχρτου (WS), αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλων ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσω όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Υποστρώματα	Στέλεχος	Επώαση (ημέρες)	Πρωιμότητα (ημέρες)	Συνολική καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	Απόδοση 1 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 2 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Απόδοση 3 <sup>ου</sup> κύματος (g)	Συνολική Απόδοση (g)	BA %	Παραγωγικότητα
WS	446	36,8 $\pm$ 0,5 <sup>e</sup>	39.3 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	88.3 $\pm$ 4.6 <sup>ab</sup>	216.3 $\pm$ 29 <sup>abc</sup>	88.2 $\pm$ 19.0 <sup>a</sup>	35.8 $\pm$ 12.8 <sup>abc</sup>	340.3 $\pm$ 44.7 <sup>ab</sup>	109.7 $\pm$ 14.4 <sup>ab</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>
	281	36.3 $\pm$ 0.6 <sup>e</sup>	40.0 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	89.0 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	198.6 $\pm$ 78.2 <sup>ab</sup>	123.3 $\pm$ 16.0 <sup>a</sup>	45.2 $\pm$ 13,2 <sup>a</sup>	367,0 $\pm$ 61,8 <sup>a</sup>	118.3 $\pm$ 19.9 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
WS:TPOMW 7:1	446	41,7 $\pm$ 0,6 <sup>de</sup>	46.7 $\pm$ 1.2 <sup>cd</sup>	81.5 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	333.4 $\pm$ 116 <sup>a</sup>	126.9 $\pm$ 74.8 <sup>a</sup>	39.2 $\pm$ 21.3 <sup>abc</sup>	499.0 $\pm$ 172.1 <sup>a</sup>	166.5 $\pm$ 57.4 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
	281	38.0 $\pm$ 1.7 <sup>e</sup>	45.0 $\pm$ 7.2 <sup>c</sup>	99.7 $\pm$ 13.2 <sup>a</sup>	171.9 $\pm$ 13.4 <sup>ab</sup>	69.4 $\pm$ 19.0 <sup>abc</sup>	49.9 $\pm$ 28,5 <sup>a</sup>	291,1 $\pm$ 70,0 <sup>abc</sup>	97.2 $\pm$ 23.4 <sup>ab</sup>	1.0 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
WS:TPOMW 3:1	446	36,7 $\pm$ 0,6 <sup>e</sup>	39.3 $\pm$ 2.5 <sup>d</sup>	82.7 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	268.0 $\pm$ 103 <sup>abc</sup>	145.8 $\pm$ 57.6 <sup>a</sup>	86.4 $\pm$ 42.0 <sup>ab</sup>	500.2 $\pm$ 35.2 <sup>a</sup>	167.0 $\pm$ 11.8 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	281	38.3 $\pm$ 2.2 <sup>e</sup>	41.8 $\pm$ 3.1 <sup>c</sup>	94.8 $\pm$ 11.1 <sup>a</sup>	221.1 $\pm$ 81.3 <sup>ab</sup>	81.2 $\pm$ 30.2 <sup>ab</sup>	26.1 $\pm$ 18,1 <sup>ab</sup>	328,5 $\pm$ 117,2 <sup>ab</sup>	109.7 $\pm$ 39.1 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
WS:TPOMW 1:1	446	42,5 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>	52.7 $\pm$ 2.1 <sup>bc</sup>	93.8 $\pm$ 6.4 <sup>ab</sup>	219.8 $\pm$ 85 <sup>abc</sup>	117.1 $\pm$ 47.0 <sup>a</sup>	89.1 $\pm$ 37.4 <sup>a</sup>	404.0 $\pm$ 164.5 <sup>a</sup>	154.3 $\pm$ 23.1 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
	281	43.0 $\pm$ 0.0 <sup>de</sup>	50.0 $\pm$ 2.4 <sup>bc</sup>	96.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	262.2 $\pm$ 44.1 <sup>a</sup>	117.3 $\pm$ 29.8 <sup>a</sup>	33.6 $\pm$ 11,4 <sup>ab</sup>	413,1 $\pm$ 58,2 <sup>a</sup>	125.2 $\pm$ 17.6 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
OL	446	50,8 $\pm$ 6,0 <sup>ab</sup>	67.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	98.3 $\pm$ 7.1 <sup>ab</sup>	165.9 $\pm$ 106 <sup>abc</sup>	88.3 $\pm$ 64.3 <sup>a</sup>	22.3 $\pm$ 14.6 <sup>abc</sup>	276.4 $\pm$ 110.3 <sup>ab</sup>	42.0 $\pm$ 4.5 <sup>c</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>
	281	54.5 $\pm$ 0.5 <sup>bcd</sup>	85.5 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	108.5 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	80.1 $\pm$ 53.4 <sup>b</sup>	19.2 $\pm$ 22.1 <sup>bc</sup>	-	99,2 $\pm$ 73,8 <sup>cd</sup>	25.4 $\pm$ 18.9 <sup>c</sup>	0.2 $\pm$ 0.2 <sup>cd</sup>
OL:TPOMW 7:1	446	55,3 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	67.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	97.7 $\pm$ 20.6 <sup>ab</sup>	82.1 $\pm$ 11 <sup>c</sup>	41.3 $\pm$ 41.1 <sup>a</sup>	-	109.3 $\pm$ 28.8 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>	0.3 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>
	281	58.0 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	86.0 $\pm$ 19.7 <sup>a</sup>	108.0 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	64.2 $\pm$ 22.8 <sup>b</sup>	15.9 $\pm$ 22.5 <sup>bc</sup>	-	80,1 $\pm$ 45,2 <sup>cd</sup>	20.5 $\pm$ 11.6 <sup>c</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
OL:TPOMW 3:1	446	52,0 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	67.0 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	103.0 $\pm$ 13.1 <sup>ab</sup>	131.4 $\pm$ 50 <sup>bc</sup>	89.4 $\pm$ 20.2 <sup>a</sup>	10.3 $\pm$ 8.6 <sup>c</sup>	209.9 $\pm$ 66.5 <sup>ab</sup>	48.9 $\pm$ 15.5 <sup>c</sup>	0.5 $\pm$ 0.2 <sup>de</sup>
	281	56.0 $\pm$ 1.0 <sup>bc</sup>	78.7 $\pm$ 1.10 <sup>ab</sup>	103.0 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	73.8 $\pm$ 31.7 <sup>b</sup>	64.2 $\pm$ 17.7 <sup>abc</sup>	-	137,9 $\pm$ 30,1 <sup>bcd</sup>	32.1 $\pm$ 7.0 <sup>bc</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>bcd</sup>
OL:TPOMW 1:1	446	49,0 $\pm$ 0,0 <sup>bc</sup>	63.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	112.5 $\pm$ 11.0 <sup>a</sup>	208.7 $\pm$ 43 <sup>abc</sup>	93.6 $\pm$ 25.7 <sup>a</sup>	35.0 $\pm$ 15.8 <sup>abc</sup>	338.0 $\pm$ 73.0 <sup>ab</sup>	80.4 $\pm$ 17.4 <sup>bc</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>cde</sup>
	281	68.7 $\pm$ 11.8 <sup>a</sup>	86.3 $\pm$ 14.2 <sup>a</sup>	110.3 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	61.8 $\pm$ 37.0 <sup>b</sup>	12.1 $\pm$ 11.0 <sup>c</sup>	-	73,9 $\pm$ 53,6 <sup>dl</sup>	17.6 $\pm$ 12.7 <sup>c</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
WS:OLPR 3:1	446	44,0 $\pm$ 1,2 <sup>cd</sup>	49.5 $\pm$ 3.1 <sup>c</sup>	105.3 $\pm$ 2.9 <sup>ab</sup>	280.9 $\pm$ 53 <sup>ab</sup>	35.7 $\pm$ 9.0 <sup>a</sup>	15.4 $\pm$ 9.2 <sup>bc</sup>	332.5 $\pm$ 62.3 <sup>ab</sup>	124.9 $\pm$ 4.0 <sup>ab</sup>	1.2 $\pm$ 0.0 <sup>bcd</sup>
	281	48.0 $\pm$ 6.1 <sup>cde</sup>	58.7 $\pm$ 5.0 <sup>abc</sup>	102.3 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	169.3 $\pm$ 58.0 <sup>ab</sup>	88.3 $\pm$ 29.6 <sup>a</sup>	28.2 $\pm$ 7,5 <sup>ab</sup>	285,8 $\pm$ 87,4 <sup>abc</sup>	98.2 $\pm$ 30.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.3 <sup>abc</sup>
WS:OLPR 1:1	446	45,0 $\pm$ 1,0 <sup>cd</sup>	59.0 $\pm$ 7.6 <sup>ab</sup>	99.3 $\pm$ 7.5 <sup>ab</sup>	226.0 $\pm$ 13 <sup>abc</sup>	56.1 $\pm$ 21.6 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 6.9 <sup>c</sup>	289.5 $\pm$ 4.6 <sup>ab</sup>	72.3 $\pm$ 1.1 <sup>bc</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>dec</sup>

WS:OLPR 1:3	281	45.0±0.0 <sup>cd</sup>	57.3±2.5 <sup>abc</sup>	102.0±19.5 <sup>a</sup>	198.6±73.7 <sup>ab</sup>	56.6±22.2 <sup>abc</sup>	4.0±3.2 <sup>b</sup>	259,3±85,3 <sup>abc</sup>	64.7±21.3 <sup>abc</sup>	0.7±0.3 <sup>abc</sup>
	446	49,3±0,5 <sup>bc</sup>	65.8±1.9 <sup>a</sup>	99.5±9.7 <sup>ab</sup>	201.0±41 <sup>abc</sup>	93.2±23.8 <sup>a</sup>	7.0±4.2 <sup>c</sup>	300.4±39.8 <sup>ab</sup>	69.8±6.9 <sup>bc</sup>	0.7±0.4 <sup>cd</sup>
	281	52.0±2.5 <sup>bcd</sup>	70.5±12.3 <sup>abc</sup>	102.3±5.7 <sup>a</sup>	116.6±47.0 <sup>ab</sup>	12.5±12.3 <sup>c</sup>	1.0±0,0 <sup>b</sup>	129,8±59,4 <sup>bcd</sup>	30.2±13.8 <sup>c</sup>	0.3±0.1 <sup>bcd</sup>

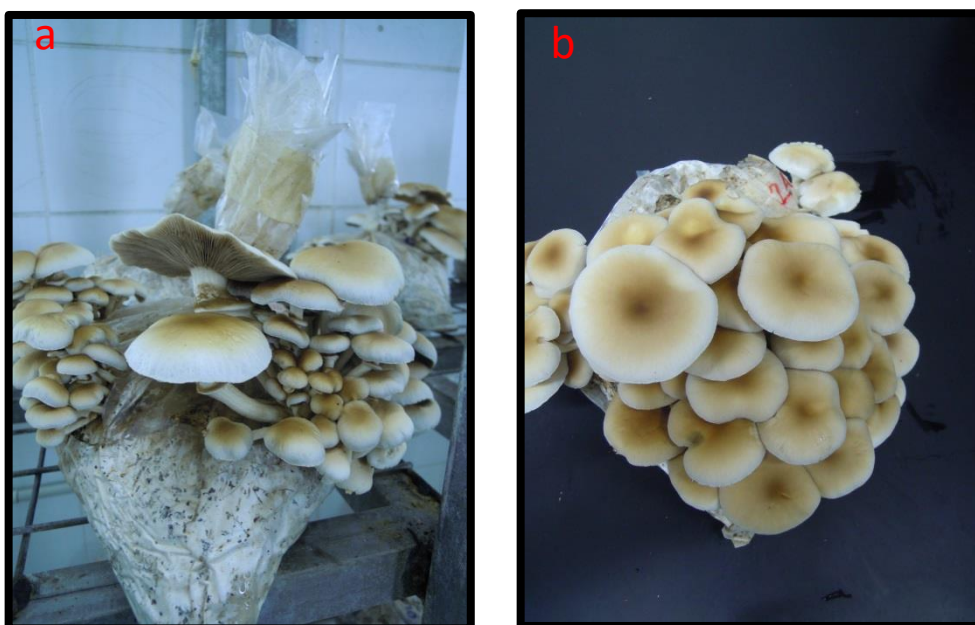
τητας σε λιγνίνη φαίνεται ότι επηρέασαν αρνητικά το χρόνο που απαιτείται για τα επιμέρους στάδια της καλλιέργειας ( $r = 0,694 - 0,858, p < 0,01$ ). Παρόμοια αύξηση έχει αναφερθεί στο παρελθόν τόσο σε είδη *Pleurotus* όσο και στο *C. cylindracea* αυξανόμενης της ποσότητας του ΤΡΟΜΩ στο υπόστρωμα (Zervakis et al., 2013). Ωστόσο, η εν λόγω αύξηση φαίνεται να μετριάζεται όταν χρησιμοποιείτε κομποστοποιημένο ΤΡΟΜΩ αντί του μη επεξεργασμένου (Zervakis et al., 2013). Αντίστοιχα μεγάλη αύξηση στην πρωιμότητα είχε προκληθεί σε υπόστρωμα αποτελούμενο από πυρηνόξυλο που μελετήθηκε συγκριτικά με διάφορα άλλα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα στο Κεφάλαιο 2.2. Η συνολική καλλιεργητική περίοδος (από τον εμβολιασμό μέχρι και την συλλογή του 3<sup>ου</sup> κύματος παραγωγής) διήρκησε 82-100 ημέρες στα υποστρώματα που περιείχαν ΤΡΟΜΩ χωρίς να διαφέρουν σημαντικά από τον μάρτυρα (88-89 ημέρες). Η μέγιστη επιμήκυνση του συνολικού κύκλου, καταγράφηκε και πάλι στα υποστρώματα που περιείχαν φύλλα ελιάς. Αξίζει να αναφερθεί όμως, ότι παρόλο που δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των περισσότερων υποστρωμάτων, η καλλιεργητική περίοδος στα υπολείμματα ελαιουργίας είναι αισθητά μεγαλύτερη από όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα που εξετάστηκαν (70 – 79 ημέρες).



Γράφημα 2.4.16. Απόδοση (g) ανά κύμα παραγωγής του *C. cylindracea* (LGAM 446), ανεπτυγμένου σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα άχυρου (WS), αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων (ΤΡΟΜΩ), φύλλων ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

Η συνολική απόδοση κυμάνθηκε από 109 έως 500 g και από 74 έως 413 g στα στελέχη LGAM 446 και LGAM281 αντίστοιχα. Στην περίπτωση του πρώτου παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στην απόδοση όταν προστίθεται απόβλητο στο βασικό υπόστρωμα (άχυρο ή φύλλα ελιάς, Γράφημα 2.4.16), αντίθετα με το δεύτερο το οποίο επηρεάζεται αρνητικά (Πίνακας 2.4.4). Η κατανομή της απόδοσης μεταξύ των τριών κυμάτων παραγωγής ήταν αυτή που συνήθως παρατηρείται στην καλλιέργεια του συγκεκριμένου είδους, δηλαδή το 50-70% της παραγωγής προήλθε από το πρώτο κύμα και λιγότερο από 15% από το τελευταίο (Γράφημα 2.4.16).

Παρόμοια αύξηση σημειώθηκε και στις τιμές της βιολογικής αποδοτικότητας, οι οποίες μάλιστα είναι από τις υψηλότερες που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία για το είδος *C. cylindracea* (Isikhuemhen et al., 2009, Uhart et al., 2008, Zervakis et al., 2013). Στο πρώτο από τα δύο στελέχη, η αύξηση προσέγγισε το 57% όταν προστέθηκε απόβλητο (TPOMW) στο βασικό υλικό (άχυρο, WS), ενώ στο δεύτερο κυμάνθηκε σε παρόμοια με το μάρτυρα επίπεδα. Η μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ των συστατικών του υποστρώματος και της βιολογικής αποδοτικότητας απέδειξε ότι η τελευταία συνδέεται σημαντικά με την περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη ( $r = 0,808 - 0,886, p < 0,01$ ) και κυτταρίνη ( $r = 0,771 - 0,798, p < 0,01$ ), ενώ αρνητικά συσχετίστηκε με την περιεκτικότητα σε λιγνίνη ( $r = 0,551 - 0,772, p < 0,05$ ). Οι τιμές της βιολογικής αποδοτικότητας είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από αυτές που



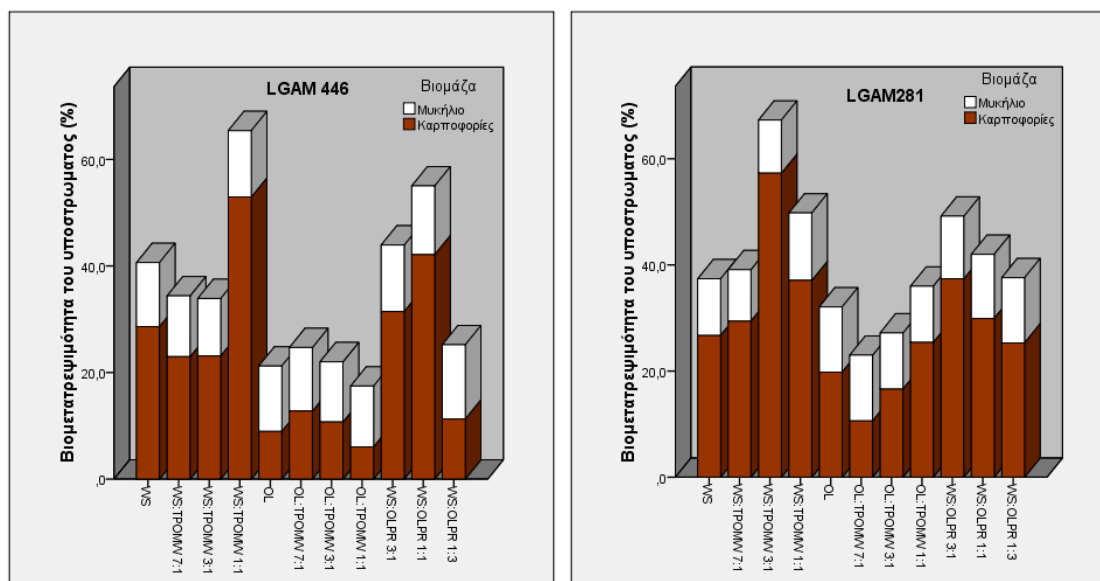
Εικόνα 2.4.3. Καρποφορίες σε πλήρη ανάπτυξη του στελέχους *C. cylindracea* LGAM281 σε υπόστρωμα WS:OLPR 1:3 (a) και του *C. cylindracea* LGAM281 σε υπόστρωμα WS:TPOMW 1:1 (b).

καταγράφηκαν στα εννέα διαφορετικά λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα με τα οποία εξετάστηκαν στο Κεφάλαιο 2.2. Πολύ υψηλές τιμές, έχουν αναφερθεί στο παρελθόν με την προσθήκη σε άχυρο πλούσιων σε άζωτο υλικών, όπως το κομποστοποιημένο TPOMW (μέχρι και 124%, Zervakis et al., 2013), το αλεύρι σόγιας (έως και 179%, Uhart et al., 2008) ή η κοπριά πουλερικών (έως και 106%, Isikhuemhen et al., 2009). Όσον αφορά τις τιμές της παραγωγικότητας, επιβεβαιώνεται η βελτιωμένη απόδοση των υποστρώματων που εμπλουτίστηκαν με TPOMW για το στέλεχος LGAM446. Επιπλέον αποδεικνύεται ότι τα δύο στελέχη έχουν διαφορετική ανταπόκριση στη μεταβολή της σύστασης του υποστρώματος μέσω της προσθήκης διαφόρων παραπροϊόντων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ανθεκτικότητα που εμφανίζει το καθένα στις υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ενώσεων (π.χ. φαινολικών) που περιέχονται στα απόβλητα ή/και στον εμπλουτισμό τους με στοιχεία όπως το άζωτο και το κάλιο. Τέλος, παρατηρώντας τις τιμές της παραγωγικότητας σε όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα εκτός των μειγμάτων WS:TPOMW, γίνεται αντιληπτό ότι μόνο το μείγμα WS:OLPR 3:1 εμφανίζει ικανοποιητικές τιμές ώστε να δύναται να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο εναλλακτικό υπόστρωμα για την παραγωγή μανιταριών του *C. cylindracea*.

#### 2.4.3.8 Υπολογισμός της βιομετατρεψιμότητας του υποστρώματος σε μυκητιακή βιομάζα

Η μείωση της μάζας του υποστρώματος καλλιέργειας μέσω της ανάπτυξης των μυκήτων οφείλεται αφενός μεν στη βιομετατροπή τους σε μυκηλιακή βιομάζα και αφετέρου στην αποδόμηση οργανικών συστατικών και την παραγωγή CO<sub>2</sub> μέσω της αναπνευστικής δραστηριότητας. Στις προηγούμενες ενότητες παρουσιάστηκαν αποτελέσματα που αφορούσαν τόσο τη μείωση της μάζας του υποστρώματος όσο και την παραγωγή μανιταριών και μυκηλιακής βιομάζας. Συνδυάζοντας τις παραπάνω μετρήσεις κατέστη δυνατός ο υπολογισμός του ποσοστού βιομετατρεψιμότητας (μετατροπή της φυτικής βιομάζας σε μυκηλιακή) του υποστρώματος σε μυκηλιακή βιομάζα (καρποφορίες ή μυκήλιο). Όπως φαίνεται στο γράφημα 2.4.17., η συνολική βιομετατρεψιμότητα του υποστρώματος άγγιξε το 53 και 57 % για τα υποστρώματα WS:TPOMW 1:1 και WS:TPOMW 3:1 με τα στελέχη LGAM446 και LGAM281 αντίστοιχα. Τα υποστρώματα στα οποία σημειώθηκε η μέγιστη βιομετατρεψιμότητα ταυτίζονται με αυτά που καταγράφηκε η μεγαλύτερη συνολική απόδοση για το κάθε στέλεχος. Σχετικά υψηλές τιμές καταγράφηκαν σε όλα τα μείγματα WS:TPOMW, καθώς επίσης και στα WS:OLPR όπου οι τιμές έβαιναν μειούμενες με την

αύξηση της περιεκτικότητας σε υπολείμματα κλαδέματος. Αντίθετα, αρκετά μικρότερες τιμές σημειώθηκαν σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν φύλλα ελιάς (6-25%) πιθανόν λόγω της έντονα τοξικής επίδρασης τους στον υπό εξέταση μύκητα.

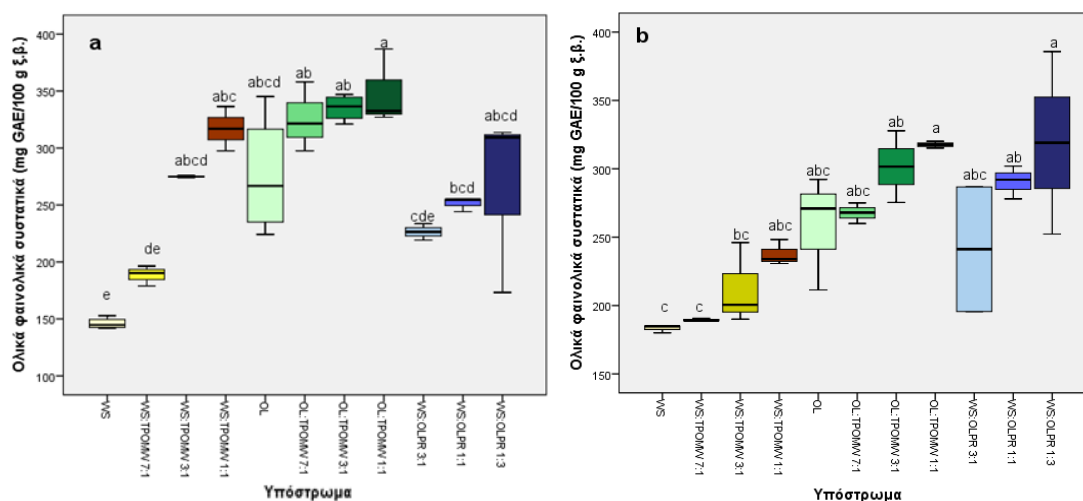


Γράφημα 2.4.17. Ποσοστό (%) βιομετατρεψιμότητας της φυτικής σε μυκητιακή βιομάζα (μυκήλιο ή καρποφορίες) μέσω της ανάπτυξης του μύκητα *C. cylindracea* σε διάφορα υποστρώματα ανάπτυξης αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματος ελιάς (OLPR).

### 2.4.3.9 Σύσταση των μανιταριών

Στα προηγούμενα κεφάλαια αποδείχθηκε ότι η σύσταση των παραγόμενων μανιταριών εξαρτάται τόσο από το στέλεχος που χρησιμοποιείται (Κεφάλαιο 2.1) όσο και από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται (Κεφάλαια 2.2 και 2.3). Στο παρόν πείραμα, στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν στα δύο στελέχη *C. cylindracea* για όλα τα συστατικά που μελετήθηκαν με εξαίρεση τα ολικά ινώδη (Πίνακας 2.4.5). Η μελέτη της βασικής σύστασης των παραγόμενων μανιταριών, έδειξε ότι η πλήρης αντικατάσταση του άχυρου από παραπροϊόντα ελαιουργίας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια και τέφρα. Το παραπάνω μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπαρών συστατικών και μετάλλων στα εν λόγω παραπροϊόντα σε σχέση με το συμβατικό υπόστρωμα. Σε αντιστοιχία με τις παρατηρήσεις σε μανιτάρια του γένους *Pleurotus* (Κεφάλαιο 2.3) εντυπωσιακή ήταν η αύξηση των ολικών φαινολικών στα εναλλακτικά υποστρώματα συγκριτικά με το άχυρο. Αναλυτικότερα, μεγαλύτερη συγκέντρωση σημειώθηκε ανάλογα με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε TROMW και για τα δύο στελέχη (έως και 316 mg GAE/100g d.w. σε σχέση με 146 -183 mg GAE/100g d.w. στο άχυρο), ενώ η συγκέντρωση σημείωσε περαιτέρω αύξηση όταν το άχυρο

αντικαταστάθηκε από φύλλα ελιάς (258 – 348 mg GAE/100g d.w.). Αντίστοιχα στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με το συμβατικό υπόστρωμα επέφερε η αντικατάσταση του αχύρου από OLPR σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η διαφορά στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών μεταξύ των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα έγινε αντιληπτή και μέσω των φασμάτων που προέκυψαν από την φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου φωτός (Fourier Transform Infrared, FTIR). Συγκεκριμένα, σημαντική μετατόπιση παρατηρήθηκε στην κορυφή στα  $3340\text{ cm}^{-1}$ , (WS), έως  $3390\text{ cm}^{-1}$  (WS:TPOMW 1:1) και  $3410\text{ cm}^{-1}$  για το OL:TPOMW 1:1 (Γράφημα 2.4.19). Η κορυφή στα παραπάνω μήκη κύματος αντιπροσωπεύει τη δόνηση των αλκοολικών OH ( $3340\text{ cm}^{-1}$ ) και έχει στο παρελθόν συσχετιστεί με τα φαινολικά συστατικά σε υψηλότερους κυματάρθρους (περίπου  $3420\text{ cm}^{-1}$ , Droussi et al., 2009, Oliveira et al., 2016). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τον σημαντικό εμπλουτισμό των μανιταριών σε φαινολικά συστατικά.

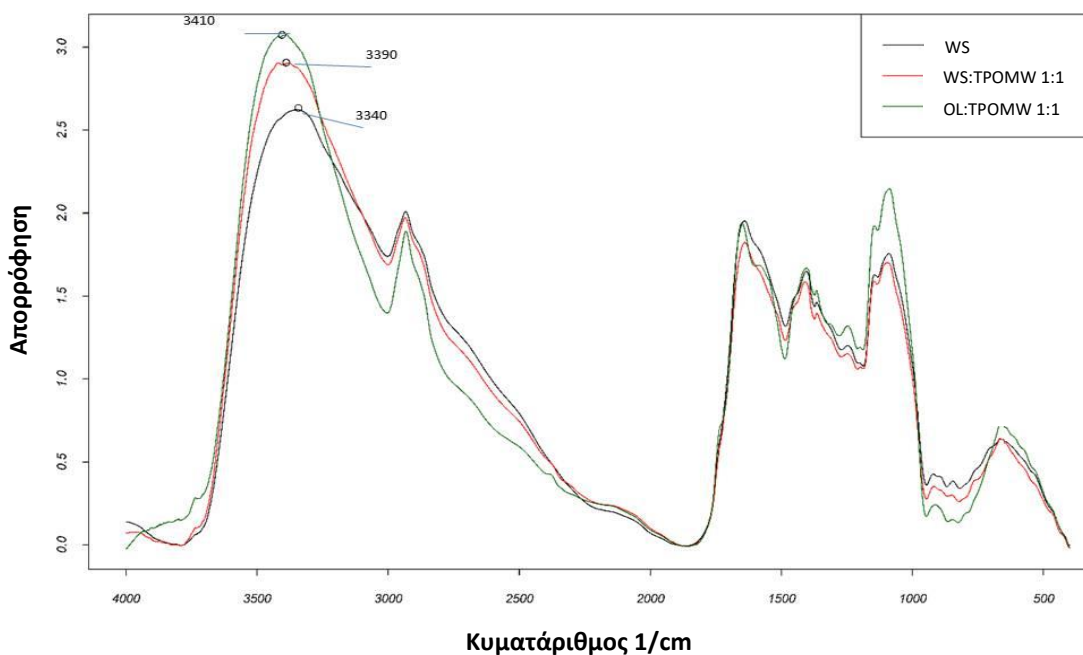


Γράφημα 2.4.18. Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στις καρποφορίες των δύο στελεχών (LGAM 446 και LGAM 281) του *C. cylindracea* που παρήχθησαν σε υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο (WS), απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδεμάτων ελιάς (OLPR). Το μέγεθος κάθε μπάρας αντιπροσωπεύει το 50% των τιμών, η μαύρη οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε μπάρα τον διάμεσο και οι γραμμές σφάλματος τις ανώτερες και κατώτερες τιμές.

**Πίνακας 2.4.5. Βασική σύσταση, περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτικές ιδιότητες μανιταριών *C. cylindracea* που παρήχθησαν σε υποστρώματα αποτελούμενα από μείγματα άχυρου (WS), αποβλήτου ελαιολιπιδίου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλων ελιάς (OL) και κλαδεμάτων ελιάς (OLPR). Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση. Τα γράμματα στους εκθέτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων.**

Υπόστρωμα	Στέλεχος	Ολικές πρωτεΐνες (% ξ.β.)	Ολικά λιπίδια	Ινώδη συστατικά (% ξ.β.)	Ολικοί υδατάνθρακες (% ξ.β.)	Τέφρα (% ξ.β.)	Ολικά φαινολικά (mg GAE/100g ξ.β.)	Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, DPPH (mmol TE / 100 g ξ.β.)
WS	LGAM446	19,7 ± 0,5 <sup>ab</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	18,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	69,7 ± 0,5 <sup>ab</sup>	8,4 ± 0,1 <sup>bcd</sup>	145,5 ± 4,8 <sup>e</sup>	1,80±0,08 <sup>ab</sup>
	LGAM281	18,6 ± 2,2 <sup>ab</sup>	2,7 ± 0,5 <sup>ab</sup>	19,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	69,8 ± 4,1 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	183,0 ± 2,6 <sup>c</sup>	1,90±0,46 <sup>a</sup>
WS:TPOMW 7:1	LGAM446	18,2 ± 1,39 <sup>ab</sup>	3,0 ± 0,5 <sup>ab</sup>	18,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	69,7 ± 1,0 <sup>ab</sup>	9,1 ± 0,8 <sup>abcd</sup>	188,0 ± 9,2 <sup>de</sup>	1,84±0,33 <sup>ab</sup>
	LGAM281	19,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>	2,6 ± 0,2 <sup>ab</sup>	18,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	68,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	189,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	2,27±0,19 <sup>a</sup>
WS:TPOMW 3:1	LGAM446	20,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,6 <sup>ab</sup>	20,1 ± 3,7 <sup>a</sup>	68,7 ± 3,7 <sup>ab</sup>	7,9 ± 0,6 <sup>cd</sup>	274,3 ± 0,6 <sup>abcd</sup>	2,05±0,20 <sup>ab</sup>
	LGAM281	17,7 ± 2,5 <sup>ab</sup>	2,5 ± 0,3 <sup>ab</sup>	16,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	71,2 ± 3,5 <sup>a</sup>	8,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	212,0 ± 29,9 <sup>bc</sup>	2,17±0,17 <sup>a</sup>
WS:TPOMW 1:1	LGAM446	16,6 ± 1,3 <sup>ab</sup>	2,9 ± 0,4 <sup>ab</sup>	19,4 ± 3,0 <sup>a</sup>	71,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	8,6 ± 0,9 <sup>abcd</sup>	316,3 ± 19,5 <sup>abc</sup>	1,79±0,14 <sup>ab</sup>
	LGAM281	15,5 ± 1,5 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>	19,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	72,6 ± 1,7 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	237,0 ± 9,6 <sup>abc</sup>	2,29±0,09 <sup>a</sup>
OL	LGAM446	20,0± 1,2 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>ab</sup>	18,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	68,8 ± 1,0 <sup>ab</sup>	8,3 ± 0,2 <sup>bcd</sup>	275,3 ± 23,4 <sup>abcd</sup>	2,32±0,04 <sup>a</sup>
	LGAM281	16,8 ± 1,3 <sup>ab</sup>	2,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	16,2 ± 3,8 <sup>a</sup>	71,7 ± 2,1 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	257,7 ± 31,9 <sup>abc</sup>	1,97±0,50 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 7:1	LGAM446	20,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	19,0 ± 2,9 <sup>a</sup>	66,6 ± 1,4 <sup>b</sup>	9,7 ± 0,3 <sup>ab</sup>	325,3 ± 30,7 <sup>ab</sup>	2,29±0,08 <sup>a</sup>
	LGAM281	20,2 ± 1,9 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,0 <sup>ab</sup>	21,6 ± 2,8 <sup>a</sup>	67,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	267,7 ± 7,5 <sup>abc</sup>	1,99±0,39 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 3:1	LGAM446	18,6 ± 0,9 <sup>ab</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	21,6 ± 3,7 <sup>a</sup>	69,1 ± 1,0 <sup>ab</sup>	9,1 ± 0,1 <sup>abcd</sup>	335,3 ± 11,6 <sup>ab</sup>	2,14±0,25 <sup>ab</sup>
	LGAM281	18,0 ± 1,0 <sup>ab</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	26,1 ± 3,7 <sup>a</sup>	68,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	10,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	301,0 ± 26,0 <sup>ab</sup>	2,22±0,15 <sup>a</sup>
OL:TPOMW 1:1	LGAM446	15,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>	21,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	72,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,3 <sup>ab</sup>	348,3 ± 32,7 <sup>a</sup>	2,40±0,84 <sup>a</sup>
	LGAM281	17,2 ± 1,8 <sup>ab</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	26,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	69,1 ± 4,0 <sup>a</sup>	10,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	317,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	2,33±0,17 <sup>a</sup>
WS:OLPR 3:1	LGAM446	19,6 ± 0,6 <sup>ab</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>ab</sup>	21,6 ± 3,9 <sup>a</sup>	68,3 ± 1,4 <sup>ab</sup>	9,3 ± 0,7 <sup>abc</sup>	226,0 ± 7,0 <sup>cde</sup>	1,45±0,24 <sup>b</sup>
	LGAM281	21,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	19,4 ± 3,3 <sup>a</sup>	66,0 ± 2,8 <sup>a</sup>	8,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	240,5 ± 44,3 <sup>abc</sup>	2,00±0,41 <sup>a</sup>
WS:OLPR 1:1	LGAM446	21,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>ab</sup>	19,8 ± 3,2 <sup>a</sup>	65,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	9,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	251,0 ± 6,1 <sup>bcd</sup>	1,90±0,40 <sup>ab</sup>
	LGAM281	20,8 ± 0,5 <sup>ab</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	17,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	66,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	290,7 ± 12,1 <sup>ab</sup>	1,95±0,00 <sup>a</sup>
WS:OLPR 1:3	LGAM446	20,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,0 <sup>ab</sup>	23,9 ± 3,1 <sup>a</sup>	67,0 ± 2,6 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>d</sup>	265,0 ± 39,7 <sup>abcd</sup>	1,81±0,49 <sup>ab</sup>
	LGAM281	18,0 ± 0,7 <sup>ab</sup>	2,9 ± 0,4 <sup>ab</sup>	17,1 ± 3,0 <sup>a</sup>	70,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	318,7 ± 36,5 <sup>a</sup>	2,31±0,11 <sup>a</sup>





**Γράφημα 2.4.19.** Σύγκριση των FTIR φασμάτων μανιταριών *C. cylindracea* LGAM446 που παρήχθησαν στα παρακάτω υποστρώματα: α) WS, β) WS:TPOMW 1:1 και γ) OL:TPOMW 1:1. Στο γράφημα σημειώνεται η χαρακτηριστική κορυφή που αντιπροσωπεύει τα φαινολικά συστατικά.

Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι και άλλα είδη καλλιεργούμενων μανιταριών εκτός αυτών του γένους *Pleurotus* απορροφούν φαινολικά συστατικά από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται βελτιώνοντας σημαντικά τα βιολειτουργικά τους χαρακτηριστικά. Η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών, έδειξε μικρότερη διακύμανση (1,45 – 2,40 και 1,90 έως 2,33 mg TE/100 g ξ.β. για τα στελέχη LGAM446 και LGAM281 αντίστοιχα). Αντίθετα, στην περίπτωση των ειδών *Pleurotus* σημειώθηκε πολύ μεγάλη αύξηση στις τιμές της παραπάνω παραμέτρου στα αντίστοιχα υποστρώματα, αποδεικνύοντας ότι κάθε είδος απορροφά διαφορετικά συστατικά και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται.

#### 2.4.4 Συμπεράσματα

Οι δοκιμές για την επιλογή των ταχύτερων όσον αφορά το ρυθμό αύξησης στελεχών του *C. cylindracea* κατέδειξαν την ικανότητα τους να αναπτύσσονται με μοναδική πηγή άνθρακα τη λιγνίνη, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για όλα τα στελέχη είναι οι 27 °C. Η χρήση των παραπροϊόντων ελαιουργίας και ελαιοκομίας είχε σημαντική επίδραση στις καλλιεργητικές παραμέτρους των δύο στελεχών. Η προσθήκη μέχρι και 25% TPOMW αύξησε

σημαντικά την απόδοση σε μανιτάρια, ενώ αντίθετα η αντικατάσταση του συμβατικού υποστρώματος από φύλλα ελιάς είχε αρνητικές συνέπειες τόσο στην πρωιμότητα όσο και στην απόδοση.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανιχνεύτηκαν για όλα τα συστατικά των μανιταριών που μελετήθηκαν με εξαίρεση τα ολικά ινώδη συστατικά. Αξιοσημείωτη ήταν η αύξηση της περιεκτικότητας σε ολικά λιπίδια και φαινολικά συστατικά σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν παραπροϊόντα ελαιουργίας.

Όσον αφορά τη βιομετατροπή των υπό εξέταση υλικών, σημαντική μείωση καταγράφηκε στην περιεκτικότητα των ημικυτταρινών και κυτταρίνης και λιγότερο της λιγνίνης μεταξύ αρχικού και εξαντλημένου υποστρώματος. Σημαντική ήταν η συμβολή των εξωκυτταρικά παραγομένων ενζύμων ξυλανάση, CMCase και λακάση στην παραπάνω μείωση, για τα οποία η μέγιστη παραγωγή τους ταυτίστηκε χρονικά και συσχετίστηκε στατιστικά με αυξημένο ρυθμό μείωσης των αντίστοιχων ινωδών συστατικών.

Τέλος, η χρήση των φασμάτων FTIR επιβεβαίωσε τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν τόσο για την διατροφική αξία των μανιταριών όσο και για τις αλλαγές στη σύσταση του υποστρώματος και φαίνεται ότι μπορεί να λειτουργήσει συμπληρωματικά ή και να αντικαταστήσει τις χρησιμοποιούμενες χρονοβόρες και οικονομικά ακριβότερες τεχνικές.

---

## Κεφάλαιο 2.5

---

**Αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων  
ελαιοτριβείου και βιομετατροπή  
ελαιουργικών υπολειμμάτων σε  
βιομάζα υψηλής διατροφικής αξίας  
με τη χρήση του μύκητα *Hericium  
erinaceus*.**

## 2.5.1 Εισαγωγή

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων μελετήθηκε για πρώτη φορά η καταλληλότητα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου ΥΑΕ και υπολειμμάτων κλαδέματος ελιάς (OLPR) ως υποστρώματα για την παραγωγή βιομάζας του μύκητα *H. erinaceus*. Αρχικά δόθηκε έμφαση στην διαδικασία αποτοξικοποίησης του ΥΑΕ μέσω της ανάπτυξης και της παραγωγής ενζύμων από τον συγκεκριμένο μύκητα. Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν διάφορα παραπροϊόντα ελαιοκομικής και ελαιουργικής προέλευσης σε συνδυασμό ή όχι με ξύλο οξιάς ως υποστρώματα για την παραγωγή μανιταριών *H. erinaceus*. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η επίδραση της χρήσης διαφορετικών υποστρωμάτων στα διατροφικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων μανιταριών.

## 2.5.2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.5.2.1 Βιολογικό υλικό

Το στέλεχος *H. erinaceus* 4514, το οποίο εξετάστηκε στα πλαίσια του παρόντος πειράματος προέρχεται από απομόνωση αυτοφυούς μανιταριού και διατηρείται σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στη συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

### 2.5.2.2 Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ

Για την αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης προετοιμάστηκαν θρεπτικά υλικά όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 σε αναλογίες 12,5, 25 και 50% ΥΑΕ με νερό. Κάθε πειραματική μονάδα αποτελούνταν από φιάλες Erlenmeyer 250 ml οι οποίες περιείχαν 100 ml από τα παραπάνω διαλείμματα. Για την ανάπτυξη των εμβολίων ο μύκητας αναπτύχθηκε σε ΥΑΕ 25% v/v στερεοποιημένο με άγαρ (1,7%) και δισκία διαμέτρου 6mm από την περιφέρεια της αποικίας αποτέλεσαν τα εμβόλια τόσο για τις υγρές καλλιέργειες (100grm, 27°C) όσο και για την δοκιμή των "race tubes" που περιγράφεται στη συνέχεια. Κάθε επέμβαση περιλάμβανε 4 επαναλήψεις ενώ μη εμβολιασμένα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Για την αξιολόγηση της διαδικασίας αποτοξικοποίησης υιοθετήθηκε μια διαδικασία δειγματοληψίας καταστροφής ("destructive sampling") κάθε 7

ημέρες και για συνολικό διάστημα 35 ημερών και προσδιορίστηκαν το pH, η μυκηλιακή βιομάζα, τα ολικά φαινολικά, το χρώμα, η επίδραση του αποβλήτου στην βλάστηση σπόρων και οι ενεργότητες των ενζύμων λακκάση (Lac), υπεροξειδάση εξαρτημένου του Mn (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP).

Η μέτρηση του pH έγινε με τη χρήση συσκευής Corning EEL 12 pH meter. Η μυκηλιακή βιομάζα συλλέχτηκε μέσω φίλτρων (Whatman No 1) και η μάζα της προσδιορίστηκε με ζύγιση αφού προηγήθηκε ξήρανση έως την απόκτηση σταθερού βάρους στους 60 °C. Η μέτρηση των ολικών φαινολικών έγινε με βάση την τροποποιημένη μέθοδο Folin-Ciocalteu περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2.6 (Kalogeropoulos et al., 2013). Ο αποχρωματισμός των ΥΑΕ επετεύχθη μέσω της μέτρησης της απορρόφησης των βιοεπεξεργασμένων και μη δειγμάτων στα 525nm.

Για την εκτίμηση της φυτοτοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν σπόροι μαρουλιού (*Lactuca sativa*). Για τη βλάστηση των σπόρων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τρυβλία Petri (9cm) στα οποία τοποθετήθηκαν τρεις κυκλικοί δίσκοι διηθητικού χαρτιού όμοιας διαμέτρου που απορρόφησαν 3 ml βιοεπεξεργασμένων ή μη ΥΑΕ. Στην επιφάνεια των χαρτιών τοποθετήθηκαν 25 σπόροι στο σκοτάδι (30 °C) για 7 ημέρες. Τελικά, η φυτοτοξικότητα των ΥΑΕ εκτιμήθηκε μέσω του υπολογισμού της επίδρασης στο δείκτη βλαστικότητας από τη σχέση:

$$GI = \frac{\text{Μήκος ριζιδίου} \times \% \text{ βλαστικότητα}}{100}$$

ενώ στον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό.

Η ενζυμική ενεργότητα (λακκάση, υπεροξειδάση του μαγγανίου [MnP] και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου [MnIP]) προσδιορίστηκε με τις μεθόδους που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.4.2.7.

### 2.5.2.3 Επιλογή των υποστρωμάτων ανάπτυξης – Προσδιορισμός του μυκηλιακού ρυθμού ανάπτυξης

Για την αξιολόγηση της ικανότητας του μύκητα *H. erinaceus* να αποικίζει στερεά υποστρώματα, προετοιμάστηκαν μείγματα αποτελούμενα από : α) υπολείμματα κλαδέματος ελιάς (OLPR) ως έχουν ή σε μείγματα με πριονίδια οξιάς (BS) σε αναλογίες 25, 50 και 75%

(κ.β.), β) απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) αναμειγμένο με BS σε αναλογίες 25 και 50% (κ.β.) και γ) TPOMW αναμειγμένο με OLPR σε αναλογίες 25 και 50% (κ.β.). Επιπλέον υπόστρωμα από πριονίδια οξιάς (BS) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Σε όλα τα υποστρώματα προστέθηκε ανθρακικό ασβέστιο (2% κ.β.) και το pH και η υγρασία ρυθμίστηκαν στο 6 και 60-65% αντίστοιχα. Επιπλέον έγινε προσθήκη πίτουρου σίτου (5% κ.β.) για τον εμπλουτισμό του υποστρώματος σε άζωτο και αυξητικούς παράγοντες. Ο προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας αύξησης αποικιών του μύκητα και της δυνατότητας να παράγει μανιτάρια στα προαναφερθέντα υποστρώματα πραγματοποιήθηκε με χρήση γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων ("race tubes") όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.2.4.

#### 2.5.2.4 Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών

Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της γραμμικής ταχύτητας αύξησης σε στερεά υποστρώματα επιλέχθηκαν τρία υποστρώματα (OLPR, OLPR 25% και OLPR 75% σε μείγματα με BS, ενώ το υπόστρωμα BS αποτέλεσε το μάρτυρα) για να διερευνηθεί η ικανότητα τους να υποστηρίξουν την παραγωγή μανιταριών. Η προετοιμασία του πολλαπλασιαστικού υλικού και των υποστρωμάτων έγινε όπως περιγράφηκε στις Παραγράφους 2.1.2.2. και 2.2.2.2 αντίστοιχα, ενώ οι συνθήκες κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και οι καλλιεργητικοί παράμετροι που καταγράφηκαν, ήταν όμοιες με αυτές που περιγράφονται για το *P. ostreatus* στις Παραγράφους 2.1.2.2 και 2.1.2.3. Ο καλλιεργητικός κύκλος ανεξαρτήτως υποστρώματος τερματίστηκε στις 90 ημέρες.

#### 2.5.2.5 Χημικές αναλύσεις μανιταριών

Μετά τη συγκομιδή τα δείγματα μανιταριών λιοφυλώθηκαν και αλέστηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε χημικές αναλύσεις. Η βασική σύσταση προσδιορίστηκε με βάση τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στην Παράγραφο 2.2.2.4, ενώ οι ολικές και οι επιμέρους γλουκάνες με τη χρήση ειδικού kit της Megazyme (Παράγραφος 2.1.2.9). Τέλος το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των μανιταριών προσδιορίστηκε με βάση τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στις παραγράφους 2.1.2.6 και 2.1.2.8 αντίστοιχα.

### 2.5.2.6 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα στους πίνακες εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση. Εξετάστηκε η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) και έγινε προσδιορισμός των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων με χρήση Duncan' *t*-test (SPSS software, version 18). Επιπλέον, ο συντελεστής συσχέτισης Pearson υπολογίστηκε από το ίδιο λογισμικό για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ διάφορων παραγόντων (σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01).

## 2.5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

### 2.5.3.1 Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι τιμές του pH παρουσίασαν σταδιακή μείωση (όσο διαρκούσε η μυκηλιακή αύξηση) από 5,50 στο αρχικό διάλειμμα έως και 4,00 στο τέλος της διαδικασίας στο ΥΑΕ 12,5%, ενώ στα ΥΑΕ 25% και ΥΑΕ 50% οι αντίστοιχες τιμές έφτασαν το 4,53 και 5,03 αντίστοιχα μετά από 5 εβδομάδες (Πίνακας 2.5.1). Οι διαφορές στις τιμές του pH μετά την βιοεπεξεργασία ήταν πιο έντονες στο *H. erinaceus* σε σύγκριση με αυτές που παρατηρήθηκαν σε άλλους μύκητες όπως οι *Abortiporus biennis*, *Phanochaete chrysosporium* και *Pleurotus ostreatus* (Κεφάλαιο 3.1). Η ανάπτυξη των προαναφερθέντων ειδών σε ΥΑΕ συνοδεύτηκε με μείωση του pH μέχρι την τιμή 5,00-5,20, ενώ μόνο το *Irpex lacteus* επέφερε μείωση συγκρίσιμη με εκείνη του *H. erinaceus* (τελική τιμή 4,48).

Σε όλες τις αραιώσεις ΥΑΕ που εξετάστηκαν το *H. erinaceus* παράγαγε άφθονη μυκηλιακή βιομάζα. Ωστόσο οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΥΑΕ απέδωσαν σημαντικά υψηλότερες τιμές ( $154,8 \pm 8,45$  mg στο ΥΑΕ 50%) το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη συγκέντρωση θρεπτικών και στη σχετική ανθεκτικότητα που επέδειξε ο μύκητας στην τοξικότητα των αποβλήτων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη μειούμενη παραγωγή βιομάζας καθώς μειώθηκε η συγκέντρωση των ΥΑΕ στις υπόλοιπες δύο αραιώσεις, η οποία είναι ιδιαίτερα έντονη στα τελικά στάδια της μυκηλιακής αύξησης. Αντίθετα ο ρυθμός παραγωγής βιομάζας τις πρώτες εβδομάδες ήταν σχετικά υψηλός λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητας εύκολα αφομοιώσιμων θρεπτικών.

Η καταγραφή των ενζύμων που παράγονται κατά τη διάρκεια της μυκηλιακής αύξησης αποκάλυψε την υψηλή ενεργότητα της λακκάσης (Γράφημα 2.5.1.a), η οποία

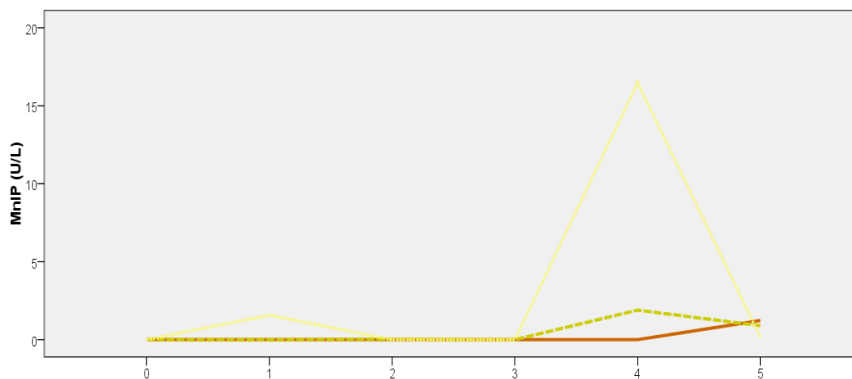
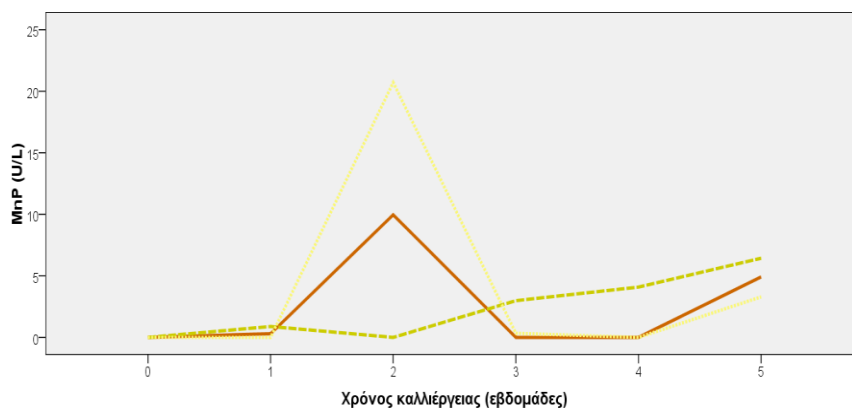
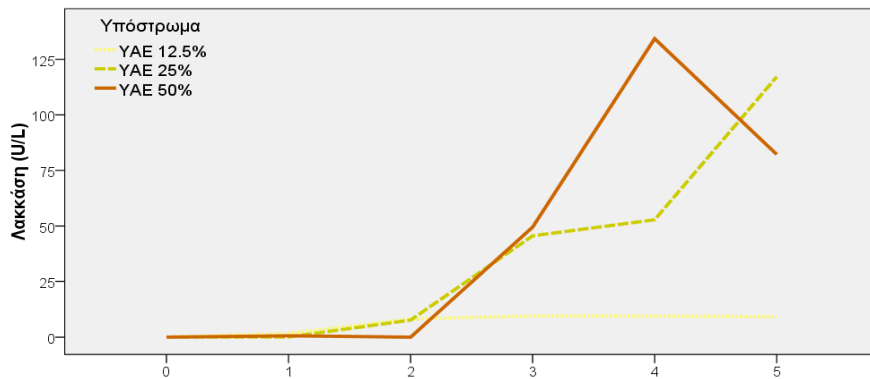
αυξήθηκε ραγδαία μετά τη δεύτερη εβδομάδα ανάπτυξης στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΥΑΕ (25 και 50%). Ειδικότερα όσον αφορά την επέμβαση ΥΑΕ 50%, αποδείχθηκε ότι η αρχική φάση υστέρησης της παραγωγής λακκάσης διάρκειας 14 ημερών, ακολουθείται από τη μέγιστη ενεργότητα ( $134 \text{ U L}^{-1}$  στις 28 ημέρες). Αντίθετα η ΜnP εκφράστηκε νωρίτερα κατά την πρώτη εβδομάδα της καλλιέργειας, ενώ έλαβε τις υψηλότερες τιμές κατά τη διάρκεια της δεύτερης εβδομάδας ανάπτυξης. Η ΜnIP παρήχθη προς το τέλος της ανάπτυξης παρουσιάζοντας χαμηλή ενεργότητα (Γράφημα 2.5.1.b,c).

**Πίνακας 2.5.1. Αποχρωματισμός και μείωση ολικών φαινολικών (σε σχέση με μη εμβολιασμένο ΥΑΕ), δείκτης βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού (G.I.%), pH υποστρώματος και παραγωγή βιομάζας του μύκητα *H. erinaceus* σε διάφορες αραιώσεις ΥΑΕ (διαλύματα 12.5%, 25% και 50% v/v με νερό) κάθε 7 ημέρες και για συνολική χρονική περίοδο 35 ημερών. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n=4$ . Μη εμβολιασμένο ΥΑΕ χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και ως T0 αναφέρεται η χρονική στιγμή πριν τον εμβολιασμό. Οι εκθέτες εκφράζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t* test,  $P < 0.05$ ) μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων (κεφαλαία γράμματα) και μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών (πεζά γράμματα).**

Παράμετρος	Time	ΥΑΕ 12,5%	ΥΑΕ 25%	ΥΑΕ 50%
pH	T0	5.50 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	5.50 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>	5.50 $\pm$ 0.00 <sup>Aa</sup>
	T1	4.97 $\pm$ 0.06 <sup>Bb</sup>	5.03 $\pm$ 0.06 <sup>Ab</sup>	5.10 $\pm$ 0.00 <sup>Ab</sup>
	T2	4.97 $\pm$ 0.12 <sup>Ab</sup>	4.90 $\pm$ 0.00 <sup>Bbc</sup>	5.4 $\pm$ 0.10 <sup>Aa</sup>
	T3	4.97 $\pm$ 0.12 <sup>Ab</sup>	4.90 $\pm$ 0.00 <sup>Abc</sup>	5.4 $\pm$ 0.10 <sup>Aa</sup>
	T4	4.50 $\pm$ 0.00 <sup>Bc</sup>	4.71 $\pm$ 0.61 <sup>Abc</sup>	5.13 $\pm$ 0.06 <sup>Aab</sup>
	T5	4.00 $\pm$ 0.00 <sup>Bd</sup>	4.53 $\pm$ 0.06 <sup>Bc</sup>	5.03 $\pm$ 0.06 <sup>Ab</sup>
Βιομάζα (mg)	T1	39.65 $\pm$ 0.85 <sup>Bd</sup>	39.63 $\pm$ 0.31 <sup>Bd</sup>	50.28 $\pm$ 2.61 <sup>Ae</sup>
	T2	75.22 $\pm$ 2.96 <sup>Bc</sup>	73.31 $\pm$ 1.91 <sup>Bc</sup>	83.80 $\pm$ 0.71 <sup>Ad</sup>
	T3	78.76 $\pm$ 3.48 <sup>Bc</sup>	100.02 $\pm$ 8.07 <sup>Ab</sup>	103.69 $\pm$ 9.27 <sup>Ac</sup>
	T4	85.85 $\pm$ 1.89 <sup>Bb</sup>	119.23 $\pm$ 3.66 <sup>Ab</sup>	128.91 $\pm$ 9.41 <sup>Ab</sup>
	T5	100.29 $\pm$ 7.76 <sup>Ca</sup>	137.49 $\pm$ 1.91 <sup>Ba</sup>	154.80 $\pm$ 8.45 <sup>Aa</sup>
Αποχρωματισμός (%)	T1	-3.28 $\pm$ 1.51 <sup>Ac</sup>	4.10 $\pm$ 0.35 <sup>Ac</sup>	8.33 $\pm$ 1.91 <sup>Ac</sup>
	T2	43.56 $\pm$ 8.44 <sup>Ab</sup>	9.47 $\pm$ 1.24 <sup>Ab</sup>	14.03 $\pm$ 0.78 <sup>Abc</sup>
	T3	49.35 $\pm$ 6.0 <sup>Ab</sup>	57.63 $\pm$ 1.48 <sup>Aa</sup>	20.33 $\pm$ 2.59 <sup>Ab</sup>
	T4	59.08 $\pm$ 1.73 <sup>Aa</sup>	59.97 $\pm$ 5.70 <sup>Aa</sup>	28.48 $\pm$ 0.99 <sup>Aa</sup>
	T5	60.63 $\pm$ 1.83 <sup>Aa</sup>	64.65 $\pm$ 0.21 <sup>Aa</sup>	32.28 $\pm$ 4.45 <sup>Aa</sup>
Μείωση ολικών φαινολικών (%)	T1	12.71 $\pm$ 0.67 <sup>Ab</sup>	27.39 $\pm$ 0.94 <sup>Ad</sup>	14.63 $\pm$ 2.78 <sup>Ad</sup>
	T2	31.71 $\pm$ 6.15 <sup>Aa</sup>	34.86 $\pm$ 1.38 <sup>Ac</sup>	25.24 $\pm$ 1.38 <sup>Ac</sup>
	T3	32.60 $\pm$ 5.34 <sup>Aa</sup>	39.41 $\pm$ 1.39 <sup>Abc</sup>	29.76 $\pm$ 3.88 <sup>Ac</sup>
	T4	33.05 $\pm$ 0.31 <sup>Aa</sup>	44.36 $\pm$ 0.53 <sup>Ab</sup>	40.47 $\pm$ 0.97 <sup>Ab</sup>
	T5	34.37 $\pm$ 0.62 <sup>Aa</sup>	50.68 $\pm$ 0.35 <sup>Aa</sup>	46.46 $\pm$ 2.37 <sup>Aa</sup>
G.I. (%)	T0	20.11 $\pm$ 0.71 <sup>Ae</sup>	9.44 $\pm$ 1.21 <sup>Ad</sup>	0.34 $\pm$ 0.05 <sup>Ac</sup>
	T1	28.71 $\pm$ 1.24 <sup>Ad</sup>	12.87 $\pm$ 0.98 <sup>Ad</sup>	1.24 $\pm$ 0.17 <sup>Ab</sup>
	T2	50.79 $\pm$ 3.67 <sup>Ac</sup>	24.58 $\pm$ 1.14 <sup>Ac</sup>	3.58 $\pm$ 0.87 <sup>Aab</sup>
	T3	80.14 $\pm$ 5.74 <sup>Ab</sup>	39.57 $\pm$ 2.87 <sup>Ab</sup>	5.87 $\pm$ 1.31 <sup>Aa</sup>
	T4	88.07 $\pm$ 2.01 <sup>Ab</sup>	44.36 $\pm$ 2.47 <sup>Ab</sup>	6.14 $\pm$ 0.87 <sup>Aa</sup>
	T5	98.04 $\pm$ 3.33 <sup>Aa</sup>	51.83 $\pm$ 1.71 <sup>Aa</sup>	6.99 $\pm$ 0.74 <sup>Aa</sup>

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 2.5.2.) παρατηρήθηκε μεταξύ της παραγόμενης βιομάζας και της ενεργότητας τόσο της Lac όσο και της ΜnIP ( $r = 0.758$  και  $r = 0,663$  αντίστοιχα,  $p < 0.01$ ).





**Γράφημα 2.5.1.** Ενζυμική ενεργότητα ( $U L^{-1}$ ) λακκάσης, υπεροξειδάσης εξαρτημένης του Mn (MnP) και υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του Mn (MnIP) κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του *Hericium erinaceus* σε YAE (12,5, 25 και 50% v/v με νερό) για συνολική χρονική περίοδο 35 ημερών (μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε 7 ημέρες).

Παρόλο που σε κάποιες περιπτώσεις τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος συμφωνούν με τη μεταβολή της ενζυμικής ενεργότητας σε σχέση με τη μυκηλιακή αύξηση (ενεργότητα λακάσης στα είδη *Ganoderma* και *Pleurotus* και MnIP στα *Pleurotus*) δεν συμβαίνει το ίδιο για τη σχέση λακκάσης και MnP στα είδη *A. biennis* και *P. chrysosporium* αντίστοιχα (Κεφάλαιο 3.1). Στα δύο τελευταία η μέγιστη ενεργότητα των αντίστοιχων

ενζύμων σημειώθηκε στα αρχικά στάδια ανάπτυξης σε αντίθεση με την εικόνα που παρουσιάστηκε στο *H. erinaceus*. Οι διαφορές στους χρόνους παραγωγής και τις τιμές ενεργότητας των ενζύμων, μπορούν να αποδοθούν τόσο σε εγγενείς ιδιότητες του κάθε μύκητα όσο και σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.

Η ανάπτυξη του *H. erinaceus* συνοδεύτηκε από μείωση των ολικών φαινολικών (Πίνακας 2.5.1), η οποία ήταν ιδιαίτερα έντονη στις επεμβάσεις ΥΑΕ 25% και ΥΑΕ 50% (50,68 και 46,56% αντίστοιχα σε σύγκριση με το μάρτυρα). Περισσότερο από το ήμισυ της μείωσης επιτεύχθηκε τις δύο πρώτες εβδομάδες της μυκηλιακής ανάπτυξης για όλες τις επεμβάσεις, ενώ στην επέμβαση ΥΑΕ 25% απαιτήθηκαν μόνο 7 ημέρες για τη μείωση των φαινολικών κατά 50%. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μείωση των φαινολικών συσχετίστηκε σημαντικά με την ενεργότητα της λακκάσης ( $r = 0,668$ ,  $p < 0.01$ ) και την παραγωγή βιομάζας ( $r = 0,945$ ,  $p < 0.01$ ).

Παρόμοιες συσχετίσεις έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς ακόμη μύκητες λευκής σήψης όχι μόνο κατά τη βιοαποδόμηση ΥΑΕ (Κεφάλαιο 3.1, Ntougias et al., 2012, Tsioupras et al., 2002), αλλά και κατά τη βιοεπεξεργασία αποβλήτων από την εκπίκραση πράσινων ελιών (Aggelis et al., 2002). Η μεγαλύτερη μείωση του φαινολικού φορτίου, η οποία σημειώθηκε στις μικρότερες αραιώσεις του ΥΑΕ μπορεί να σχετίζεται με την επαγωγή της λακκάσης λόγω της παρουσίας κατάλληλου υποστρώματος, όπως στην περίπτωση των ειδών *Pleurotus* για τα οποία αποδείχθηκε ότι υψηλή ενεργότητα λακκάσης σημειώνεται όταν η συγκέντρωση των φαινολικών ξεπερνά τα  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  (Ntougias et al., 2015, Tsioupras et al., 2002).

Μεγαλύτερη μείωση του χρώματος παρατηρήθηκε στην επέμβαση ΥΑΕ 25% και άγγιξε το 64,65% όντας συγκρίσιμη (δεν διέφεραν σημαντικά) με την αντίστοιχη μείωση στην αραιώση 12,5% (60,63%). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αποχρωματισμός των ΥΑΕ που επιτεύχθηκε από τη χρήση του *H. erinaceus* ήταν ανάμεσα στους αποδοτικότερους που έχουν αναφερθεί για βασιδιομύκητες. Για παράδειγμα, παρόμοια ή μικρότερη μείωση επιτεύχθηκε -μέσω των ευρέως χρησιμοποιούμενων για αυτό το σκοπό- *P. chrysosporium* και *Pleurotus* spp. (μείωση του χρώματος κατά 33 και 38-48% αντίστοιχα, Κεφάλαιο 3.1). Σε μια ακόμη ανάλογη εργασία όπου εξετάστηκε η ικανότητα μυκήτων λευκής σήψης να αποδομούν ΥΑΕ, οι υψηλότερες τιμές αποχρωματισμού έφτασαν το 70%, ενώ για την πλειοψηφία των 49 στελεχών που δοκιμάστηκαν κυμάνθηκε από 10 έως και 60% σε σχέση με το μάρτυρα (Ntougias et al., 2015). Μόνο στην περίπτωση εμπλουτισμού με άζωτο, ο αποχρωματισμός

ενισχύθηκε περαιτέρω με τιμές που ξεπερνούν το 75 % (Jaouani et al., 2003, Zerva et al., 2016).

Είναι αξιοσημείωτο ότι ο αποχρωματισμός αποδείχθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με τη μείωση των ολικών φαινολικών σε όλες τις επεμβάσεις που δοκιμάστηκαν ( $r = 0.774$ ,  $p = 0.01$ ), εύρημα το οποίο συμφωνεί με προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με τον αποχρωματισμό ΥΑΕ και την αποδόμηση πολυφαινολών μεγάλου μοριακού βάρους (Κεφάλαιο 3.1, Sayadi et al, 2000). Επιπλέον, υψηλές συσχετίσεις ανιχνεύτηκαν μεταξύ αποχρωματισμού και ενζυμικής ενεργότητας ( $r = 0,805$ ,  $p < 0.05$  για τη λάκκωση και  $r = 0,849$ ,  $p < 0.05$  για την MnP) αλλά και με την παραγωγή βιομάζας ( $r = 0,749$ ,  $p < 0.05$ ). Αυτό συνέβη επίσης και όταν εξετάστηκε ο αποχρωματισμός άλλων μυκήτων λευκής σήψης σε σχέση με λιγνινολυτικά ένζυμα που αυτοί παρήγαγαν (Κεφάλαιο 3, D'Annibale et al., 2004, Dias et al., 2004).

**Πίνακας 2.5.2. Τιμές του δείκτη συσχέτισης Pearson για τις συγκρίσεις μεταξύ των τιμών μυκηλιακής βιομάζας, μείωσης ολικών φαινολικών, αποχρωματισμού, δείκτη βλαστικότητας και ενζυμικής ενεργότητας λακκάσης (Lac), υπεροξειδάσης του Mn (MnP) και υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του Mn (MnIP) σε ΥΑΕ στα οποία αναπτύχθηκε ο μύκητας *H. erinaceus*. \*Στατιστικά σημαντικό σε επίπεδο 5% και \*\* σε επίπεδο 1%.**

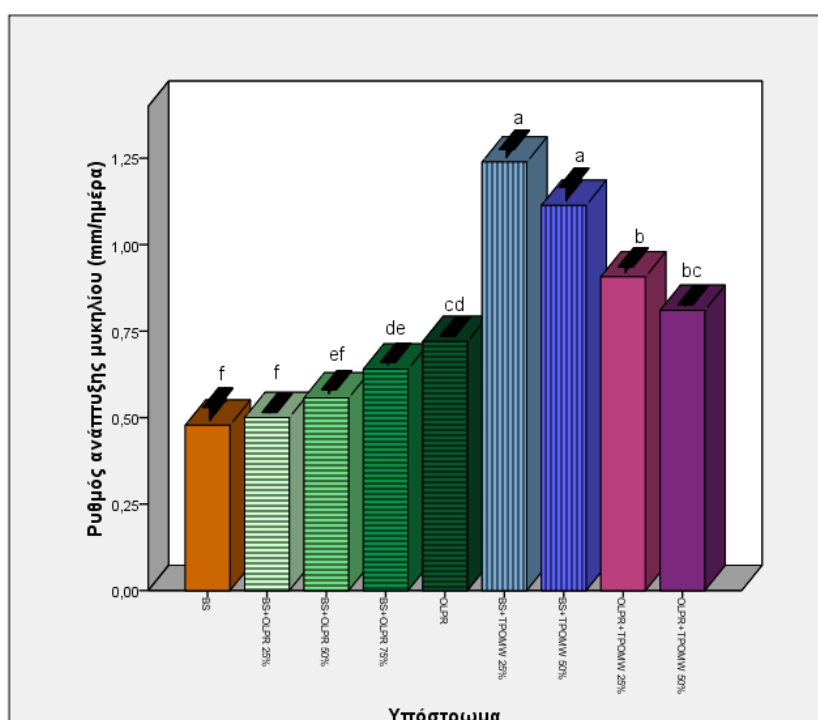
	Μυκηλιακή βιομάζα	Μείωση ολικών φαινολικών	Αποχρωματισμός	Δείκτης βλαστικότητας	Ενεργότητα Lac	Ενεργότητα MnIP
Μυκηλιακή βιομάζα	-					
Μείωση ολικών φαινολικών	0.945**	-				
Αποχρωματισμός	0.749**	0.774**	-			
Δείκτης βλαστικότητας	0.264	0.384	0.757**	-		
Ενεργότητα Lac	0.758**	0.668**	0.805**	-0.77	-	
Ενεργότητα MnIP	0.663*	0.136	0.339	0.461	-0.067	-
Ενεργότητα MnP	0.268	0.297	0.849**	0.144	0.035	-0.135

Όσον αφορά την εκτίμηση της φυτοτοξικότητας (Πίνακας 2.5.1), σημαντική μείωση επετεύχθη στις μεγάλες αραιώσεις των ΥΑΕ (98 και 52% για τα ΥΑΕ 12,5% και ΥΑΕ 25% αντίστοιχα), σε αντίθεση με την ελάχιστη μείωση που καταγράφηκε στην επέμβαση ΥΑΕ 50% (7%). Η αύξηση στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων συσχετίζεται σημαντικά με τον αποχρωματισμό ( $r = 0,757$ ,  $p < 0,01$ ), το οποίο συμφωνεί με αποτελέσματα μείωσης τοξικότητας ΥΑΕ που είχαν προηγουμένως επεξεργαστεί με τα είδη *A. biennis*, *Lentinula edodes* και *Pleurotus* (Κεφάλαιο 3.1, Ntougias et al., 2012, D'Annibale et al., 2004).

Γενικά, ο ρυθμός μείωσης των παραμέτρων ρύπανσης των ΥΑΕ φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη της μυκηλιακής βιομάζας (Πίνακας 2.5.2). Η σημαντική μείωση που παρατηρήθηκε στην ενεργότητα της λακάσης συνέπεσε χρονικά με τη μέγιστη παραγωγή MnP, ενώ η MnIP δεν φαίνεται να συμβάλει σημαντικά στην αποδόμηση των ΥΑΕ.

### 2.5.3.2 Επιλογή υποστρωμάτων καλλιέργειας – Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης

Σε συνέχεια του προηγούμενου πειράματος έγινε αξιολόγηση της ικανότητας του μύκητα *H. erinaceus* να αποικίζει στερεά υποστρώματα, αποτελούμενα από: α) υπολείμματα κλαδέματος ελιάς (OLPR) ως έχουν ή σε μείγματα με πριονίδια οξιάς (BS) σε αναλογίες 25, 50 και 75%, β) απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) αναμεμιγμένο με BS σε αναλογίες 25 και 50% και γ) TPOMW αναμεμιγμένο με OLPR σε αναλογίες 25 και 50%. Επιπλέον υπόστρωμα από πριονίδια οξιάς (BS) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.



Γράφημα 2.5.2. Γραμμική ταχύτητα αύξησης ( $\text{mm day}^{-1}$ ) του *Hericium erinaceus* κατά τη διάρκεια αποικισμού υποστρωμάτων αποτελούμενων από τρία βασικά υλικά (BS: πριονίδια οξιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων και OLPR: υπολείμματα κλαδέματος ελιάς) και διάφορα μείγματα τους, όπως προσδιορίστηκαν με χρήση γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων ("race tubes"). Οι τιμές (mm/ημέρα) εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα ( $n = 4$ ) και τα γράμματα αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$  test,  $P < 0,05$ ) για συγκρίσεις μεταξύ των μέσων όρων στα διαφορετικά υποστρώματα.

Τα υποστρώματα στα οποία καταγράφηκαν οι μεγαλύτερες τιμές της γραμμικής ταχύτητας αύξησης ήταν αυτά που περιείχαν TPOMW σε μείγματα με BS και OLPR (Γράφημα 2.5.2.). Ωστόσο ο αποικισμός των υποστρωμάτων αυτών δεν συνοδεύτηκε από εμφάνιση μανιταριών με αποτέλεσμα να αποκλειστούν από τα πειράματα καλλιέργειας. Φαίνεται ότι τα επίπεδα τοξικότητας λόγω της παρουσίας του TPOMW εμποδίζουν ή καθυστερούν το

σχηματισμό μανιταριών, όπως παρατηρήθηκε και σε μανιτάρια παραγόμενα από είδη *Pleurotus* και το *Cyclocybe cylindracea* (Κεφάλαια 2.2 & 2.4). Αντίθετα, τα υποστρώματα που περιείχαν OLPR, έδειξαν ικανοποιητικούς ρυθμούς ανάπτυξης τους οποίους ακολούθησε εμφάνιση μανιταριών.

### 2.5.3.3 Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών

Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της γραμμικής ταχύτητας αύξησης επιλέχθηκαν τρία υποστρώματα (OLPR, OLPR 25% και OLPR 75% σε μείγματα με BS, ενώ το υπόστρωμα BS αποτέλεσε το μάρτυρα) για να διερευνηθεί η ικανότητα τους να υποστηρίξουν την παραγωγή μανιταριών.

Η καλλιεργητική περίοδος στα υπό εξέταση υποστρώματα διήρκησε 90 ημέρες, ενώ για την επώαση και την εμφάνιση των μανιταριών απαιτήθηκαν από 28 - 30 και 39 - 45 ημέρες αντίστοιχα χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων (Πίνακας 2.5.3). Σε προηγούμενες εργασίες αναφέρεται παρόμοια διάρκεια επώασης (25 ημέρες) αλλά μικρότερος χρόνος για την ολοκλήρωση του κύκλου καλλιέργειας (55 έως 68 ημέρες, Figlas et al., 2007, Ko et al., 2005). Αντίθετα πολύ μεγαλύτερο διάστημα απαιτήθηκε (μέχρι και 300 ημέρες) όταν υιοθετήθηκε διαφορετική καλλιεργητική τεχνική (Hu et al., 2008).

**Πίνακας 2.5.3. Καλλιεργητικοί παράμετροι του *H. erinaceus* κατά τη διαδικασία παραγωγής μανιταριών σε τέσσερα υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδια οξιάς (BS) και κλαδέματα ελιάς (OLPR, ή και μείγματα με BS). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan  $t$ -test,  $P < 0.05$ ) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Παράμετροι	Υποστρώματα			
	BS	BS:OLPR 3:1	BS:OLPR 1:3	OLPR
Περίοδος επώασης (ημέρες)	30.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	29.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	28.00 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	28.00 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>
Πρωιμότητα (ημέρες)	15.00 $\pm$ 4.00 <sup>a</sup>	10.00 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	12.30 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	14.00 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>
Συνολική καλλιεργητική περίοδος (ημέρες)	45,00 $\pm$ 4,00 <sup>a</sup>	51,00 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	49,70 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	48,00 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>
Συνολική απόδοση (g)	20,82 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	22,53 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	29,70 $\pm$ 3,19 <sup>b</sup>	73,12 $\pm$ 9,51 <sup>a</sup>
Βιολογική αποδοτικότητα (%)	5,96 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	6,44 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	24,29 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	30,83 $\pm$ 2,71 <sup>a</sup>
Παραγωγικότητα	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.64 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>

Όσον αφορά το δυναμικό των υποστρωμάτων στην παραγωγή μανιταριών, τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα καταγράφηκαν στο υπόστρωμα OLPR, το οποίο διέφερε στατιστικά με όλα τα υπόλοιπα που εξετάστηκαν (Πίνακας 2.5.3). Έτσι η συνολική απόδοση

σε μανιτάρια κυμάνθηκε από 20,82 g στο BS μέχρι και 73,12 g στο OLPR, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της βιολογικής αποδοτικότητας ήταν από 5,96 έως 30,83%. Το υπόστρωμα OLPR κατατάσσεται ανάμεσα στα πιο αποδοτικά που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία μαζί με τα εμπλουτισμένα κελύφη σπόρων ηλίανθου (33-43%) και το πριονίδι οξιάς εμπλουτισμένο με ριζάλευρο (35%). Η χαμηλή αποδοτικότητα στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και αποτελεί το σύννηθες υλικό στην καλλιέργεια του εν λόγω μανιταριού μπορεί να αποδοθεί στη σχετικά χαμηλή προσθήκη πίτουρου που χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετη πηγή αζώτου (5%) και την τελικά υψηλή αναλογία C/N (539 έναντι 35 στο OLPR). Στο παρελθόν υποστρώματα με μεγάλη περιεκτικότητα αζώτου (χαμηλός λόγος C/N) έχουν συσχετιστεί με υψηλή απόδοση σε μανιτάρια σε πολλά καλλιεργούμενα είδη όπως τα *Cyclocybe cylindracea*, *Lentinula edodes* και *Pleurotus ostreatus* (Κεφάλαια 2.2 & 2.3, Isikhuemhen & Mikiashvili 2009, Philippousis et al., 2001, Philippousis et al., 2003).



**Εικόνα 2.5.1.** Καρποφορίες *Hericium erinaceus* που παρήχθησαν σε υπόστρωμα αποτελούμενο από κλαδέματα ελιάς (OLPR).

Οι υψηλότερες τιμές παραγωγικότητας σημειώθηκαν στο υπόστρωμα OLPR ακολουθούμενο από το OLPR 75% (0,34 και 0,27 αντίστοιχα), ενώ πολύ χαμηλότερες τιμές επέδειξαν τα δύο άλλα υποστρώματα (Πίνακας 2.5.3). Στο παρελθόν υψηλότερες τιμές παραγωγικότητας έχουν αναφερθεί σε υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδια προερχόμενα από διάφορα είδη δέντρων ή κελύφη σπόρων ηλίανθου (έως και 0,7) (Figlas et al., 2007, Ko et al., 2005). Ωστόσο στις περιπτώσεις αυτές τα κυρίως υλικά ήταν εμπλουτισμένα σε μεγαλύτερο βαθμό με άλευρα και άλλα πρόσθετα. Επιπλέον, στο

υπόστρωμα BS σημειώθηκαν χαμηλές τιμές παραγωγικότητας, όπως παρατηρήθηκε και στα είδη *C. cylindracea* και *P. ostreatus*, αποδεικνύοντας την αναγκαιότητα αξιοποίησης εναλλακτικών υποστρωμάτων ή/και την περαιτέρω βελτίωση των καλλιεργητικών συνθηκών (Llarena-Hernández et al., 2014). Σε πολλές περιπτώσεις η χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων και των παραπροϊόντων ελαιουργίας έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ποιοτικά υποβαθμισμένων καρποφοριών (Kalmis et al., 2008, Noble et al., 2003) κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας (Εικόνα 2.5.1).

#### 2.5.3.4 Αξιολόγηση ποιοτικών παραμέτρων σεμανιτάρια *H. erinaceus* που παρήχθησαν σε παραπροϊόντα ελαιοκομίας

Σε παλιότερες μελέτες αλλά και στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, έχει αποδειχθεί ότι η διατροφική αξία των καλλιεργούμενων μανιταριών δύναται να επηρεαστεί τόσο από τις καλλιεργητικές τεχνικές όσο και από τη σύσταση του υποστρώματος (Κεφάλαια 2.2, 2.3, 2.4, Bonatti et al. 2004). Σύμφωνα με τις αναλύσεις της βασικής σύστασης των μανιταριών *H. erinaceus* που παρήχθησαν σε διαφορετικά υποστρώματα, στατιστικά σημαντικές διαφορές προέκυψαν μόνο για την περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά και τέφρα (Πίνακας 2.5.4). Ειδικότερα, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν σαφώς υψηλότερες από αυτές που αναφέρονται τόσο για το *H. erinaceus* (15,4-18,8%) όσο και για άλλα είδη μανιταριών ανεπτυγμένα σε παρόμοια υποστρώματα (13,9 – 21,4% [Κεφάλαια 2.2 & 2.4, Heleno et al., 2015, Rodrigues et al., 2015]). Αντίθετα, το ποσοστό των ινωδών συστατικών και των υδατανθράκων στο τελικό προϊόν ήταν χαμηλότερο για το *H. erinaceus* από ότι σεμανιτάρια των ειδών *C. cylindracea* και *P. ostreatus* που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα BS αλλά και σε παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας (5,1-6,8 έναντι 12,5-15,8% και 60,6-64,4 έναντι 68,3 – 73,% αντίστοιχα, Κεφάλαια 2.2 & 2.4). Είναι ενδιαφέρον ότι τα ολικά λιπίδια σταμανιτάρια κυμάνθηκαν από 1,56 έως 2,78% (ξ.β.), ενώ αυξήθηκαν σημαντικά στα υποστρώματα που περιείχαν μεγάλο ποσοστό OLPR (Πίνακας 2.5.4). Παρόμοια περιεκτικότητα σε λιπίδια με αυτή των μανιταριών που παρήχθησαν στο BS έχει αναφερθεί επίσης σεμανιτάρια καλλιεργημένα σε εμπλουτισμένα πριονίδια αλλά και συλλεχθέντα από τη φύση (Heleno et al., 2015, Rodriguez et al., 2015). Επιπλέον ταμανιτάρια που καλλιεργήθηκαν στο OLPR περιείχαν σημαντικά χαμηλότερη τέφρα (7,9%) συγκριτικά με αυτά από το BS (9,2%), ενώ ακόμη χαμηλότερες

τιμές έχουν παρατηρηθεί τόσο σε αυτοφυή (3,49%, Rodrigues et al., 2015) όσο και σε καλλιεργούμενα (6,91%, Heleno et al., 2015) μανιτάρια *H. erinaceus*.

**Πίνακας 2.5.4. Βασική σύσταση, περιεκτικότητα σε γλουκάνες και ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτικές ιδιότητες μανιταριών *H. erinaceus* που παρήχθησαν σε υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδια οξιάς (BS) και κλαδέματα ελιάς (OLPR, ή και μείγματα με BS). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test,  $P < 0.05$ ) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.**

Συστατικά	Υποστρώματα			
	BS	BS:OLPR 3:1	BS:OLPR 1:3	OLPR
Ολικές πρωτεΐνες %	28,68 $\pm$ 2.72 <sup>a</sup>	24,74 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>	25,65 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	26,16 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>
Ολικά λιπίδια %	1.56 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	1.57 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	2.33 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.78 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
Ολικά ινώδη %	5.98 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	6.78 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	5.12 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	5.59 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>
Ολικοί υδατάνθρακες %	60.56 $\pm$ 2.99 <sup>a</sup>	64.25 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	62.22 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	63.14 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>
Ενέργεια (kcal 100g <sup>-1</sup> )	371 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	370 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	372 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	382 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Τέφρα %	9.19 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	9.43 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	9.78 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	7.92 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
$\alpha$ -γλουκάνες %	0.93 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.93 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.88 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
$\beta$ -γλουκάνες %	15,58 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	15,83 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	15,73 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	20,69 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>
Ολικά φαινολικά (mg GAE g <sup>-1</sup> d.w)	3.24 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	4.16 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	5.04 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	4.93 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (mmol TE g <sup>-1</sup> d.w)	2.10 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.98 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.23 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>
Μείωση αντιοξειδωτικού δυναμικού (mmol TE g <sup>-1</sup> d.w)	3.56 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	4.47 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	5.34 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	5.23 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>

Στο παρελθόν, οι πολυσακχαρίτες (κυρίως  $\beta$ -γλουκάνες) του *H. erinaceus* έχουν ταυτοποιηθεί, χαρακτηριστεί και αξιολογηθεί σχετικά με την ανοσορυθμιστική, αντιπεργλυκαϊμική, αντικαρκινική, νευροπροστατευτική και άλλες ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες τους (Dong et al., 2006, Friedman 2015). Ωστόσο για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η περιεκτικότητα των γλουκανών του *H. erinaceus* ποσοτικοποιήθηκε και διερευνήθηκαν οι διαφοροποιήσεις των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το μεγαλύτερο ποσοστό τους αποτελείται από  $\beta$ -γλουκάνες (94,4 – 95,9%, ανάλογα με το υπόστρωμα καλλιέργειας) ενώ πολύ χαμηλή είναι η αναλογία σε  $\alpha$ -γλουκάνες. Επιπροσθέτως, η περιεκτικότητά σε  $\beta$ - και ολικές γλουκάνες των μανιταριών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα OLPR ήταν κατά 23-24% υψηλότερη (στατιστικά σημαντική) από αυτή που σημειώθηκε στα υπόλοιπα υποστρώματα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις συγκρίσεις μεταξύ των τελευταίων (Πίνακας 2.5.4). Η περιεκτικότητα των  $\alpha$ -γλουκανών ήταν επίσης υψηλότερη στο OLPR αλλά χωρίς να διαφοροποιείται στατιστικά από τα υπόλοιπα υποστρώματα.

Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν υψηλές τιμές τόσο για τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών (3,24 – 5,04 mg GAE ανά g ξ.β μανιταριών) όσο και για την



αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των μανιταριών (ικανότητα δέσμμευσης ελευθέρων ριζών] 1,98 – 2,23 mmol ισοδύναμα Trolox ανά g ξ.β. και μείωση αντιοξειδωτικού δυναμικού] 3,56 – 5,34 mmol ισοδύναμα Trolox ανά g ξ.β.). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τιμές των ολικών φαινολικών και του αντιοξειδωτικού δυναμικού ήταν σημαντικά υψηλότερες στα μανιτάρια που παρήχθησαν στα υποστρώματα OLPR και OLPR 75% σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ η αναγωγική ισχύς εμφάνισε μικρότερες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων (Πίνακας 2.5.4). Πρόσφατα οι Rodrigues et al. (2015) ανέφεραν περιεκτικότητα ολικών φαινολικών 7,53 mg ισοδύναμα κατεχόλης ανά g ξ.β., το οποίο μπορεί να αποδοθεί τόσο στη διαφορετική σύσταση του υποστρώματος όσο και στο διαφορετικό στέλεχος που χρησιμοποίησαν. Παρόμοια αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρήθηκε στα είδη *Pleurotus* (Κεφάλαιο 2.3) και στο *C. cylindracea* (Κεφάλαιο 2.4). Γενικά οι μετρήσεις των ολικών φαινολικών ποικίλουν πολύ μεταξύ αυτοφυών και καλλιεργούμενων μανιταριών (2,83-6,29 και 5,51 – 9,66 mg ανά g ξ.β.) (Barros et al., 2007, Tsai et al., 2009), ενώ ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει με τις τιμές της αναγωγικής ισχύος και του αντιοξειδωτικού δυναμικού (Kalogeropoulos et al., 2013, Ramírez-Anguiano et al. 2007).

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προέκυψε υψηλή συσχέτιση μεταξύ φαινολικών και μείωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας ( $r = 1$ ,  $p < 0.01$ ), επιβεβαιώνοντας ότι τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τους κυριότερους αντιοξειδωτικούς παράγοντες των εδώδιμων μανιταριών. Επιπλέον η απουσία οποιασδήποτε συσχέτισης της περιεκτικότητας σε γλουκάνες με την αντιοξειδωτική δράση έρχεται σε αντίθεση με παλαιότερα ευρήματα σε δείγματα μανιταριών (Zhang et al., 2012). Ωστόσο αυτό μπορεί να οφείλεται στη παρουσία επιπλέον πολικών μορίων και πολυσακχαριτών -πέραν των γλουκανών- στα υδατικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αντίθεση με την ελάχιστη ή και καθόλου παρουσία τους στα μεθανολικά εκχυλίσματα της παρούσας μελέτης.

#### 2.5.4 Συμπεράσματα

Το *H. erinaceus* παρήγαγε άφθονη βιομάζα σε καλλιέργειες σε υγρά μέσα αποτελούμενα από ΥΑΕ και ταυτόχρονα μείωσε σημαντικά το χρώμα και τα ολικά φαινολικά επιτυγχάνοντας σημαντική αποτοξικοποίηση του αποβλήτου. Η παραγωγή των λιγνολυτικών ενζύμων συσχετίστηκε τόσο με τη μυκηλιακή αύξηση όσο και με τη μείωση των ρυπαντικών παραγόντων. Επιπλέον υποστρώματα αποτελούμενα από υπολείμματα κλαδέματος ελιάς

υποστήριξαν υψηλότερη απόδοση μανιταριών και βιολογική αποδοτικότητα σε σχέση με το μάρτυρα, αποδεικνύοντας την καταλληλότητα τους για την αντικατάσταση του συμβατικού υποστρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μανιτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα OLPR ήταν υψηλής ποιότητας και περιείχαν αυξημένη συγκέντρωση β-γλουκανών, φαινολικών και αντιοξειδωτικών συστατικών. Η περαιτέρω έρευνα για βελτίωση της διαδικασίας καλλιέργειας του *H. erinaceus* μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη αξιοποίηση παρόμοιων αγροβιομηχανικών παραπροϊόντων και την παραγωγή μανιταριών με αναβαθμισμένη συγκέντρωση βιοδραστικών συστατικών.

---

## Κεφάλαιο 2.6

---

**Βιοαποδόμηση υγρών αποβλήτων  
ελαιοτριβείων και καλλιέργεια  
μανιταριών γένους *Ganoderma* σε  
ελαιουργικά και ελαιοκομικά  
παραπροϊόντα – Αξιολόγηση  
διαδικασίας και τελικού προϊόντος**

## 2.6.1 Εισαγωγή

Στο παρόν Κεφάλαιο μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης παραπροϊόντων ελαιοκομίας και ελαιουργίας στην καλλιέργεια δύο ειδών του γένους *Ganoderma* (*G. lucidum* και *G. lingzhi*) και αξιολογήθηκε η διαδικασία παραγωγής της μυκηλιακής βιομάζας. Επιπλέον, σε υγρές καλλιέργειες αποτελούμενες από ΥΑΕ έγινε εκτίμηση του βαθμού αποτοξικοποίησης του αποβλήτου. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της φύσης των υποστρωμάτων στη βασική σύσταση των παραγόμενων μανιταριών και διερευνήθηκε η πιθανή πρεβιοτική του δράση.

## 2.6.2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.6.2.1 Βιολογικό υλικό

Τα στελέχη *G. lingzhi* LGAM 7400 και *G. lucidum* LGAM 9720, τα οποία εξετάστηκαν στα πλαίσια του παρούσας εργασίας, προέρχονται από απομόνωση αυτοφυών μανιταριών και διατηρούνται είτε σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στη συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.

### 2.6.2.2 Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ

Για την αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης προετοιμάστηκαν θρεπτικά υλικά όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.12 σε αναλογίες 12,5, 25 και 50% ΥΑΕ με νερό. Κάθε πειραματική μονάδα αποτελούνταν από φιάλες Erlenmeyer 250 ml, οι οποίες περιείχαν 100 ml από τα παραπάνω διαλύματα. Για την ανάπτυξη των εμβολίων ο μύκητας αναπτύχθηκε σε ΥΑΕ 25% v/v στερεοποιημένο με άγαρ (1,7%) και δισκία διαμέτρου 6mm από την περιφέρεια της αποικίας αποτέλεσαν τα εμβόλια τόσο για τις υγρές καλλιέργειες (100grm, 27°C) όσο και για την δοκιμή των “race tubes” που περιγράφεται στη συνέχεια. Κάθε επέμβαση περιελάμβανε 4 επαναλήψεις ενώ συμπεριλήφθηκαν και 4 πειραματικές μονάδες που περιείχαν ως υπόστρωμα εκχύλισμα βύνης (malt extract, Sigma-Aldrich, 15 g/l) για τη σύγκριση της απόδοσης αλλά και των ποιοτικών χαρακτηριστικών της παραγόμενης βιομάζας (μη εμβολιασμένα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες). Για την αξιολόγηση της διαδικασίας αποτοξικοποίησης υιοθετήθηκε μια διαδικασία δειγματοληψίας καταστροφής (“destructive sampling”) κάθε 7 ημέρες και για συνολικό διάστημα 35 ημερών

και προσδιορίστηκαν το pH, η μυκηλιακή βιομάζα, τα ολικά φαινολικά, το χρώμα, η επίδραση του αποβλήτου στη βλάστηση σπόρων και οι ενζυμικές ενεργότητες λακκασών (Lac), υπεροξειδάσης εξαρτημένης του Mn (MnP) και υπεροξειδάσης ανεξάρτητη του Mn (MnIP).

Η μέτρηση του pH, του αποχρωματισμού, των ολικών φαινολικών και της φυτοτοξικότητας, έγινε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.5.2.2, ενώ η ηλεκτρική αγωγιμότητα μετρήθηκε με τη βοήθεια συσκευής Lenway 4010 conductivity meter. Οι ενζυμικές ενεργότητες (λακκάση, υπεροξειδάση εξαρτημένης του μαγγανίου, και υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου) προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.4.2.7.

### 2.6.2.3 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου

Ο προσδιορισμός βασίστηκε στην οξείδωση των δειγμάτων με ισχυρό οξειδωτικό διάλυμα διχρωμικού καλίου ( $K_2Cr_2O_7$ ) σε όξινο περιβάλλον με πυκνό θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ) και υψηλή θερμοκρασία παρουσία καταλύτη  $AgSO_4$ , ώστε να εξασφαλιστεί η οξείδωση των οργανικών ενώσεων. Η πέψη έγινε σε ειδική συσκευή (COD reactor, HACH) στους  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , για 2 ώρες. Η τιτλοδότηση των χωνεμένων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μετά την προσθήκη φεροΐνης (2 σταγόνες) με θειικό αμμωνιούχο σίδηρο. Τελικά, η χημικά απαιτούμενη ποσότητα οξυγόνου υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$COD (mg/l) = (B-T)/S*1000,$$

Όπου:

T: Ο όγκος διαλύματος θειικού αμμωνιούχου σιδήρου που καταναλώνεται για το δείγμα

B: Ο όγκος διαλύματος FASS που καταναλώνεται για τον προσδιορισμό του τυφλού δείγματος

S: Ο όγκος διαλύματος θειικού αμμωνιούχου σιδήρου που καταναλώνεται για το διάλυμα διόρθωσης

### 2.6.2.4 Επιλογή των υποστρωμάτων ανάπτυξης – Προσδιορισμός του μυκηλιακού ρυθμού ανάπτυξης

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των στελεχών *G. lingzhi* LGAM 7400 και *G. lucidum* LGAM 9720 να αποικίζουν στερεά υποστρώματα, προετοιμάστηκαν μείγματα αποτελούμενα

από : α) κλαδέματα ελιάς (OLPR) ως έχουν ή σε μείγματα με πριονίδια οξιάς (BS) σε αναλογίες 25, 50 και 75% (κ.β.), β) απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) αναμεμειγμένο με BS σε αναλογίες 25 και 50% (κ.β.) και γ) TPOMW αναμεμειγμένο με OLPR σε αναλογίες 25 και 50% (κ.β.). Επιπλέον υποστρώμα από πριονίδια οξιάς (BS) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Σε όλα τα υποστρώματα προστέθηκε ανθρακικό ασβέστιο (2% κ.β.) και το pH και η υγρασία ρυθμίστηκαν στο 6 και 60-65% αντίστοιχα. Επιπλέον έγινε προσθήκη πίτουρου σίτου (5% κ.β.) για τον εμπλουτισμό του υποστρώματος σε άζωτο και αυξητικούς παράγοντες. Ο προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας αύξησης αποικιών του μύκητα και της δυνατότητας να παράγει μανιτάρια στα προαναφερθέντα υποστρώματα πραγματοποιήθηκε με χρήση γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων ("race tubes") όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.4.2.4.

#### 2.6.2.5 Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών

Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της γραμμικής ταχύτητας αύξησης σε στερεά υποστρώματα επιλέχθηκαν πέντε υποστρώματα (BS:OLPR 3:1, BS:OLPR 1:1, BS:OLPR 1:3, BS:TPOMW 3:1 και BS:TPOMW 1:1, ενώ το υπόστρωμα BS αποτέλεσε το μάρτυρα) για να διερευνηθεί η ικανότητα τους να υποστηρίξουν την παραγωγή μανιταριών. Η προετοιμασία του πολλαπλασιαστικού υλικού και των υποστρωμάτων έγινε όπως περιγράφηκε στις Παραγράφους 2.1.2.2 και 2.2.2.2 αντίστοιχα, ενώ οι συνθήκες κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και οι καλλιεργητικοί παράμετροι που καταγράφηκαν, ήταν όμοιες με αυτές που περιγράφονται για το *P. ostreatus* με τη διαφορά ότι κατά τη διάρκεια του σχηματισμού και της ανάπτυξης των καρποφοριών η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 25 °C. Επιπλέον στα είδη του γένους *Ganoderma* που εξετάστηκαν, οι καρποφορίες δεν εμφανίζονται κατά κύματα (flushes) όπως στα υπόλοιπα είδη, αλλά παράγονται συνεχόμενα μετά τον πλήρη αποικισμό μέχρι και την πλήρη εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος.

#### 2.6.2.6 Χημικές αναλύσεις μανιταριών

Μετά τη συγκομιδή τα δείγματα μανιταριών λιοφυλιώθηκαν και αλέστηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε χημικές αναλύσεις. Η βασική σύσταση προσδιορίστηκε με βάση τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στην Παράγραφο 2.2.2.4, ενώ το ολικό φαινολικό περιεχόμενο

και η αντιοξειδωτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των μανιταριών, μετρήθηκαν με βάση τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στις Παραγράφους 2.1.2.6 και 2.1.2.8 αντίστοιχα.

### 2.6.2.7 Προσδιορισμός της πρεβιοτικής δράσης

Η διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης πραγματοποιήθηκε τόσο σε μικήλιο που προήλθε από καθαρές καλλιέργειες σε malt extract όσο και σε καρποφορίες επιλεγμένων στελεχών. Αρχικά μελετήθηκε η ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079 στο υγρό θρεπτικό μέσο De Man, Rogossa and Sharpe broth (MRS) δίχως γλυκόζη ή με μοναδική πηγή άνθρακα το υπό εξέταση μυκητιακό υλικό. Στη συνέχεια, καρποφορίες οι οποίες είχαν αναπτυχθεί σε διαφορετικά λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα δοκιμάστηκαν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη 3 ακόμη προβιοτικών μικροοργανισμών (*L. gasseri*, *Bifidobacterium bifidum* και *B. longum*). Όλα τα βακτηριακά στελέχη προέρχονται από τη συλλογή του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου και προσφέρθηκαν ευγενώς από την Αναπλ. Καθηγήτρια Α. Κυριακού για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής.

Στην περίπτωση του *L. acidophilus*, αρχικά πραγματοποιήθηκε αναβίωση των βακτηρίων (από καλλιέργειες σε γλυκερόλη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε θρεπτικό μέσο MRS broth και ακολούθησε αναερόβια επώαση για 48 h στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ακολούθησαν 2 ενεργοποιήσεις του βακτηρίου σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 ml MRS broth και επώαστηκαν για 48h στους  $27^{\circ}\text{C}$ . Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό διάλυμα MRS broth και ως αρνητικός το MRS broth δίχως γλυκόζη. Για κάθε επέμβαση συμπεριλήφθηκαν 3 επαναλήψεις. Στη συνέχεια, σε κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5 ml MRS broth δίχως γλυκόζη, προστέθηκαν 0,1 g λυοφιλιωμένου δείγματος και εμβολιάστηκαν με 50 μl από την ενεργοποιημένη καλλιέργεια του βακτηρίου. Ακολούθησε επώαση στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 48h σε θάλαμο αναερόβιας επώασης (Bactron 1,5, SHELLAB) κατά την οποία παραλαμβάνονταν δείγμα 100 μl κάθε 0, 24 και 48 ώρες. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και από την καταλληλότερη αραιώση έγινε επίστρωση με 100 μl σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Με το πέρας των 48h καταγράφηκε ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκε σε κάθε περίπτωση.

Οι καρποφορίες μανιταριών *P. ostreatus* και *Ganoderma* spp. μελετήθηκαν περαιτέρω στην καλλιέργεια του *L. gasseri*, το οποίο απομονώθηκε από την εντερική μικροχλωρίδα τελειώμων βρεφών μέσω ταυτοποίησης με την τεχνική της μοριακής

αλληλούχισης γονιδίων (Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της ανάπτυξης του *L. gasseri* ήταν όμοια με την προηγούμενη.

Στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*, τον θετικό και αρνητικό μάρτυρα αποτέλεσε το θρεπτικό mMRS broth με την προσθήκη του αντιβιοτικού Gentamicin με ή χωρίς γλυκόζη αντίστοιχα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναβίωση των πρότυπων στελεχών *B. bifidum* DSMZ 20456 και *B. longum* σε υπόστρωμα mMRS με επώαση για 72h και 48h αντίστοιχα στους 37°C. Ακολούθησε ενεργοποίηση του μικροοργανισμού μέσω του εμβολιασμού σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 ml mMRS (LAB) με 4 mg/l Gentamicin (D' Aिमimo, 2007) και επώαστηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας προηγήθηκε ακόμη μια ενεργοποίηση σε όμοιες συνθήκες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη των δύο στελεχών ήταν η ίδια με το *L. acidophilus* με τη μόνη διαφορά ότι μετά την επίστρωση των τρυβλίων στο *B. bifidum* ακολούθησε επώαση για 72 στους 37 °C.

#### 2.6.2.8 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα στους Πίνακες εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση. Εξετάστηκε η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) και έγινε προσδιορισμός των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων με χρήση Duncan' *t*-test (SPSS software, version 18). Επιπλέον, ο συντελεστής συσχέτισης Pearson υπολογίστηκε από το ίδιο λογισμικό για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ διάφορων παραγόντων (σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01).

### 2.6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 2.6.3.1 Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των ΥΑΕ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η μυκηλιακή βιομάζα που παρήχθηκε μετά την πάροδο 42 ημερών από τα δύο στελέχη ήταν σημαντικά περισσότερη στο υπόστρωμα που περιείχε 25% ΥΑΕ (43 – 46 mg, ξ.β.) συγκριτικά με τα άλλα δύο υποστρώματα που εξετάστηκαν (ΥΑΕ 12,5% και ΥΑΕ 50%, 15 – 34 mg, ξ.β.) (Πίνακας 2.6.1). Πιθανόν η μείωση που παρατηρείται σε υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΥΑΕ και για τα δύο είδη να οφείλεται σε φαινόμενα τοξικότητας ή έλλειψης επαρκών θρεπτικών αντίστοιχα. Στις



πειραματικές μονάδες οι οποίες περιείχαν εκχύλισμα βύνης -το οποίο αποτελεί ένα από τα συνηθέστερα θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη μυκήτων- η ποσότητα της μυκηλιακής βιομάζας ήταν 9-10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την απόδοση στα ΥΑΕ (484 και 355 mg για τα *G. lingzhi* και *G. lucidum* αντίστοιχα). Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι με εξαίρεση το υπόστρωμα 50% ΥΑΕ στο οποίο το *G.lingzhi* παρήγαγε υπερδιπλάσια ποσότητα βιομάζας, σε όλα τα υπόλοιπα δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών. Στα συγγενή είδη *G. australe* και *G. carnosum* όπως επίσης και στο *P. ostreatus* τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υγρά μέσα με 25 και 50% ΥΑΕ, η ποσότητα της βιομάζας ήταν σχεδόν διπλάσια (Ntougias et al., 2012), κάτι που πιθανόν οφείλεται στη μικρότερη τοξικότητα ή/και στην υψηλότερη συγκέντρωση σε διαθέσιμα θρεπτικά του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε.

**Πίνακας 2.6.1. Ηλεκτρική αγωγιμότητα, pH, χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (C.O.D.), δείκτης βλαστικότητας (G.I.%), αποχρωματισμός, μείωση ολικών φαινολικών και παραγωγή βιομάζας στελεχών των ειδών *G. lingzhi* και *G. lucidum* ανεπτυγμένων σε υποστρώματα αποτελούμενα από ΥΑΕ (12.5%, 25% και 50% κ.ό. με νερό) μετά από καλλιέργεια 42 ημερών. Οι εκθέτες εκφράζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's *t* test,  $p < 0.05$ ) μεταξύ του αρχικού και του βιοεπεξεργασμένου υλικού.**

Παράμετρος	Είδος	ΥΑΕ 12,5%	ΥΑΕ 25%	ΥΑΕ 50%
pH	Αρχικό	5,50±0,00 <sup>a</sup>	5,50±0,00 <sup>a</sup>	5,50±0,00 <sup>a</sup>
	<i>G. lingzhi</i>	4,50±0,00 <sup>b</sup>	4,85±0,03 <sup>b</sup>	5,00±0,00 <sup>b</sup>
	<i>G. lucidum</i>	4,97±0,09 <sup>a</sup>	4,90±0,04 <sup>b</sup>	5,00±0,00 <sup>b</sup>
E.C. (ms cm <sup>-1</sup> )	Αρχικό	2,06±0,02 <sup>b</sup>	4,12±0,06 <sup>a</sup>	6,90±0,07 <sup>b</sup>
	<i>G. lingzhi</i>	2,26±0,00 <sup>a</sup>	4,34±0,07 <sup>a</sup>	8,02±0,11 <sup>a</sup>
	<i>G. lucidum</i>	2,11±0,02 <sup>b</sup>	4,14±0,06 <sup>a</sup>	8,16±0,07 <sup>a</sup>
C.O.D. (mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	Αρχικό	10500±100 <sup>a</sup>	21600±100 <sup>a</sup>	41900±0 <sup>a</sup>
	<i>G. lingzhi</i>	6400±400 <sup>b</sup>	16300±200 <sup>b</sup>	29800±500 <sup>c</sup>
	<i>G. lucidum</i>	7000±200 <sup>b</sup>	15100±200 <sup>b</sup>	33300±400 <sup>b</sup>
G.I. (%)	Αρχικό	53,94±5,16 <sup>c</sup>	23,00±1,18 <sup>b</sup>	0
	<i>G. lingzhi</i>	84,06±4,29 <sup>a</sup>	19,47±4,42 <sup>b</sup>	0
	<i>G. lucidum</i>	69,76±4,51 <sup>b</sup>	44,88±6,47 <sup>a</sup>	0
Αποχρωματισμός (% σε σχέση με το αρχικό χρώμα)	<i>G. lingzhi</i>	50,29±0,39 <sup>a</sup>	46,59±0,76 <sup>a</sup>	19,41±2,73 <sup>b</sup>
	<i>G. lucidum</i>	50,68±1,13 <sup>a</sup>	44,47±2,45 <sup>a</sup>	36,2±1,72 <sup>a</sup>
Μείωση ολικών φαινολικών (% σε σχέση με την αρχική περιεκτικότητα)	<i>G. lingzhi</i>	23,44±1,78 <sup>a</sup>	47,73±1,16 <sup>a</sup>	2,12±0,89 <sup>a</sup>
	<i>G. lucidum</i>	19,95±4,43 <sup>a</sup>	43,24±1,78 <sup>a</sup>	2,47±0,96 <sup>a</sup>
Βιομάζα (mg)	<i>G. lingzhi</i>	28,72±0,80 <sup>b</sup>	43,44±7,87 <sup>a</sup>	30,20±4,51 <sup>a</sup>
	<i>G. lucidum</i>	34,01±1,78 <sup>a</sup>	45,69±4,11 <sup>a</sup>	14,91±1,17 <sup>b</sup>

Όπως στις περισσότερες περιπτώσεις ανάπτυξης μυκήτων σε ΥΑΕ, έτσι και στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του pH μετά το πέρας της καλλιέργειας (με εξαίρεση το είδος *G. lucidum* στο υπόστρωμα 12,5 ΥΑΕ) και αύξηση στην ηλεκτρική αγωγιμότητα, ιδιαίτερα στο υπόστρωμα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ΥΑΕ όπου εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το αρχικό υλικό. Παρομοίως,

ελαφρώς όξινο pH παρατηρήθηκε μετά την ανάπτυξη σε ΥΑΕ και άλλων ειδών του γένους *Ganoderma*, ενώ αντίθετα η καλλιέργεια ειδών *Pleurotus* είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση στις τιμές του pH (Ntougias et al., 2012). Όσον αφορά τη μείωση του οργανικού φορτίου, το οποίο εμμέσως προσδιορίστηκε από την μέτρηση του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD), παρατηρήθηκε μείωση από 21 έως και 39% και ήταν μεγαλύτερη στην επέμβαση ΥΑΕ12,5% συγκριτικά με τις μικρότερες αραιώσεις του αποβλήτου (Πίνακας 2.6.1.).

Η μείωση του φαινολικού περιεχομένου παρουσίασε μεγάλη διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων. Υψηλές τιμές αποδόμησης παρατηρήθηκαν στην επέμβαση 25% ΥΑΕ (43 – 48%), στην οποία αποδείχθηκε ότι παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα μυκηλιακής βιομάζας, ενώ πολύ μικρότερη ήταν στην αραιώση 12,5% ΥΑΕ και ελάχιστη σε σχέση με το αρχικό υλικό στη μικρότερη αραιώση (ΥΑΕ 50%), (Πίνακας 2.6.1). Τέλος, η μείωση του χρώματος ήταν αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αποβλήτου καθώς με την αύξηση της περιεκτικότητας σε ΥΑΕ παρουσιάστηκε μικρότερη μείωση στο χρώμα του βιοεπεξεργασμένου διαλύματος. Η απόδοση των δύο ειδών που μελετήθηκαν ήταν ικανοποιητική στις δύο μεγαλύτερες αραιώσεις (44 – 51%) και διέφερε μόνο στην μικρότερη αραιώση (ΥΑΕ 50%) τόσο μεταξύ των δύο ειδών όσο και σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Η μερική αποδόμηση οργανικών συστατικών των ΥΑΕ είχε ως συνέπεια τη μείωση της τοξικότητας του τελικού υλικού, η οποία υπολογίστηκε μέσω του δείκτη βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού (BI%). Από τις συγκρίσεις μεταξύ των τιμών του δείκτη BI (%), παρατηρείται μείωση στην τοξικότητα από 23 έως και 36% στη μεγαλύτερη αραιώση του ΥΑΕ (12,5%), ενώ το στέλεχος *G. lucidum* απέδωσε καλύτερα σε σχέση με το *G. lingzhi* όταν χρησιμοποιήθηκε σε ΥΑΕ 25% (μείωση της τοξικότητας κατά 45%, ενώ στο *G. lingzhi* δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το αρχικό υλικό). Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι η ελάχιστη μείωση των ολικών φαινολικών καθώς και η μερική αποδόμηση της οργανικής ουσίας που σημειώθηκε στο υπόστρωμα 50% ΥΑΕ δεν προκάλεσαν τη μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου (Πίνακας 2.6.1.). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, οι Ntougias et al. (2012) παρατήρησαν ότι τα στελέχη του γένους *Ganoderma* που χρησιμοποίησαν, δεν μείωσαν την τοξικότητα των ΥΑΕ. Αντίθετα, στελέχη των ειδών *P. ostreatus* και *P. eryngii* επέφεραν αύξηση της βλαστικότητας σπόρων μέχρι και 27% μετά την πάροδο 30 ημερών.

Εν κατακλείδι, η αραιώση ΥΑΕ 25% αποδείχθηκε ότι είναι η πλέον κατάλληλη για την παραγωγή βιομάζας των ειδών *G. lingzhi* και *G. lucidum* επιτυγχάνοντας παράλληλα και

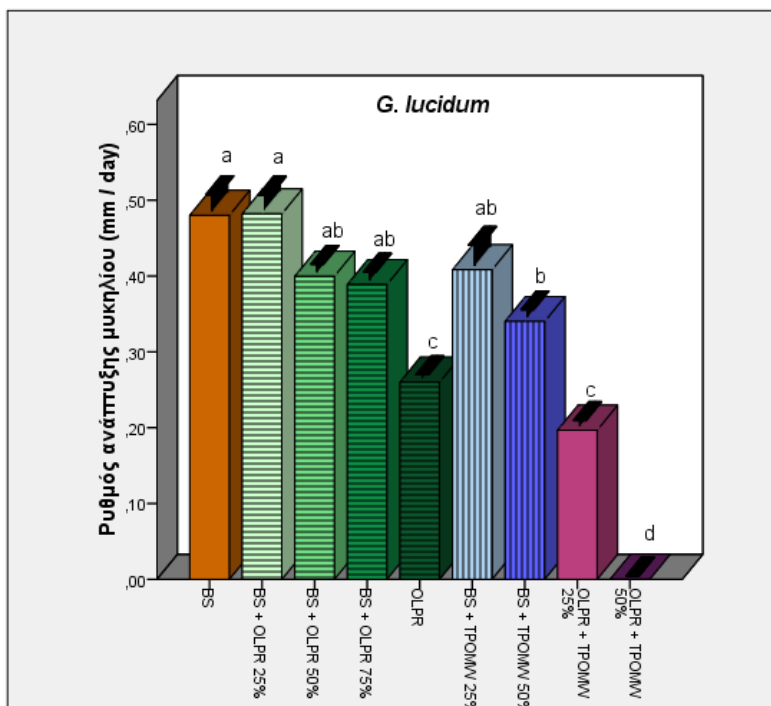
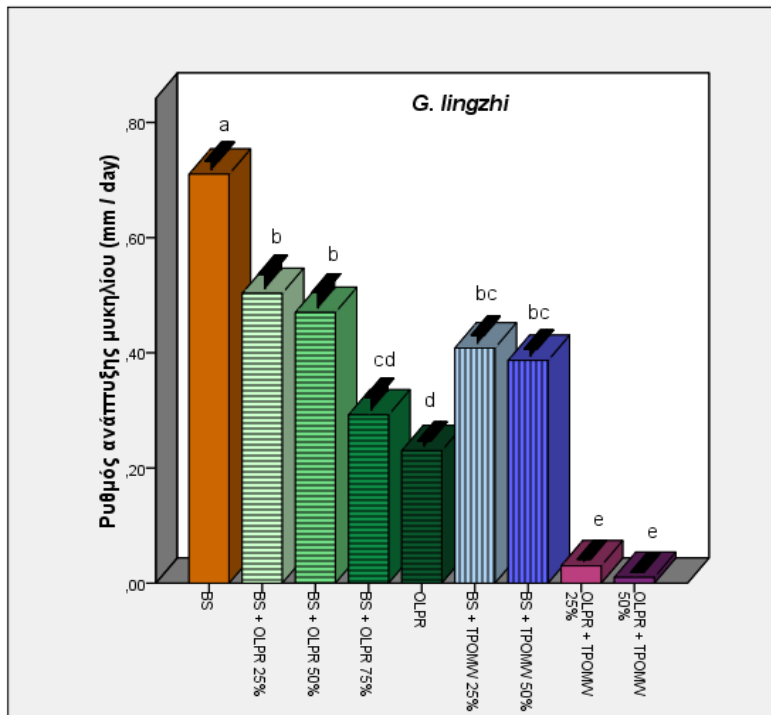
ικανοποιητική μείωση του ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της καλλιέργειας, όπως π.χ. στην αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων που σχετίζονται με την αποδόμηση συστατικών των ΥΑΕ.

### 2.6.3.2 Επιλογή υποστρωμάτων καλλιέργειας – Προσδιορισμός γραμμικής ταχύτητας αύξησης

Σε συνέχεια του προηγούμενου πειράματος, τα δύο στελέχη *G. lingzhi* και *G. lucidum* αξιολογήθηκαν ως προς τη γραμμική ταχύτητα αύξησης και τη δυνατότητα να παράγουν μανιτάρια σε υποστρώματα αποτελούμενα από α) κλαδέματα ελιάς (OLPR) μόνα ή αναμειγμένα με πριονίδια οξιάς (BS) σε αναλογίες 25, 50 και 75%, β) απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) αναμειγμένο με BS σε αναλογίες 25 και 50% και γ) TPOMW αναμειγμένο με OLPR σε αναλογίες 25 και 50%. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε “race tubes”, ενώ υπόστρωμα από πριονίδια οξιάς (BS) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.



Εικόνα 2.6.1. Σχηματισμός μανιταριών *G. lucidum* σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (“race tubes”)



Γράφημα 2.6.1. Γραμμική ταχύτητα αύξησης στελεχών των ειδών *G. lingzhi* (LGAM 7400) και *G. lucidum* (9720) κατά την διάρκεια αποικισμού υποστρωμάτων βασισμένων σε τρία βασικά υλικά (BS: πριονίδια οξιάς, TPOMW: απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων και OLPR: κλαδέματα ελιάς) και μείγματα τους σε δοκιμές που έγιναν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες ("race tubes"). Οι τιμές (mm/ημέρα) εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα ( $n = 4$ ) και τα γράμματα αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$  test,  $p < 0,05$ ) για συγκρίσεις μεταξύ των μέσων όρων στα διαφορετικά υποστρώματα.

Ο ρυθμός ανάπτυξης για το είδος *G. lingzhi* παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στο υπόστρωμα BS συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα, ενώ τα μείγματα του BS με OLPR (25 και 50%) και με TPOMW (25 και 50%) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Στα υποστρώματα που καταγράφηκε ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης για το είδος *G. lucidum* περιλαμβάνεται τόσο το BS όσο και όλα τα μείγματα BS με OLPR, καθώς και το υπόστρωμα BS + TPOMW 25% (όλα τα παραπάνω δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, Γράφημα 2.6.1.).

Μετά την ολοκλήρωση του αποικισμού, τα αποικισμένα υποστρώματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειες μανιταριών με σκοπό τη διερεύνηση της ικανότητας των επιμέρους υποστρωμάτων στην δημιουργία καρποφοριών. Σε όλα τα υποστρώματα σχηματίστηκαν καρποφορίες με εξαίρεση τα μείγματα OLPR:TPOMW. Ως εκ τούτου, τα τελευταία αποκλείστηκαν από την συνέχεια των πειραμάτων στην οποία τελικά αξιολογήθηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα τα εναπομείναντα έξι υποστρώματα.

### 2.6.3.3 Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας μανιταριών

Όπως προαναφέρθηκε, μια από τις ιδιαιτερότητες της καλλιέργειας ειδών του γένους *Ganoderma* είναι ότι οι καρποφορίες δεν εμφανίζονται κατά κύματα (flushes) όπως στα υπόλοιπα είδη, αλλά παράγονται συνεχόμενα μετά τον πλήρη αποικισμό μέχρι και την πλήρη εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος. Ως εκ τούτου η συνολική απόδοση υπολογίστηκε από το άθροισμα του βάρους των μανιταριών που συγκομίστηκαν σε διάστημα 5 μηνών. Η επώαση διήρκησε 25 – 33 ημέρες για τα περισσότερα υποστρώματα και μόνο για το *G. lucidum* απαιτήθηκε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα υποστρώματα BS και BS:OLPR 3:1 (43 ημέρες). Αντίθετα η εμφάνιση των πρώτων μανιταριών παρουσίασε μεγάλη διακύμανση μεταξύ των υποστρωμάτων κυμαινόμενη από 34 έως και 116 ημέρες από τον εμβολιασμό. Γενικά, η προσθήκη TPOMW στο υπόστρωμα καθυστέρησε την εμφάνιση σχηματισμού μανιταριών, ενώ δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα (BS) και των μιγμάτων BS:OLPR και για τα δύο είδη (Πίνακας 2.6.2). Παρόμοια αύξηση στην διάρκεια που απαιτείται για τον σχηματισμό των πρώτων καρποφοριών σε υποστρώματα που περιέχουν υπολείμματα ελαιουργίας και ελαιοκομίας, έχει παρατηρηθεί σε πολλά καλλιεργούμενα είδη, όπως τα *Cyclocybe cylindracea* (Κεφάλαιο 2.4), *Hericium erinaceus* (Κεφάλαιο 2.5) και είδη του γένους *Pleurotus* (Κεφάλαιο 2.3, Zervakis et al., 2013).



Εικόνα 2.6.2. Καρποφορίες σε πλήρη ανάπτυξη του στελέχους *G. lucidum* LGAM 9720 σε υποστρώματα αποτελούμενα από κλαδέματα ελιάς και πριονίδι οξιάς (BS:OLPR 1:1)

Όσον αφορά την παραγωγήμανιταριών *G. lingzhi* στα υποστρώματα που εξετάστηκαν, τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα καταγράφηκαν στο BS και δεν διέφεραν σημαντικά από αυτά που περιείχαν ΤΡΟΜΩ. Ομοίως, η βιολογική αποδοτικότητα στα παραπάνω υποστρώματα εμφάνισε σχεδόν όμοιες τιμές (32 – 34 %). Αντίθετα πολύ μεγαλύτερη απόδοση σημειώθηκε στο συμβατικό υπόστρωμα (BS) για το είδος *G. lucidum* συγκριτικά με τα υπόλοιπα και η βιολογική αποδοτικότητα διέφερε σημαντικά με αυτά που περιείχαν παραπροϊόντα ελαιοκομίας (61% έναντι 4 – 40% στα υπόλοιπα).

Η εμπορική παραγωγή των μανιταριών *Ganoderma* επιτυγχάνεται κυρίως σε εμπλουτισμένα υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδι πλατύφυλλων δέντρων αλλά και σε αρκετά ακόμη λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα όπως το άχυρο σιτηρών, οι σπάδικες καλαμποκιού και το κέλυφος βαμβακόσπορου (Li et al., 2016, Xia et al., 2003, Zhou et al., 2012). Ωστόσο, η αξιοποίηση εναλλακτικών υποστρωμάτων δύναται να οδηγήσει σε αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας. Για παράδειγμα, τιμές βιολογικής αποδοτικότητας μέχρι και 75%, καταγράφηκαν στο *G. lucidum* όταν αναπτύχθηκε σε άχυρο καλαμποκιού εμπλουτισμένο με άλευρα σίτου και αραβόσιτου ή σε υπολείμματα καλλιέργειας σόγιας (Ji et al., 2001). Επιπλέον, τα συγκεκριμένα υποστρώματα αυξάνουν την περιεκτικότητα των μανιταριών σε πολυσακχαρίτες και φαίνεται να αναβαθμίζουν την αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και κυτοτοξική ικανότητα σε σχέση με όσα αναπτύσσονται σε συμβατικά υποστρώματα (Ji et al., 2001).

Πίνακας 2.6.2. Καλλιεργητικοί παράμετροι μανιταριών *G. lingzhi* και *G. lucidum* σε έξι υποστρώματα ανάπτυξης αποτελούμενα από πριονίδια οξιάς (BS) κλαδέματα ελιάς (OLPR) και αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) ως έχουν ή σε μείγματα μεταξύ τους. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n = 4$ , Τα πεζά γράμματα στους εκθέτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων και τα κεφαλαία μεταξύ των δύο ειδών που εξετάστηκαν.

Παράμετροι	Είδη	Υποστρώματα					
		BS	BS:OLPR 3:1	BS:OLPR 1:1	BS:OLPR 1:3	BS:TPOMW 3:1	BS:TPOMW 1:1
Διάρκεια επώασης (ημέρες)	<i>G. lingzhi</i>	31,14 $\pm$ 1,93 <sup>Ba</sup>	32,00 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	32,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	32,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	25,00 $\pm$ 0,00 <sup>Bb</sup>	25,67 $\pm$ 0,67 <sup>Ab</sup>
	<i>G. lucidum</i>	43,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	43,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	26,33 $\pm$ 0,67 <sup>Bc</sup>	31,25 $\pm$ 0,63 <sup>Ab</sup>	33,00 $\pm$ 1,16 <sup>Ab</sup>	26,33 $\pm$ 0,67 <sup>Ac</sup>
Πρωιμότητα (ημέρες)	<i>G. lingzhi</i>	61,67 $\pm$ 17,18 <sup>Aab</sup>	35,50 $\pm$ 0,50 <sup>Bb</sup>	36,50 $\pm$ 0,50 <sup>Bb</sup>	34,25 $\pm$ 0,25 <sup>Bb</sup>	116,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	116,00 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>
	<i>G. lucidum</i>	45,75 $\pm$ 0,25 <sup>Ab</sup>	45,00 $\pm$ 3,68 <sup>Ab</sup>	52,75 $\pm$ 4,50 <sup>Aab</sup>	63,67 $\pm$ 15,50 <sup>Aab</sup>	77,00 $\pm$ 18,54 <sup>Aa</sup>	83,50 $\pm$ 19,50 <sup>Aa</sup>
Συνολική απόδοσης (g)	<i>G. lingzhi</i>	166,81 $\pm$ 29,07 <sup>Ba</sup>	82,31 $\pm$ 12,02 <sup>Bb</sup>	73,21 $\pm$ 2,51 <sup>Ab</sup>	63,88 $\pm$ 3,76 <sup>Ab</sup>	95,39 $\pm$ 21,6 <sup>Aab</sup>	101,60 $\pm$ 10,84 <sup>Aab</sup>
	<i>G. lucidum</i>	275,22 $\pm$ 14,48 <sup>Aa</sup>	193,42 $\pm$ 13,52 <sup>Ab</sup>	61,46 $\pm$ 10,84 <sup>Ac</sup>	19,10 $\pm$ 8,32 <sup>Bd</sup>	36,10 $\pm$ 14,47 <sup>Bcd</sup>	61,46 $\pm$ 10,84 <sup>Ac</sup>
Βιολογική αποδοτικότητα (%)	<i>G. lingzhi</i>	32,53 $\pm$ 10,28 <sup>Ba</sup>	17,13 $\pm$ 2,50 <sup>Bb</sup>	12,85 $\pm$ 0,44 <sup>Ab</sup>	11,84 $\pm$ 0,70 <sup>Ab</sup>	31,84 $\pm$ 7,21 <sup>Aa</sup>	33,92 $\pm$ 3,62 <sup>Aa</sup>
	<i>G. lucidum</i>	61,24 $\pm$ 3,22 <sup>Aa</sup>	40,24 $\pm$ 2,81 <sup>Ab</sup>	20,52 $\pm$ 3,62 <sup>Ac</sup>	4,54 $\pm$ 1,97 <sup>Bd</sup>	12,05 $\pm$ 4,83 <sup>Bcd</sup>	20,52 $\pm$ 3,62 <sup>Ac</sup>

#### 2.6.3.4 Αξιολόγηση της σύστασης των μανιταριών

Όπως έχει αναφερθεί και στα προηγούμενα Κεφάλαια, η χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων, εκτός από τις καλλιεργητικές παραμέτρους, επηρεάζει σημαντικά και τη σύσταση των παραγόμενων μανιταριών. Στην περίπτωση των μανιταριών *G. lingzhi* και *G. lucidum* μελετήθηκε τόσο η βασική σύσταση των καρποφοριών όσο και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται σε όλες τις παραμέτρους με εξαίρεση τα ολικά λιπίδια (Πίνακας 2.6.3). Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη TPOMW στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση της περιεχόμενης τέφρας και των ολικών πρωτεϊνών στα μανιτάρια, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε ανόργανα στοιχεία - συμπεριλαμβανομένου του αζώτου- και τη συνεπακόλουθη απορρόφηση τους από τα μανιτάρια. Αντίθετα, η ανάμιξη του βασικού υποστρώματος (BS) με OLPR δεν διαφοροποίησε σημαντικά την περιεκτικότητα των μανιταριών με εξαίρεση το BS:OLPR 1:3 για το είδος *G. lucidum* στο οποίο μετρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές τέφρας (5,2%) και ολικών πρωτεϊνών (23,3%). Τα ολικά λιπίδια κυμάνθηκαν από 1,07 έως 1,60% στο *G. lingzhi* και από 1,10 έως 2,45% στο *G. lucidum*, ενώ οι τιμές των ολικών ινωδών συστατικών ήταν 59 - 69% και 21 - 62% αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ινωδών μετρήθηκαν στα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα BS:OLPR 3:1 και για τα δύο είδη.

Στα μεθανολικά εκχυλίσματα των μανιταριών του γένους *Ganoderma* ανιχνεύτηκαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές φαινολικών συστατικών (1,91 - 4,23 mg GAE g<sup>-1</sup> d.w), αλλά και αντιοξειδωτικής ικανότητας (ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών: 1,90 - 10,41 mmol ισοδύναμα Trolox ανά g ξ.β. και μείωση αντιοξειδωτικού δυναμικού: 3,19 - 18,90 mmol ισοδύναμα Trolox ανά g ξ.β.). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η παρουσία στο υπόστρωμα υπολειμμάτων κλαδέματος ελιάς επέφερε σημαντική αύξηση τόσο στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο όσο και στην αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ η προσθήκη TPOMW δεν διαφοροποίησε σημαντικά τις παραπάνω παραμέτρους (Πίνακας 2.6.3).

Σε αντιστοιχία με την παρούσα εργασία, η αντικατάσταση του συμβατικού υποστρώματος (πριονίδι δρυός) από άχυρο σίτου αποδείχθηκε ότι συνέβαλε στην αύξηση της αντιοξειδωτικής, κυτοτοξικής και αντιμικροβικής ικανότητας του τελικού προϊόντος (Cilerdžić et al., 2014).



Πίνακας 2.6.3. Αποτελέσματα αναλύσεων για τον προσδιορισμό της βασικής σύστασης, της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων μανιταριών *G. lingzhi* και *G. lucidum* που παρήχθησαν σε υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδια οξιάς (BS) υπολείμματα κλαδέματος ελιάς (OLPR) και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) ως έχουν ή σε μείγματα μεταξύ τους. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n = 4$ . Τα πεζά γράμματα στους εκθέτες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων και τα κεφαλαία μεταξύ των δύο ειδών που εξετάστηκαν.

Συστατικά	Είδη	Υποστρώματα					
		BS	BS:OLPR 3:1	BS:OLPR 1:1	BS:OLPR 1:3	BS:TPOMW 3:1	BS:TPOMW 1:1
Τέφρα (% ξ.β.)	<i>G. lingzhi</i>	1,75 $\pm$ 0,10 <sup>bcB</sup>	1,49 $\pm$ 0,03 <sup>CB</sup>	2,20 $\pm$ 0,07 <sup>abB</sup>	1,87 $\pm$ 0,14 <sup>abcB</sup>	2,61 $\pm$ 0,14 <sup>AB</sup>	2,65 $\pm$ 0,45 <sup>abcB</sup>
	<i>G. lucidum</i>	3,10 $\pm$ 0,08 <sup>CA</sup>	3,08 $\pm$ 0,12 <sup>CA</sup>	3,41 $\pm$ 0,33 <sup>CA</sup>	5,20 $\pm$ 0,32 <sup>AA</sup>	3,68 $\pm$ 0,07 <sup>bcA</sup>	4,26 $\pm$ 0,18 <sup>BA</sup>
Ολικά ινώδη συστατικά (% ξ.β.)	<i>G. lingzhi</i>	58,51 $\pm$ 1,15 <sup>CA</sup>	69,42 $\pm$ 1,34 <sup>aA</sup>	65,78 $\pm$ 1,13 <sup>abA</sup>	66,10 $\pm$ 0,54 <sup>aA</sup>	62,23 $\pm$ 1,24 <sup>BA</sup>	67,20 $\pm$ 1,94 <sup>aA</sup>
	<i>G. luc idum</i>	47,93 $\pm$ 1,86 <sup>bB</sup>	62,48 $\pm$ 1,18 <sup>aB</sup>	43,80 $\pm$ 2,02 <sup>bB</sup>	21,57 $\pm$ 9,66 <sup>CB</sup>	52,89 $\pm$ 3,77 <sup>abA</sup>	49,34 $\pm$ 1,56 <sup>bB</sup>
Ολικά λιπαρά (% ξ.β.)	<i>G. lingzhi</i>	1,12 $\pm$ 0,16 <sup>aB</sup>	1,37 $\pm$ 0,21 <sup>aB</sup>	1,37 $\pm$ 0,21 <sup>aA</sup>	1,30 $\pm$ 0,11 <sup>aA</sup>	1,60 $\pm$ 0,14 <sup>aA</sup>	1,07 $\pm$ 0,04 <sup>aA</sup>
	<i>G. luc idum</i>	2,21 $\pm$ 0,08 <sup>aA</sup>	2,45 $\pm$ 0,05 <sup>aA</sup>	2,03 $\pm$ 0,49 <sup>aA</sup>	2,04 $\pm$ 0,50 <sup>aA</sup>	1,56 $\pm$ 0,52 <sup>aA</sup>	1,10 $\pm$ 0,12 <sup>aA</sup>
Ολικές πρωτεΐνες (% ξ.β.)	<i>G. lingzhi</i>	9,34 $\pm$ 0,62 <sup>bB</sup>	8,10 $\pm$ 0,24 <sup>bB</sup>	8,21 $\pm$ 0,22 <sup>bB</sup>	8,63 $\pm$ 0,58 <sup>bA</sup>	15,04 $\pm$ 0,37 <sup>aB</sup>	13,99 $\pm$ 2,34 <sup>aB</sup>
	<i>G. luc idum</i>	16,84 $\pm$ 0,62 <sup>bcA</sup>	17,06 $\pm$ 0,15 <sup>bcA</sup>	15,28 $\pm$ 0,55 <sup>CA</sup>	23,25 $\pm$ 4,08 <sup>abcA</sup>	18,85 $\pm$ 0,55 <sup>abA</sup>	22,21 $\pm$ 0,79 <sup>aA</sup>
Ολικοί υδατάνθρακες(% ξ.β.)	<i>G. lingzhi</i>	29,28 $\pm$ 2,24 <sup>aA</sup>	19,61 $\pm$ 0,97 <sup>bA</sup>	22,44 $\pm$ 1,54 <sup>bB</sup>	22,10 $\pm$ 2,01 <sup>bB</sup>	18,52 $\pm$ 0,78 <sup>bcA</sup>	15,08 $\pm$ 0,82 <sup>CB</sup>
	<i>G. luc idum</i>	29,93 $\pm$ 1,05 <sup>bA</sup>	14,93 $\pm$ 2,07 <sup>dB</sup>	35,48 $\pm$ 3,47 <sup>bA</sup>	47,95 $\pm$ 3,29 <sup>aA</sup>	23,03 $\pm$ 1,85 <sup>CA</sup>	23,10 $\pm$ 1,38 <sup>CA</sup>
Ενέργεια (kcal 100 g <sup>-1</sup> d.w.)	<i>G. lingzhi</i>	165 $\pm$ 7 <sup>aB</sup>	123 $\pm$ 2 <sup>CA</sup>	135 $\pm$ 4 <sup>bcB</sup>	135 $\pm$ 8 <sup>bB</sup>	149 $\pm$ 2 <sup>bB</sup>	126 $\pm$ 5 <sup>CB</sup>
	<i>G. luc idum</i>	207 $\pm$ 13 <sup>bA</sup>	150 $\pm$ 17 <sup>CA</sup>	221 $\pm$ 4 <sup>bA</sup>	303 $\pm$ 11 <sup>aA</sup>	182 $\pm$ 2 <sup>bcA</sup>	191 $\pm$ 3 <sup>bcA</sup>
Ολικά φαινολικά (mg GAE g <sup>-1</sup> d.w)	<i>G. lingzhi</i>	2,05 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	3,09 $\pm$ 0,35 <sup>aA</sup>	2,73 $\pm$ 0,27 <sup>abA</sup>	2,57 $\pm$ 0,27 <sup>abB</sup>	2,77 $\pm$ 0,24 <sup>abA</sup>	1,91 $\pm$ 0,72 <sup>bA</sup>
	<i>G. luc idum</i>	3,25 $\pm$ 0,09 <sup>bA</sup>	4,23 $\pm$ 0,27 <sup>aA</sup>	3,89 $\pm$ 1,15 <sup>abA</sup>	4,02 $\pm$ 0,51 <sup>aA</sup>	2,98 $\pm$ 0,31 <sup>bA</sup>	2,99 $\pm$ 0,32 <sup>bA</sup>
Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (mmol TE g <sup>-1</sup> d.w)	<i>G. lingzhi</i>	2,52 $\pm$ 0,25 <sup>CB</sup>	3,83 $\pm$ 0,23 <sup>bB</sup>	2,81 $\pm$ 0,47 <sup>CB</sup>	5,62 $\pm$ 0,66 <sup>aB</sup>	1,90 $\pm$ 0,08 <sup>dB</sup>	1,99 $\pm$ 0,24 <sup>dB</sup>
	<i>G. luc idum</i>	8,49 $\pm$ 1,32 <sup>aA</sup>	9,56 $\pm$ 0,41 <sup>aA</sup>	8,46 $\pm$ 1,05 <sup>aA</sup>	10,41 $\pm$ 1,37 <sup>aA</sup>	7,18 $\pm$ 2,78 <sup>aA</sup>	6,37 $\pm$ 0,72 <sup>aA</sup>
Μείωση αντιοξειδωτικού δυναμικού (mmol TE g <sup>-1</sup> d.w)	<i>G. lingzhi</i>	5,89 $\pm$ 1,88 <sup>ab</sup>	6,64 $\pm$ 1,34 <sup>ab</sup>	6,39 $\pm$ 2,39 <sup>ab</sup>	5,58 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup>	3,67 $\pm$ 0,27 <sup>bB</sup>	3,19 $\pm$ 0,05 <sup>bB</sup>
	<i>G. luc idum</i>	12,99 $\pm$ 1,95 <sup>bA</sup>	13,96 $\pm$ 0,41 <sup>bA</sup>	18,90 $\pm$ 0,89 <sup>aA</sup>	13,76 $\pm$ 4,88 <sup>abA</sup>	12,93 $\pm$ 3,82 <sup>bA</sup>	13,26 $\pm$ 3,93 <sup>bA</sup>

Τέλος, θετική συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας ( $r = 0,54$  μεταξύ TPC και AAR και  $r = 0,43$  μεταξύ TPC και FRAP) ενισχύοντας την άποψη ότι τα φαινολικά συστατικά αποτελούν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Παρόμοια συσχέτιση εξάλλου έχει αναφερθεί μεταξύ των προαναφερθέντων παραμέτρων σε αυτοφυή μανιτάρια *G. lucidum* (Modi et al., 2014) ή σε μανιτάρια καλλιεργούμενα σε ροκανίδι του δέντρου *Artocarpus heterophyllus* (Rani et al., 2015), όπως και σε άλλα είδη του ίδιου γένους όπως τα *G. applanatum* και *G. resinaceum* (Zengin et al., 2015).

Μεταξύ των δύο ειδών, το *Ganoderma lucidum* περιείχε σχεδόν διπλάσια ποσότητα τέφρας και πρωτεϊνών, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν έως και τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα μανιτάρια *G. lingzhi*, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για προϊόν με πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και δυνατότητες εκμετάλλευσης στη φαρμακευτική βιομηχανία. Αναλύσεις της βασικής σύστασης των μανιταριών *G. lucidum* στο πρόσφατο παρελθόν αναφέρουν παρόμοιες τιμές για τα κύρια συστατικά, τόσο σε αυτοφυή μανιτάρια όσο και σε καλλιεργούμενα (Khan et al., 2009, Nhi and Hung, 2012, Shamaki et al., 2012).

### 2.6.3.5 Προσδιορισμός πρεβιοτικών ιδιοτήτων μυκητιακής βιομάζας

Το αυξημένο ενδιαφέρον των σύγχρονων καταναλωτών για την επίδραση της διατροφής στην υγεία έχει σαν αποτέλεσμα την συνεχή ανάπτυξη διαφόρων λειτουργικών τροφίμων. Οι σύγχρονες διατροφικές τάσεις έχουν οδηγήσει σε σημαντική ανάπτυξη των πρεβιοτικών τροφίμων, τα οποία είναι σε θέση να διαμορφώσουν την εντερική μικροχλωρίδα και κατά συνέπεια να βελτιώσουν την ανθρώπινη υγεία. Για περισσότερο από μια δεκαετία, η ινουλίνη και οι ολιγοσακχαρίτες αποτέλεσαν τα περισσότερο εδραιωμένα και καλύτερα μελετημένα πρεβιοτικά. Ωστόσο, η καλύτερη κατανόηση της χρησιμότητας τους προκάλεσε την ανάγκη για εύρεση νέων πηγών πρεβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των μυκητιακών. Ένα από τα κριτήρια για να διαπιστωθεί εάν κάποιο υλικό εμφανίζει πρεβιοτικές ιδιότητες είναι η αξιολόγηση του ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη γνωστών πρεβιοτικών μικροοργανισμών.

Στην ενότητα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της πρεβιοτικής δράσης στελεχών *Ganoderma* αλλά και εδώδιμων μανιταριών που είχαν μελετηθεί σε προηγούμενα Κεφάλαια και συμπεριλήφθηκαν για να αποκτηθεί πληρέστερη εικόνα ως προς τις συγκεκριμένες ιδιότητες τους. Το υπό εξέταση υλικό χρησιμοποιήθηκε ως

η μοναδική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των κοινών προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *Bifidobacterium bifidum* και *B. longum*. Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση του μυκηλίου των ειδών *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma lucidum* και *Pleurotus ostreatus* για την ανάπτυξη του *L. acidophilus*. Το ίδιο βακτήριο χρησιμοποιήθηκε και για την αξιολόγηση των πρεβιοτικών ιδιοτήτων μανιταριών τα οποία προέκυψαν από τα πειράματα καλλιέργειας που ήδη περιγράφηκαν (για τα είδη *C. cylindracea*, *H. erinaceus*, *G. lingzhi*, *G. lucidum* και *P. ostreatus*), τα δε αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές που προήλθαν από την εξέταση του μυκηλίου τους. Τέλος, καρποφορίες των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus* που παρήχθησαν σε διάφορα υποστρώματα μελετήθηκαν όσον αφορά στις πρεβιοτικές ιδιότητες τους καθώς αποτέλεσαν τη μοναδική πηγή άνθρακα σε καλλιέργειες τεσσάρων ειδών βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *B. bifidum* και *B. longum*).

#### 2.6.3.5.1 Ανάπτυξη του *Lactobacillus acidophilus* σε θρεπτικό υλικό με προσθήκη λυοφιλωμένου μυκηλίου

Η ανάπτυξη του *L. acidophilus* αρχικά μελετήθηκε σε υποστρώματα των οποίων τη μοναδική πηγή άνθρακα αποτελούσαν μυκήλια των ειδών *G. lingzhi* και *G. lucidum* και συγκρίθηκαν με το μυκήλιο του στελέχους *P. ostreatus* LGAM 1123. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.6.4 ο πληθυσμός την στιγμή του εμβολιασμού δεν διέφερε μεταξύ του μάρτυρα και των τριών ειδών που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Μετά από 24 ώρες επώασης σημειώθηκε σημαντική αύξηση των βακτηριακών πληθυσμών σε όλες τις επεμβάσεις και δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με εξαίρεση το στέλεχος *G. lingzhi* LGAM 7400 στο οποίο ο πληθυσμός δεν έδειξε σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή τη χρονική στιγμή T0. Ο πληθυσμός της ίδιας καλλιέργειας δεν μεταβλήθηκε ούτε μετά από 48 ώρες επώασης, υποδεικνύοντας ότι υλικό από το συγκεκριμένο μανιτάρι δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *L. acidophilus*. Αυτό, μπορεί να οφείλεται τόσο στη χαμηλή περιεκτικότητα σε γλουκάνες συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη ή/και στην παρουσία συστατικών τα οποία δρουν τοξικά για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Στις καλλιέργειες του μάρτυρα παρουσιάστηκε μείωση του πληθυσμού στις 48 ώρες με πιο έντονη αυτή που σημειώθηκε στο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε γλυκόζη, ενώ αντίθετα αυξήθηκε ο βακτηριακός πληθυσμός στις επεμβάσεις που περιείχαν τα μυκήλια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus* (Πίνακας 2.6.4). Αξιοσημείωτη είναι η ανάπτυξη στο *G. lucidum*,

στο οποίο ο πληθυσμός διέφερε σημαντικά τόσο από το μάρτυρα όσο και από άλλα δύο είδη που εξετάστηκαν (8,57 έναντι 5,44 - 7,95 στις υπόλοιπες επεμβάσεις).

Πίνακας 2.6.4. Πληθυσμοί του *Lactobacillus acidophilus* σε υποστρώματα MRS στα οποία είχε προστεθεί λυοφιλωμένο μυκήλιο (0,1g), των ειδών *G. lingzhi*, *G. lucidum* και *P. ostreatus* κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 (T24) και 48 (T48) ώρες. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση των βακτηριακών πληθυσμών ( $\log_{10}$ CFU/ml) και τα πεζά γράμματα στους εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test) μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Τα \* υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 24 ωρών και τα \* στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24 και 48 ωρών.

Είδος	Στέλεχος	T0	T24	T48
	Μάρτυρας	5,48 $\pm$ 0,24 <sup>a*</sup>	7,37 $\pm$ 0,06 <sup>a*</sup>	6,63 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
	Μάρτυρας χωρίς γλυκόζη	5,46 $\pm$ 0,23 <sup>a*</sup>	7,27 $\pm$ 0,12 <sup>a*</sup>	5,44 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
	<i>Ganoderma lingzhi</i> LGAM7400	5,01 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	5,36 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	5,39 $\pm$ 0,21 <sup>bc</sup>
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM9720	5,15 $\pm$ 0,08 <sup>a*</sup>	6,91 $\pm$ 0,27 <sup>a*</sup>	8,57 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	<i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM1123	5,05 $\pm$ 0,05 <sup>a*</sup>	7,09 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	7,95 $\pm$ 0,59 <sup>abc</sup>

#### 2.6.3.5.2 Αξιολόγηση πρεβιοτικών ιδιοτήτων καρποφοριών εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών

Σε συνέχεια των προηγούμενων δοκιμών, αξιολογήθηκε η ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υπόστρωμα το οποίο περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα λυοφιλωμένα μανιτάρια από έξι επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων τα οποία προήλθαν από τα πειράματα καλλιέργειας που περιγράφηκαν στο παρόν και σε προηγούμενα Κεφάλαια (*C. cylindracea*, *G. lingzhi*, *G. lucidum*, *H. erinaceus* και *P. ostreatus*). Σκοπός του πειράματος ήταν ο προσδιορισμός των πρεβιοτικών ιδιοτήτων των καρποφοριών και η διερεύνηση των διαφορών τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών όσο και μεταξύ υλικού που παραλήφθηκε από καρποφορίες και μυκήλια.

Συγκρίνοντας τους αντίστοιχους πληθυσμούς του *L. acidophilus* σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την ανάπτυξη του σε καλλιέργειες σε υγρά μέσα, διαπιστώνεται αύξηση έπειτα από 24 και 48 ώρες αναερόβιας επώασης. Οι περισσότερες καλλιέργειες εμφάνισαν τον μέγιστο αριθμό αποικιών 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό (6,91 έως 8,35  $\log_{10}$ CFU/ml) με εξαίρεση την περίπτωση του στελέχους *P. ostreatus* 1123 στην οποία η μέγιστη τιμή εμφανίστηκε μετά από 48 ώρες (Πίνακας 2.6.5). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις 24 ώρες οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με μοναδική πηγή άνθρακα τις λυοφιλωμένες καρποφορίες αυξήθηκαν περισσότερο από τον μάρτυρα, χωρίς να εμφανίζουν πάντα στατιστικά σημαντικές διαφορές (με εξαίρεση το *H. erinaceus*). Επιπλέον, 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό όλες οι καλλιέργειες εμφάνισαν υψηλότερους πληθυσμούς από το μάρτυρα,

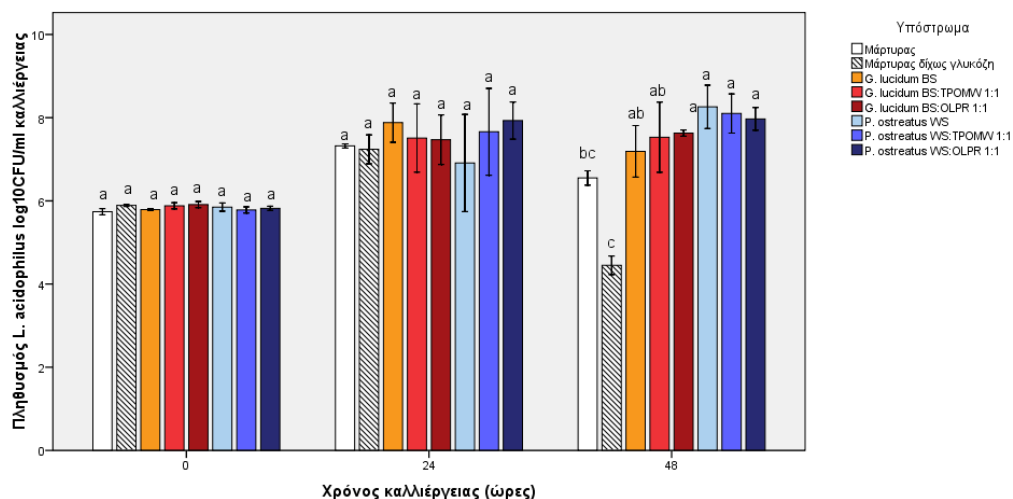
(εκτός από το *G. lingzhi*) με πιο αξιοσημείωτες αυτές του *P. ostreatus* και *C. cylindracea* (8.15 – 8.26 log<sub>10</sub>CFU/ml). Τέλος, σε όλες τις επεμβάσεις, εκτός από αυτές που περιείχαν λυοφιλωμένα μανιτάρια *C. cylindracea* ή *G. lingzhi*, παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές του πληθυσμού μεταξύ των χρονικών στιγμών T0 και T48.

**Πίνακας 2.6.5.** Πληθυσμοί του *Lactobacillus acidophilus* σε υποστρώματα MRS στα οποία είχαν προστεθεί λυοφιλωμένες καρποφορίες (0,1g) πέντε ειδών βασιδιομυκήτων κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 (T24) και 48 (T48) ώρες. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση των βακτηριακών πληθυσμών (log<sub>10</sub>CFU/ml) και τα πεζά γράμματα στους εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test) μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Το σύμβολο (\*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 24 ωρών και το σύμβολο (\*\*) στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24 και 48 ωρών.

Είδος	Στέλεχος	T0	T24	T48
Μάρτυρας		5,56±0,19 <sup>a+*</sup>	7,36±0,04 <sup>bcdx</sup>	6,59±0,06 <sup>bc</sup>
Μάρτυρας χωρίς γλυκόζη		5,89±0,01 <sup>a+*</sup>	7,24±0,14 <sup>cdx</sup>	4,45±0,09 <sup>d</sup>
<i>Ganoderma lingzhi</i>	LGAM7400	5,62±0,16 <sup>a+</sup>	7,82±0,03 <sup>abx</sup>	6,58±0,20 <sup>c</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	LGAM9720	5,79±0,01 <sup>a+*</sup>	7,88±0,19 <sup>abc</sup>	7,19±0,25 <sup>abc</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	LGAM1123	5,85±0,04 <sup>*</sup>	6,91±0,47 <sup>abc</sup>	8,26±0,21 <sup>ab</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	LGAM67	5,68±0,20 <sup>+*</sup>	8,35±0,15 <sup>abx</sup>	8,15±0,11 <sup>a</sup>
<i>Cyclocybe cylindracea</i>	LGAM 446	5,74±0,20 <sup>a+*</sup>	8,33±0,38 <sup>ab</sup>	8,24±0,47 <sup>abcd</sup>
<i>Hericium erinaceus</i>	LGAM 4514	5,87±0,04 <sup>a+*</sup>	8,13±0,06 <sup>a</sup>	7,59±0,33 <sup>abc</sup>

Για τα στελέχη των οποίων μελετήθηκαν τόσο οι καρποφορίες όσο και το μυκήλιο προερχόμενο από ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό διάλυμα, παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά όσον αφορά την επίδραση τους στην ανάπτυξη του *L. acidophilus*. Για παράδειγμα αποδείχθηκε και στις δύο περιπτώσεις η υπεροχή των *G. lucidum* και *P. ostreatus* έναντι του *G. lingzhi* όπως επίσης και η αύξηση του πληθυσμού του βακτηρίου από τις 24 στις 48 ώρες όταν καλλιεργήθηκε με μοναδική πηγή άνθρακα υλικό που προέρχεται από το *P. ostreatus* LGAM 1123. Επιπλέον, ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών αυξήθηκε σημαντικά από την T24 έως την T48 όταν χρησιμοποιήθηκε μυκήλιο του *G. lucidum*, ενώ δεν συνέβη το ίδιο στην δοκιμή που πραγματοποιήθηκε με καρποφορίες του παραπάνω στελέχους. Συμπερασματικά προκύπτει ότι το *L. acidophilus* δύναται να χρησιμοποιήσει ως πηγή άνθρακα τις καρποφορίες των πέντε ειδών που μελετήθηκαν εμφανίζοντας υψηλότερες τιμές από αυτές που παρουσιάστηκαν στο υπόστρωμα MRS. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο μέγιστος πληθυσμός των βακτηρίων μετρήθηκε την χρονική στιγμή T24, υποδηλώνοντας ότι η πηγή άνθρακα είναι άμεσα διαθέσιμη για το *L. acidophilus* ασχέτως υποστρώματος. Επιπλέον, η μεγαλύτερη αύξηση των πληθυσμών σε υποστρώματα από μανιτάρια σε σχέση με τον μάρτυρα μετά την πάροδο 48 ωρών, υποδεικνύουν ότι οι καρποφορίες καλύπτουν τις ανάγκες του βακτηρίου σε οργανικές ενώσεις για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με το συμβατικό υπόστρωμα MRS. Τέλος, μεταξύ των

διαφορετικών ειδών μανιταριών που εξετάστηκαν, οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί τη χρονική στιγμή T48 εντοπίστηκαν στις καρποφορίες των ειδών *C. cylindracea* και *P. ostreatus*, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά από το *G. lucidum* και *H. erinaceus*.



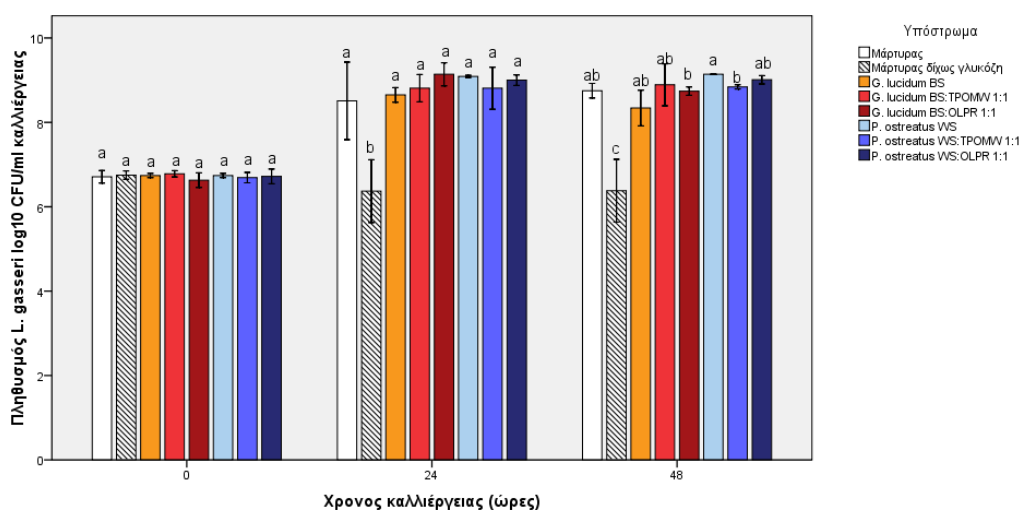
**Γράφημα 2.6.2.** Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus acidophilus*, κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48 ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους των βακτηριακών πληθυσμών (log<sub>10</sub>CFU/ml) και οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκτενέστερη μελέτη των πρεβιοτικών ιδιοτήτων των μανιταριών με την συμμετοχή τεσσάρων ειδών προβιοτικών βακτηρίων ώστε να αποκλειστούν τυχόν ιδιαιτερότητες του είδους *L. acidophilus* και να αποκτηθεί μια πιο ολοκληρωμένη σχετική εικόνα. Παράλληλα, ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη τους χρησιμοποιήθηκαν καρποφορίες των στελεχών *G. lucidum* LGAM9720 και *P. ostreatus* LGAM1123, οι οποίες παρήχθησαν τόσο σε συμβατικό υπόστρωμα (πριονίδι και άχυρο σίτου αντίστοιχα) όσο και σε υποστρώματα που περιείχαν απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου (TROMW) ή κλαδέματα ελιάς (OLPR) σε αναλογία 1:1 w/w με το κυρίως υλικό. Με αυτό τον τρόπο διερευνήθηκε εάν η διαφοροποίηση του υποστρώματος μεταβάλλει εκτός από την βασική σύσταση των μανιταριών (όπως αποδείχθηκε στα προηγούμενα Κεφάλαια) και την πρεβιοτική δράση των παραγόμενων καρποφοριών.

Αρχικά μελετήθηκε η μεταβολή του πληθυσμού του *L. acidophilus* σε θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε λυοφιλιωμένα μανιτάρια *G. lucidum* και *P. ostreatus* που είχαν αναπτυχθεί σε τρία διαφορετικά υποστρώματα (Παράγραφος 2.6.3.3). Σύμφωνα με τις μετρήσεις του πληθυσμού των βακτηρίων σημειώθηκε σημαντική αύξηση κατά τις πρώτες 24 ώρες για όλα

τα υποστρώματα χωρίς να εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τον μάρτυρα. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση του πληθυσμού στο *P. ostreatus* ανεξαρτήτως υποστρώματος αλλά και στο *G. lucidum* για το BS:OLPR 1:1 οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον μάρτυρα μετά από 48 ώρες (Γράφημα 2.6.2 και Πίνακας Π6, Παράρτημα).

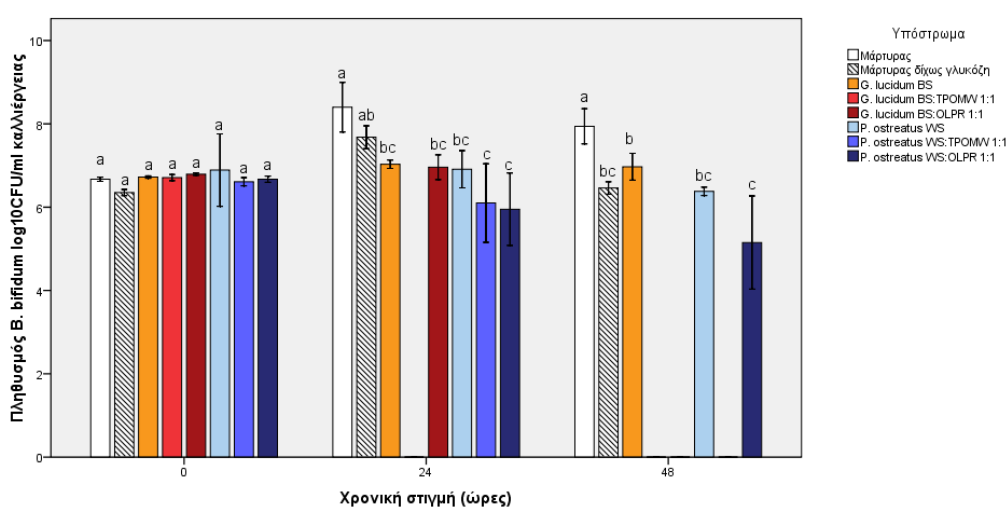
Στην περίπτωση του *L. gasseri*, η αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου MRS με λυοφιλωμένα μανιτάρια δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα αποδεικνύοντας τις ισχυρές πρεβιοτικές ιδιότητες των δύο μανιταριών που εξετάστηκαν. Χαρακτηριστικό είναι ότι 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό παρατηρήθηκαν ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές στα μανιτάρια (8,65 – 9,14  $\log_{10}$ CFU/ml) σε σχέση με τον μάρτυρα (8,51  $\log_{10}$ CFU/ml), ενώ όπως και στην περίπτωση του *L. acidophilus* το *P. ostreatus* έδωσε πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα συγκριτικά με το *G. lucidum* (Γράφημα 2.6.3 και Πίνακας Π7, Παράρτημα).



Γράφημα 2.6.3. Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus gasseri* κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48) ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους των βακτηριακών πληθυσμών ( $\log_{10}$ CFU/ml) και οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο.

Το *Bifidobacterium bifidum* δοκιμάστηκε για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ως δείκτης της πρεβιοτικής δράσης μανιταριών. Σε προκαταρκτικές δοκιμές για τη διερεύνηση των συνθηκών που απαιτούνται για την ανάπτυξη του, διαπιστώθηκαν εκτεταμένες επιμολύνσεις του θρεπτικού υλικού από βακτήρια (κυρίως Gram +) οι οποίες πιθανόν να προέρχονταν από τις καρποφορίες των βασιδιομυκήτων. Για το λόγο αυτό προστέθηκε τόσο στο υγρό θρεπτικό μέσο όσο και στα τριβλία καταμέτρησης του πληθυσμού

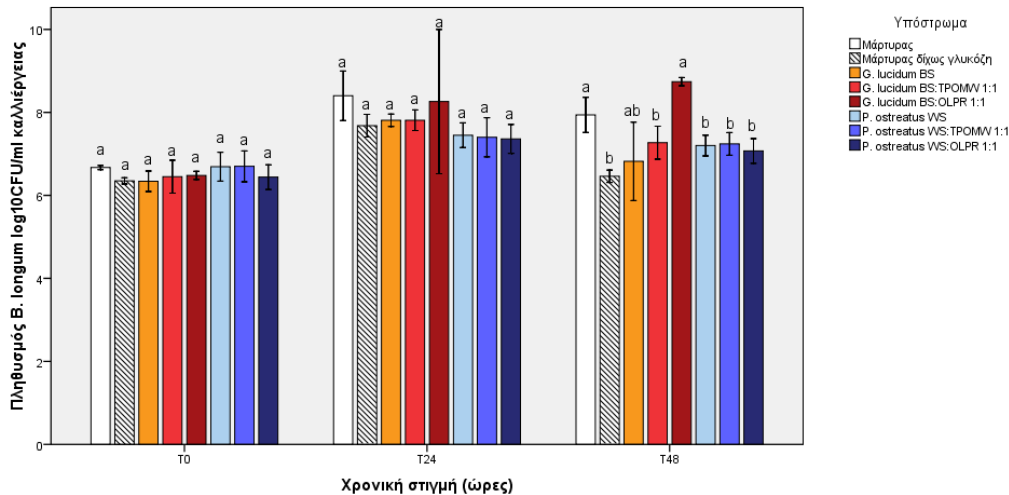
το αντιβιοτικό gentamicin (4mg/l), αφού πρώτα διαπιστώθηκε ότι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του *B. bifidum*. Με εξαίρεση τις καρποφορίες του *G. lucidum* το οποίο αναπτύχθηκε στο υπόστρωμα BS και φάνηκε να ευνοεί την ανάπτυξη του βακτηρίου, σε όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα που περιείχαν λυοφιλιωμένο υλικό από τα μανιτάρια ο πληθυσμός του *B. bifidum* ή παρέμεινε σταθερός είτε μειώθηκε, ακόμη και σε επίπεδα που ήταν αδύνατη η καταμέτρηση του (Γράφημα 2.6.4 και Πίνακας Π8, Παράρτημα). Η σημαντική ανάπτυξη του *B. bifidum* στο θρεπτικό υλικό MRS σε σχέση με τα μανιτάρια που δοκιμάστηκαν υποδεικνύει ότι οι καρποφορίες των δύο βασιδιομυκήτων δεν αποτελούν κατάλληλο μέσο για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.



**Γράφημα 2.6.4.** Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Bifidobacterium bifidum* κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48 ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους των βακτηριακών πληθυσμών (log<sub>10</sub>CFU/ml) και οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο.

Αναφορικά με τον έλεγχο της ανάπτυξης του *B. longum* στα ίδια δείγματα μανιταριών, η σημαντική αύξηση κατά τις πρώτες 24 ώρες επώασης αποδεικνύει ότι μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του με ρυθμό παρόμοιο με αυτόν του μάρτυρα (δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές), ενώ δεν σημειώθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ειδών μανιταριών μετά από παρέλευση 48 ωρών. Εξαίρεση αποτελεί το *G. lucidum* που καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα BS:OLPR 1:1, στο οποίο μετρήθηκε ο μεγαλύτερος βακτηριακός πληθυσμός συγκρινόμενος τόσο με τις υπόλοιπες επεμβάσεις όσο και με τον μάρτυρα (Γράφημα 2.6.5 και Πίνακας Π9, Παράρτημα).





**Γράφημα 2.6.5.** Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Bifidobacterium bifidum* κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48 ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέσους όρους των βακτηριακών πληθυσμών (log<sub>10</sub>CFU/ml) και οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο.

Μέχρι σήμερα ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων εστιάζει στη μελέτη της πρεβιοτικής δράσης των μανιταριών και στις περισσότερες από αυτές εξετάζεται η *in vitro* επίδραση καθαρών μυκητιακών πολυσακχαριτών και όχι η επίδραση ολόκληρης της καρποφορίας. Στην παρούσα εργασία αρχικά διερευνήθηκε η πιθανή πρεβιοτική δράση εδώδιμων-φαρμακευτικών βασιδιομυκήτων και αποδείχθηκε ότι ορισμένα από αυτά προάγουν περισσότερο την αύξηση των αποικιών του *L. acidophilus* σε σχέση με το συμβατικό θρεπτικό μέσο MRS. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη χρήση μανιταριών, σύμφωνα με τα οποία ο βακτηριακός πληθυσμός μεγιστοποιήθηκε έπειτα από 24 ώρες επώασης με εξαίρεση το *P. ostreatus* LGAM 1123, το οποίο δεν συμβάλει εξίσου στην ανάπτυξη του *L. acidophilus*. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι η προσθήκη ελαιοκομικών και ελαιουργικών υπολειμμάτων στο υπόστρωμα, εκτός από τη βασική σύσταση των μανιταριών, επηρεάζει και τις πρεβιοτικές ιδιότητες τους. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα, η χρήση TPOMW και OLPR στην καλλιέργεια του *G. lucidum* επηρεάζει σημαντικά τις πρεβιοτικές ιδιότητες των παραγόμενων μανιταριών όπως αποδείχθηκε με την ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*.

Στην πρώτη *in vitro* μελέτη στην οποία εξετάστηκε η πιθανή πρεβιοτική δράση εκχυλίσματος πολυσακχαριτών των μανιταριών *P. ostreatus* και *P. eryngii* δοκιμάστηκαν είδη

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* αλλά και *Enterococcus* και διαπιστώθηκε ότι τα δύο είδη μανιταριών προήγαγαν την ανάπτυξη διαφορετικών στελεχών του εντερικού μικροβιώματος (Sghytsya et al., 2009). Επιπροσθέτως, αναφέρθηκε ότι οι πολυσακχαρίτες του *P. ostreatus* αύξησαν σημαντικά τον πληθυσμό βακτηρίων *Lactobacillus*, κάτι που παρατηρήθηκε και με τη χρήση λυοφιλιωμένου υλικού προερχόμενου από ολόκληρες καρποφορίες -ανεξαρτήτου υποστρώματος ανάπτυξης- στην παρούσα έρευνα. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που προέκυψαν στην παρούσα εργασία όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης των *Lactobacillus brevis* και *Bifidobacterium longum* σημειώνονται από τους Gao et al. (2009) όταν καλλιεργήθηκαν παρουσία β-γλουκανών από σκληρώτια των ειδών *Poria cocos* και *Polyporus rhinoceros*. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι οι πολυσακχαρίτες του *P. cocos* έδρασαν ανασταλτικά στην ανάπτυξη του παθογόνου του εντέρου *Clostridium celatus*. Οι Yamin et al. (2012) χρησιμοποίησαν τρία είδη *Bifidobacterium* για τον προσδιορισμό της πρεβιοτικής δράσης υδατικών εκχυλισμάτων και καθαρών πολυσακχαριτών από *Ganoderma lucidum* και απέδειξαν ότι ο μέγιστος πληθυσμός εμφανίζεται μετά από 18 ώρες επώασης, ενώ μείωση του βακτηριακού πληθυσμού παρατηρείται μετά την πάροδο 24 ωρών. Αντίστοιχα αποτελέσματα παραλήφθηκαν για το *B. longum* στην παρούσα εργασία, του οποίου ο πληθυσμός ενώ αυξήθηκε στα υποστρώματα του *G. lucidum* τις πρώτες 24 ώρες της επώασης, μειώθηκε σημαντικά μετά το πέρας 48 ωρών. Η μικρή διάρκεια του θετικού ρυθμού ανάπτυξης οφείλεται στην παρουσία απλών σακχάρων τα οποία αποδομούνται γρήγορα από τα βακτήρια (Yamin et al., 2012).

Επιπλέον, συνεργιστική δράση των πολυσακχαριτών στην ανάπτυξη διάφορων προβιοτικών μικροοργανισμών έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές. Για παράδειγμα, τριών ειδών πολυσακχαρίτες προερχόμενοι από μανιτάρια *Agaricus blazei* μελετήθηκαν ως προς την επίδραση τους σε βακτήρια γαλακτικού οξέος και αποδείχθηκε ότι ο συνδυασμός δύο ειδών πολυσακχαριτών έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από την χρήση του καθενός ξεχωριστά, προάγοντας την παραγωγή γαλακτικού οξέος από το *Lactobacillus acidophilus* (Lili and Jianchun, 2008). Ακόμη οι Chou et al. (2013) μελέτησαν την πρεβιοτική δράση μείγματος *L. edodes*, *P. eryngii* και *F. velutipes* και έδειξαν ότι αυξάνει σημαντικά τον ρυθμό επιβίωσης των προβιοτικών σε συνθήκες ψυχρής συντήρησης.

## 2.6.4 Συμπεράσματα

Τα είδη *G. lingzhi* και *G. lucidum* αναπτυσσόμενα σε καλλιέργειες αποτελούμενες από ΥΑΕ ανέπτυξαν σημαντική ποσότητα αξιοποιήσιμης μυκηλιακής βιομάζας και ταυτόχρονα μείωσαν σημαντικά το ρυπαντικό φορτίο του αποβλήτου. Επιπλέον σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης, υποστρώματα που περιείχαν κλαδέματα ελιάς ή απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου υποστήριξαν ικανοποιητικές αποδόσεις σε μανιτάρια, τα οποία περιείχαν αυξημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών, φαινολικών και αντιοξειδωτικών συστατικών συγκρινόμενα με αυτά που παρήχθησαν στο συμβατικό υπόστρωμα (πριονίδια οξιάς). Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να αποτελέσουν την αρχή για περαιτέρω έρευνα, ώστε να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία καλλιέργειας των μυκήτων του γένους *Ganoderma* και να παραχθεί μυκηλιακή βιομάζα αναβαθμισμένης σύστασης με την ταυτόχρονη αξιοποίηση των ιδιαίτερα επιβαρυντικών για το περιβάλλον υπολειμμάτων της ελαιοκομικής και ελαιουργικής δραστηριότητας.

Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, συμπεραίνεται ότι το μυκήλιο και οι καρποφορίες βασιδιομυκήτων διαθέτουν πρεβιοτικές ιδιότητες οι οποίες διαφοροποιούνται τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών όσο και μεταξύ του τύπου του βιολογικού υλικού (καρποφορίες ή μυκήλιο) που χρησιμοποιείται. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι το υπόστρωμα καλλιέργειας εκτός από την διατροφική σύσταση των μανιταριών επηρεάζει σημαντικά και τις πρεβιοτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Μανιτάρια *P. ostreatus* και *G. lucidum* τα οποία αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας, ενώ δεν μετέβαλαν τον τελικό αριθμό των αποικιών στα είδη *L. gasseri* και *B. bifidum*, είχαν θετική επίδραση στην ανάπτυξη των *L. acidophilus* και *B. longum*. Γενικά, φαίνεται πως τα μανιτάρια ή πολυσακχαρίτες που προέρχονται από αυτά ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη των προβιοτικών ειδών *Lactobacillus acidophilus* και *L. gasseri* σε σχέση με είδη *Bifidobacterium*. Τέλος, η σημασία της ισορροπίας στο εντερικό μικροβίωμα και η συσχέτισή της με την εμφάνιση πλήθους ασθενειών σε συνδυασμό με τον πολλαπλό λειτουργικό ρόλο των πολυσακχαριτών, αποκαλύπτει ότι η κατανάλωση μανιταριών και σκευασμάτων που περιέχουν πολυσακχαρίτες βασιδιομυκήτων μπορεί να συμβάλει σημαντικά τόσο στην πρόληψη όσο και στην αντιμετώπιση ασθενειών.



---

# Κεφάλαιο 2.7

---

**Αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων  
ελαιοτριβείου με τη χρήση  
βασιδιομυκήτων**

## 2.7.1 Εισαγωγή

Στα προηγούμενα Κεφάλαια μελετήθηκε η επίδραση της χρήσης εναλλακτικών υποστρωμάτων τόσο στις καλλιεργητικές αποδόσεις όσο και στη σύσταση του τελικού προϊόντος για επιλεγμένα είδη καλλιεργούμενων μανιταριών. Η σχετική έρευνα επικεντρώθηκε μεταξύ άλλων στην προσθήκη ή και στην αντικατάσταση του συμβατικού υποστρώματος από παραπροϊόντα οινοποιίας, ελαιοκομίας και ελαιουργίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η βιομετατροπή των εν λόγω υποστρωμάτων σε μυκητιακή βιομάζα έχει σαν αποτέλεσμα τόσο τη διατροφική αναβάθμιση των μανιταριών όσο και την μερική αποτοξικοποίηση του χρησιμοποιημένου υποστρώματος.

Στα πειράματα που ακολουθούν εξετάζεται η χρήση ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων, συμπεριλαμβανομένων και εδώδιμων ή φαρμακευτικών ειδών, ως εργαλεία για την αποτοξικοποίηση και την αξιοποίηση υγρών και στερεών αποβλήτων-παραπροϊόντων ελαιοτριβείων.

Οι στόχοι των πειραματικών εργασιών που υλοποιήθηκαν στα πλαίσια του Κεφαλαίου 2.7 ήταν η συγκριτική αξιολόγηση μεγάλου αριθμού βασιδιομυκήτων για την επεξεργασία ΥΑΕ και η δημιουργία μιας δεξαμενής στελεχών τα οποία θα μπορούσαν να συμβάλουν αποτελεσματικά στη διαχείριση των ΥΑΕ. Η διαδικασία αξιολογήθηκε μέσω του προσδιορισμού της ενεργότητας λιγνολυτικών ενζύμων από τους μύκητες σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και της συσχέτισης τους με τη μείωση του χρώματος, του φαινολικού φορτίου και της φυτοτοξικότητας.

## 2.7.2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.7.2.1 Βιολογικό υλικό

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 60 στελέχη τα οποία προέρχονται από απομονώσεις αυτοφυών μανιταριών και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στη συλλογή καθαρών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας. Τα παραπάνω στελέχη ταξινομούνται σε 43 είδη. Η προέλευση και το υπόστρωμα από το οποίο απομονώθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7.1.

**Πίνακας 2.7.1. Είδη και στελέχη βασιδιομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκριτική αξιολόγηση της αποδόμησης ΥΑΕ (γεωγραφική προέλευση, υπόστρωμα αρχικής απομόνωσης και κωδικός με τον οποίο είναι κατατεθειμένα στη Συλλογή Καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, ΓΠΑ).**

Είδος	Προέλευση, υπόστρωμα	Κωδικός	Είδος	Προέλευση, υπόστρωμα	Κωδικός
<i>Abortiporus biennis</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	ABC521	<i>Perenniporia fraxinea</i>	Ελλάδα, <i>Populus alba</i>	PFL346
<i>Abortiporus biennis</i>	Ελλάδα	ABL436	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ελλάδα	PHL322
<i>Cyclocybe cylindracea</i>	Κίνα	ACL834	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	PHC571
<i>Auricularia mesenterica</i>	Ελλάδα, <i>Cupressus sp.</i>	AML472	<i>Pholiota nameko</i>	Εμπορικό στέλεχος	PNS806
<i>Corioloopsis trogii</i>	Ελλάδα, <i>Quercus sp.</i>	CTL447	<i>Pleurotus abieticola</i>	Ρωσία	PAC854
<i>Daedalea quercina</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	DQC528	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Μαλαισία	PCC884
<i>Dichomitus squalens</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	DSC750	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Ιράν	PCL660
<i>Fistulina hepatica</i>	Ελλάδα, <i>Castanea sativa</i>	FHL295	<i>Pleurotus cystidiosus</i>	ΗΠΑ, <i>Populus deltoides</i>	PCC897
<i>Flammulina velutipes</i>	Εμπορικό στέλεχος	FVS803	<i>Pleurotus cystidiosus subsp.abalonus</i>	Κίνα	PAC891
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Ελλάδα, <i>Abies cephalonica</i>	FPL302	<i>Pleurotus djamor</i>	Μαλαισία	PDC855
<i>Ganoderma adspersum</i>	Ελλάδα, <i>Abies cephalonica</i>	GAL401	<i>Pleurotus eryngii</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	PEC847
<i>Ganoderma carnosum</i>	Ελλάδα	GCL642	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	Ελλάδα, <i>Eryngium sp.</i>	PEL063
<i>Ganoderma carnosum</i>	Ελλάδα, <i>Olea sativa</i>	GCL448	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	Ιταλία, <i>Eryngium campestre</i>	PEC810
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	Ελλάδα, <i>Fagus sylvatica</i>	GPL336	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>tuoliensis</i>	Κίνα	PEC856
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Ελλάδα, <i>Morus alba</i>	GRL334	<i>Pleurotus flabellatus</i>	Μαλαισία	PFC860
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Ελλάδα, <i>Salix babylonica</i>	GRL403	<i>Pleurotus nebrodensis</i>	Ελλάδα, <i>Prangos ferulacea</i>	PNL126
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	GRC604	<i>Pleurotus nebrodensis</i>	Ιταλία, <i>Prangos ferulacea</i>	PNC816
<i>Grifola frondosa</i>	Εμπορικό στέλεχος	GRC805	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ιταλία	POC847
<i>Hapalopilus croceus</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	HCC522	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	POC843
<i>Hericium erinaceus</i>	Ελλάδα	HEL801	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ελλάδα, <i>Abies cephalonica</i>	POL067
<i>Hericium erinaceus</i>	Ελλάδα, <i>Quercus pubescens</i>	HEL802	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Ελλάδα, <i>Fagus sylvatica</i>	PPL111
<i>Heterobasidion annosum</i>	Ελλάδα, <i>Abies cephalonica</i>	HAL340	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Γαλλία	PPC823
<i>Hypsizygus ulmarius</i>	Ελλάδα, <i>Abies cephalonica</i>	HUL417	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Χονγκ Κονγκ	PSC757
<i>Inocutis tamaricis</i>	Ελλάδα, <i>Tamarix hampeana</i>	ITL314	<i>Pleurotus tuber-regium</i>	Παπούα – Νέα Γουινέα	PTC822
<i>Irpex lacteus</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	ILC238	<i>Stereum hirsutum</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	SHC608
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Ελλάδα, <i>Castanea sativa</i>	LSL331	<i>Trametes hirsuta</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	THC610
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Ελλάδα, <i>Castanea sativa</i>	LSL332	<i>Trametes ljubarskyi</i>	Ελλάδα, <i>Populus sp</i>	TLL473
<i>Lentinula edodes</i>	Εμπορικό στέλεχος	LES812	<i>Trametes versicolor</i>	Ελλάδα	TVL469
<i>Neolentinus lepideus</i>	Ελλάδα, <i>Pinus nigra</i>	NLL317	<i>Trametes versicolor</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	TVC614
<i>Omphalotus illudens</i>	Ελλάδα, <i>Quercus sp.</i>	OIL347	<i>Tyromyces lacteus</i>	Δημοκρατία της Τσεχίας	TLC616

### 2.7.2.2 Εκτίμηση της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης 60 στελεχών ξυλοσηπτικών μυκήτων και του ρυθμού ανάπτυξης σε YAE

Οι δοκιμές για την εκτίμηση της βέλτιστης θερμοκρασίας για την μυκηλιακή αύξηση έλαβαν χώρα σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato dextrose agar, Conda) για το θερμοκρασιακό εύρος 12 – 47 °C κυμαινόμενο ανά 5 °C. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία Petri και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.4.2.4. Οι μετρήσεις της αύξησης του μυκηλίου λαμβάνονταν ανά 24h για όλα τα είδη με εξαίρεση τα *Phanerochaete chrysosporium* και *Hapalopilus croceus* για τα οποία πραγματοποιούνταν μετρήσεις ανά 12 ώρες. Τουλάχιστον 7 μετρήσεις ελήφθησαν για το κάθε στέλεχος.

Μετά τον υπολογισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης, κάθε στέλεχος εξετάστηκε ως προς την ικανότητα του να αναπτύσσεται σε διάφορες συγκεντρώσεις YAE (25%, 50% και 100% v/v με νερό). Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης στα πραναφερθέντα υποστρώματα στη βέλτιστη θερμοκρασία για το κάθε στέλεχος. Επιπλέον, συμπεριλήφθηκε ως μάρτυρας θρεπτικό υλικό PDA.

### 2.7.2.3 Αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης των YAE με επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων

Με βάση τα αποτελέσματα της προηγούμενης αξιολόγησης, οκτώ στελέχη (*Abortiporus biennis* ABL436, *Ganoderma carnosum* GCL448, *Hapalopilus croceus* HCC522, *Hericium erinaceus* HEL801, *Irpex lacteus* ILC238, *Phanerochaete chrysosporium* PHL322, *Pleurotus djamor* PDC855 και *P. pulmonarius* PPL111) προκρίθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση της βιοαποδόμησης-αποτοξικοποίησης των YAE. Για την αξιολόγηση της διαδικασίας βιοαποδόμησης προετοιμάστηκαν θρεπτικά υλικά όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.5.1.12 σε αναλογίες 12,5, 25 και 50% YAE με νερό. Κάθε πειραματική μονάδα αποτελούνταν από φιάλες Erlenmeyer 250 ml οι οποίες περιείχαν 100 ml από τα παραπάνω διαλύματα. Για την ανάπτυξη των εμβολίων ο μύκητας αναπτύχθηκε σε YAE 25% v/v στερεοποιημένο με άγαρ (1,7%) και δισκία διαμέτρου 6mm από την περιφέρεια της αποικίας χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια. Κάθε επέμβαση περιελάμβανε 4 επαναλήψεις ενώ συμπεριλήφθηκαν και 4 πειραματικές μονάδες που περιείχαν ως υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar, 39 g/l).

Για τις ανάγκες του πειράματος υιοθετήθηκε η μέθοδος καταστροφής των δειγμάτων κάθε τέσσερις, πέντε ή έξι ημέρες (ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης του κάθε στελέχους)



για συνολικό χρονικό διάστημα 20, 25 και 30 ημερών αντίστοιχα και προσδιορίστηκε ο αποχρωματισμός, η μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών και της φυτοτοξικότητας καθώς και οι μεταβολές του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στην Παράγραφο 2.5.2.2. Επιπλέον μετρήθηκε η ενεργότητα των λιγνολυτικών ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση του Mn (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP) (Παράγραφος 2.4.2.7). Τέλος, εξετάστηκε η τυχόν συσχέτιση της παραγωγής λιγνολυτικών ενζύμων με τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου.

#### 2.7.2.4 Επίδραση του βαθμού αραίωσης, της θερμικής προεπεξεργασίας του υποστρώματος και της προσθήκης ανόργανου αζώτου, χαλκού και μαγγανίου στη διαδικασία αποτοξικοποίησης ΥΑΕ με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων

Τα ΥΑΕ παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια στη σύσταση τους ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες στην εξαγωγή του ελαιόλαδου σε κάθε ελαιοτριβείο, την εποχή συλλογής και τις καιρικές συνθήκες καθώς και την ποικιλίας της ελιάς (Ntougias et al., 2013). Για το λόγο αυτό, κρίνεται ιδιαίτερα δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων στα οποία χρησιμοποιήθηκε διαφορετικής προέλευσης ΥΑΕ. Ως εκ τούτου, για τις παρακάτω δοκιμές χρησιμοποιήθηκε ίδιας σύστασης ΥΑΕ το οποίο συντηρήθηκε στους -20 °C μέχρι την έναρξη του πειράματος.

Σε αντίθεση με το πρώτο μέρος των πειραμάτων (Κεφάλαιο 2.7.2.3), κατά το οποίο οι καλλιέργειες των μυκήτων σε υγρά μέσα πραγματοποιούνταν χωρίς ανάδευση, σε όλα τα επόμενα στάδια εξετάστηκαν καλλιέργειες υπό ανάδευση (100 rpm) για τον καλύτερο αερισμό και κατ' επέκταση την ταχύτερη μυκηλιακή αύξηση. Αρχικά ελέγχθηκε η επίδραση της αραίωσης του ΥΑΕ στην ανάπτυξη των μυκήτων και τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου σε συνδυασμό με την παραγωγή τριών λιγνολυτικών ενζύμων. Τα τρία επιλεγμένα στελέχη (*A. biennis*, *I. lacteus* και *Ph. chrysosporium*) αναπτύχθηκαν σε ΥΑΕ χωρίς αραίωση ή σε αραιωμένα με νερό σε αναλογία 1:3 (25% ΥΑΕ) και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες (χωρητικότητας 250 ml) οι οποίες περιείχαν 100 ml υποστρώματος. Μετά την αποστείρωση (40 min, 121 °C, 1,1 atm) ακολούθησε εμβολιασμός με ένα κυκλικό δισκίο διαμέτρου 1 cm προερχόμενο από την περιφέρεια αναπτυσσόμενης αποικίας σε στερεοποιημένο ΥΑΕ. Η ανάπτυξη έγινε στους 32 °C για το *Ph. chrysosporium* και στους 27 °C για τα άλλα δύο στελέχη. Επιπλέον, μη εμβολιασμένα υποστρώματα

διατηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες και αποτέλεσαν το μάρτυρα. Η επώαση διήρκησε συνολικά 25 ημέρες και ακολουθήθηκε η δειγματοληψία καταστροφής ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της μυκηλιακής βιομάζας κάθε 5 ημέρες.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικής θερμικής κατεργασίας του υποστρώματος. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκαν οι διαφορές στις ρυπαντικές παραμέτρους του ΥΑΕ μετά την αποστείρωση (121 °C, 1,1 atm) ή την παστερίωση του (40 °C για 6h ή 60 °C για 2h) και τη χρήση του ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων. Στην πειραματική διαδικασία συμπεριλήφθηκαν τα ίδια τρία στελέχη (*A. biennis*, *I. lacteus* και *Ph. chrysosporium*), ενώ η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε υπό ανακίνηση (100rpm) και σε σταθερή θερμοκρασία (27 °C για τα *A. biennis* και *I. lacteus* και 32 °C για το *Ph. chrysosporium*). Η συνολική διάρκεια της επώασης ήταν 35 ημέρες, ενώ κάθε μια εβδομάδα (7 ημέρες) λαμβάνονταν δείγματα για τον προσδιορισμό των ρυπαντικών παραγόντων και της ενζυμικής δραστηριότητας. Επιπλέον τα τρία είδη καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο malt extract ώστε να συγκριθεί η παραγόμενη βιομάζα.

Για τη μελέτη της επίδρασης της προσθήκης ανόργανου αζώτου καθώς και των μετάλλων Mn και Cu, επιλέχθηκαν τα είδη *A. biennis* και *Ph. chrysosporium*, τα οποία έδειξαν τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αποτοξικοποίηση ΥΑΕ από τα στελέχη που μελετήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα. Η προσθήκη αζώτου στο διάλυμα, έγινε μέσω τη μορφή νιτρικού αμμωνίου (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) σε συγκεντρώσεις 0,2 / 0,4 / 0,8 / 1,6 και 3,2 g/l. Για τον εμπλουτισμό των μετάλλων, χρησιμοποιήθηκαν τα άλατα CuSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) και MnSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) και επιπλέον δοκιμάστηκαν και μείγματα αυτών με συγκεντρώσεις 0,2 mg/l έκαστο, ή 0,4 mg/l MnSO<sub>4</sub> και 0,2 mg/l CuSO<sub>4</sub>. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με καλλιέργειες στις οποίες δεν είχε γίνει κανένας επιπλέον εμπλουτισμός. Οι πειραματικές μονάδες και οι συνθήκες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας διατηρήθηκαν όπως στο προηγούμενο πείραμα .

Με βάση τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων πειραμάτων, σχεδιάστηκε η διερεύνηση της επίδρασης υψηλότερων συγκεντρώσεων των δύο μετάλλων (4 και 16 mg/l) με την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου μέσω της προσθήκης NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (σε συγκεντρώσεις 0,2, 0,8 και 3,2 g/l). Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκε διαφορετικής προέλευσης ΥΑΕ σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα και ως εκ τούτου δεν είναι δόκιμη η απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων, ενώ στις δοκιμές συμπεριλήφθηκε μόνο το είδος *A. biennis*. Οι υπόλοιποι παράμετροι της καλλιέργειας ρυθμίστηκαν όπως περιγράφονται στα προηγούμενα κεφάλαια. Λόγω της πολύ υψηλής συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών

συστατικών στο αρχικό απόβλητο (7383 mg GAE / l) πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:3 με νερό (ΥΑΕ 25%). Κάθε επεμβάση περιελάμβανε 4 πειραματικές μονάδες (100 ml η κάθε μία) και οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστήρα (100 rpm) και σε θερμοκρασία 27°C. Οι επεμβάσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7.2. Το πείραμα διήρκεσε συνολικά 35 ημέρες και δείγματα λαμβάνονταν κάθε 7 ημέρες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών, του χρώματος και της ενεργότητας των ενζύμων Lac, MnP και MnIP.

**Πίνακας 2.7.2. Κωδικοποίηση και περιεχόμενο επεμβάσεων που προετοιμάστηκαν για τη δοκιμή διαχείρισης ΥΑΕ με τη χρήση του μύκητα *A. biennis*.**

Επεμβάσεις α/α	Υπόστρωμα (25% v/v ΥΑΕ)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (g/L)	CuSO <sub>4</sub> + MnSO <sub>4</sub> (mg/L)
Μάρτυρας	Απουσία του μύκητα	0	0
1	Παρουσία του μύκητα	0	0
2			4
3			16
4		0,2	0
5			4
6			16
7		0,8	0
8			4
9			16
10		3,2	0
11			4
12			16

#### 2.7.2.5 Χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Abortiporus biennis* στην επεξεργασία ακατέργαστων ΥΑΕ

Από κάθε μια από τις επεμβάσεις του προηγούμενου πειράματος, κάθε επτά ημέρες παραλαμβάνονταν υγρό από το μέσο καλλιέργειας του μύκητα *Abortiporus biennis* το οποίο χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τον εμβολιασμό του μη επεξεργασμένου αποβλήτου (αραιωμένο με νερό σε αναλογία 1:3). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν 10 ml αποβλήτου και έγινε προσθήκη 0,2 και 1 ml υγρού από το μέσο καλλιέργειας (αναλογίες 2 και 10%, v/v) που είχε προκύψει από τα πειράματα της προηγούμενης ενότητας (2.7.5.5). Οι πειραματικές μονάδες διατηρήθηκαν για 48 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (100 rpm) στους 37 °C. Μετρήσεις της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος πραγματοποιήθηκαν κάθε 4, 24 και 48 ώρες. Σκοπός του πειράματος ήταν να διερευνηθεί εάν το υγρό μέσο της καλλιέργειας του *A. biennis* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαχείριση μη επεξεργασμένου αποβλήτου καθώς και εάν η προσθήκη

μετάλλων ( $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$ ) και αζώτου ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) επιδρούν στην παραπάνω διαδικασία. Τέλος, οι μετρήσεις σε τρεις χρονικές στιγμές εξυπηρέτησαν τη μελέτη της κινητικής της μείωσης των παραπάνω ρυπαντικών παραμέτρων (ολικών φαινολικών και χρώματος).

### 2.7.2.6 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα στους πίνακες εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση. Εξετάστηκε η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) και έγινε προσδιορισμός των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων με χρήση Duncan' *t*-test (SPSS software, version 18). Επιπλέον, ο συντελεστής συσχέτισης Pearson υπολογίστηκε από το ίδιο λογισμικό για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ διάφορων παραγόντων (σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01).

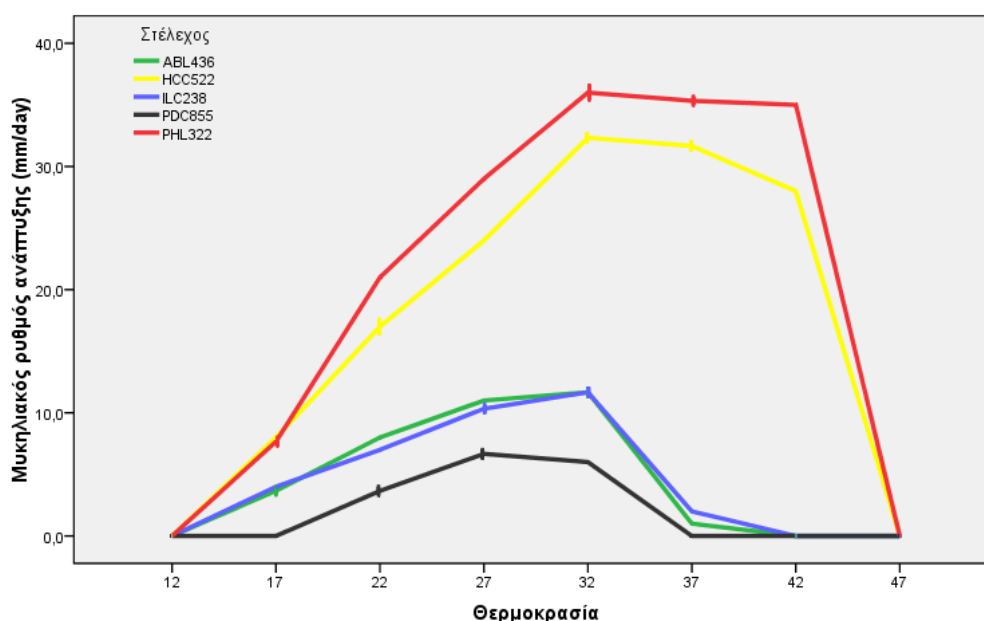
### 2.7.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 2.7.3.1 Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης των 60 ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων.

Μέχρι σήμερα λεπτομερή δεδομένα για τις βέλτιστες συνθήκες παραγωγής μυκηλιακής βιομάζας περιορίζονται σε ελάχιστα είδη μυκήτων (κυρίως αυτά που παράγουν εδώδιμα μανιτάρια). Ειδικότερα η επίδραση της θερμοκρασίας είναι θεμελιώδους σημασίας για την αξιολόγηση του βιοτεχνολογικού δυναμικού των οργανισμών αυτών (Zervakis et al., 2001, Zervakis end Balis, 1996) και ως εκ τούτου αποτέλεσε την πρώτη παράμετρο που μελετήθηκε για τα υπό εξέταση στελέχη. Τα αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης της γραμμικής ταχύτητας αύξησης κάλυψαν το θερμοκρασιακό εύρος από 12 έως 47 °C και μετρήσεις λαμβάνονταν ανά 5 °C. Για τα περισσότερα στελέχη η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης εντοπίζεται μεταξύ 27 – 32 °C (Πίνακας 2.7.3). Μόνο στα είδη *Hypsizygus ulmarius*, *Omphalotus illudens*, *Pholiota nameko* και *Pleurotus nebrodensis* παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη ταχύτητα αύξησης στους 22 °C. Αντίθετα το στέλεχος *Phanerochaete chrysosporium* ήταν το μόνο στο οποίο η βέλτιστη ανάπτυξη σημειώθηκε στους 37 °C.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης, ότι σχεδόν όλα τα στελέχη *Pleurotus* έδειξαν έστω και περιορισμένη ανάπτυξη στους 12 °C και ήταν το μοναδικό γένος μεταξύ των 28 που εξετάστηκαν στο οποία εμφανίστηκε η συγκεκριμένη ιδιότητα. Από την άλλη τα είδη *Haralopilus croceus* και *Phanerochaete chrysosporium* ήταν τα μοναδικά τα οποία

αναπτύχθηκαν στο ανώτερο θερμοκρασιακό όριο (42 °C). Επιπλέον, ο ρυθμός της μυκηλιακής αύξησης των περισσότερων στελεχών, παρουσίασε βαθμιαία αύξηση από τις χαμηλές θερμοκρασίες έως τη βέλτιστη και στη συνέχεια απότομη πτώση έως τη θερμοκρασία που δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη. Πιο έντονο ήταν το παραπάνω φαινόμενο στα στελέχη που επέδειξαν πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης (Γράφημα 2.7.1)



Γράφημα 2.7.1. Γραμμική ταχύτητα αύξησης (mm day<sup>-1</sup>) σε PDA μετρημένη σε διαφορετικές θερμοκρασίες για τα επιλεγμένα στελέχη *A. biennis* ABL436, *H. croceus* HCC522, *I. lacteus* ILC238, *P. djamor* PDC855 και *Ph. chrysosporium* PHL322.

Πίνακας 2.7.3. Γραμμική ταχύτητα αύξησης (mm day<sup>-1</sup>) για 60 στελέχη βασιδιομυκήτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες (από 12 έως και 47 °C, μετρήσεις λαμβάνονταν ανά 5 °C) Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση, n = 3. Τα γράμματα στους εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ διαφορετικών θερμοκρασιών για κάθε στέλεχος. Τα στελέχη αναφέρονται με τους κωδικούς που χρησιμοποιήθηκαν στον Πίνακα 2.7.1

Στέλεχος	12	17	22	27	32	37	42	47
ABC521	Δ.Α.	4,06±0,04 <sup>d</sup>	7,46±0,07 <sup>c</sup>	11,47±0,07 <sup>a</sup>	10,17±0,07 <sup>b</sup>	1,47±0,07 <sup>e</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
ABL436	Δ.Α.	4,10±0,18 <sup>d</sup>	8,03±0,03 <sup>c</sup>	11,30±0,08 <sup>b</sup>	12,19±0,29 <sup>a</sup>	1,39±0,08 <sup>e</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
ACL834	Δ.Α.	1,64±0,04 <sup>c</sup>	3,12±0,13 <sup>b</sup>	4,02±0,10 <sup>a</sup>	3,06±0,08 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
AML472	Δ.Α.	Δ.Α.	6,24±0,17 <sup>b</sup>	6,97±0,30 <sup>a</sup>	5,62±0,29 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
CTL447	Δ.Α.	2,60±0,08 <sup>e</sup>	4,64±0,15 <sup>d</sup>	6,51±0,13 <sup>c</sup>	8,98±0,15 <sup>a</sup>	7,29±0,02 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
DQC528	Δ.Α.	3,94±0,14 <sup>e</sup>	7,03±0,22 <sup>c</sup>	7,81±0,04 <sup>b</sup>	11,14±0,17 <sup>a</sup>	4,34±0,05 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
DSC750	Δ.Α.	3,52±0,13 <sup>c</sup>	7,07±0,04 <sup>b</sup>	10,96±0,17 <sup>a</sup>	11,10±0,12 <sup>a</sup>	3,77±0,04 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
FHL295	Δ.Α.	0,78±0,02 <sup>b</sup>	2,10±0,04 <sup>a</sup>	1,91±0,23 <sup>a</sup>	0,66±0,04 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
FVS803	Δ.Α.	3,66±0,15 <sup>c</sup>	5,39±0,03 <sup>b</sup>	6,00±0,14 <sup>a</sup>	1,35±0,11 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
FPL302	Δ.Α.	2,34±0,02 <sup>d</sup>	5,55±0,02 <sup>c</sup>	7,61±0,18 <sup>b</sup>	7,94±0,10 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GAL401	Δ.Α.	0,83±0,15 <sup>d</sup>	2,68±0,35 <sup>c</sup>	6,19±0,25 <sup>b</sup>	8,76±0,23 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GCL642	Δ.Α.	3,39±0,09 <sup>d</sup>	5,95±0,14 <sup>b</sup>	7,28±0,20 <sup>a</sup>	4,21±0,21 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GLC448	Δ.Α.	1,89±0,17 <sup>d</sup>	5,18±0,15 <sup>c</sup>	8,57±0,18 <sup>a</sup>	6,93±0,10 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GPL336	Δ.Α.	1,12±0,12 <sup>c</sup>	2,64±0,01 <sup>b</sup>	4,21±0,07 <sup>a</sup>	0,45±0,05 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GRL334	Δ.Α.	2,96±0,07 <sup>c</sup>	6,26±0,10 <sup>b</sup>	8,41±0,32 <sup>a</sup>	7,99±0,14 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GRL403	Δ.Α.	2,43±0,13 <sup>d</sup>	6,43±0,06 <sup>c</sup>	8,96±0,12 <sup>a</sup>	8,29±0,17 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
GRC604	Δ.Α.	1,49±0,11 <sup>c</sup>	3,48±0,11 <sup>b</sup>	5,59±0,02 <sup>a</sup>	5,53±0,07 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.

GRS805	Δ.Α.	0,41±0,03 <sup>b</sup>	3,28±0,22 <sup>a</sup>	3,63±0,45 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
HCC522	Δ.Α.	8,93±0,03 <sup>e</sup>	17,36±0,77 <sup>d</sup>	24,61±0,47 <sup>c</sup>	32,63±0,58 <sup>a</sup>	32,41±0,47 <sup>a</sup>	28,63±0,12 <sup>b</sup>	Δ.Α.
HEL801	Δ.Α.	6,89±0,16 <sup>c</sup>	9,69±0,18 <sup>b</sup>	13,17±0,07 <sup>a</sup>	12,25±0,78 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
HEL802	Δ.Α.	0,10±0,05 <sup>b</sup>	0,43±0,06 <sup>b</sup>	1,22±0,27 <sup>a</sup>	1,46±0,11 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
HAL340	Δ.Α.	2,79±0,13 <sup>c</sup>	6,46±0,20 <sup>b</sup>	8,29±0,07 <sup>a</sup>	8,48±0,08 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
HUL417	Δ.Α.	1,03±0,13 <sup>c</sup>	2,21±0,04 <sup>a</sup>	1,49±0,31 <sup>b</sup>	0,08±0,03 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
ITL314	Δ.Α.	0,46±0,00 <sup>d</sup>	2,92±0,18 <sup>c</sup>	4,44±0,96 <sup>b</sup>	4,96±0,08 <sup>a</sup>	3,05±0,08 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
ILC238	Δ.Α.	4,20±0,06 <sup>d</sup>	7,65±0,24 <sup>c</sup>	10,83±0,24 <sup>b</sup>	12,19±0,27 <sup>a</sup>	2,51±0,10 <sup>e</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
LSL331	Δ.Α.	3,78±0,23 <sup>c</sup>	5,79±0,05 <sup>b</sup>	7,92±0,17 <sup>a</sup>	7,84±0,24 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
LSL332	Δ.Α.	1,17±0,24 <sup>d</sup>	3,53±0,16 <sup>c</sup>	5,73±0,17 <sup>b</sup>	7,84±0,28 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
LES812	Δ.Α.	1,97±0,16 <sup>b</sup>	3,07±0,16 <sup>a</sup>	2,80±0,09 <sup>a</sup>	0,44±0,05 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
NLL317	Δ.Α.	1,05±0,09 <sup>c</sup>	3,30±0,07 <sup>b</sup>	4,35±0,17 <sup>a</sup>	4,17±0,14 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
OIL347	Δ.Α.	1,60±0,06 <sup>c</sup>	3,55±0,08 <sup>a</sup>	2,85±0,13 <sup>b</sup>	1,49±0,09 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PFL346	Δ.Α.	1,37±0,10 <sup>d</sup>	3,08±0,04 <sup>c</sup>	4,95±0,13 <sup>a</sup>	3,67±0,08 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PHL322	Δ.Α.	8,18±0,23 <sup>d</sup>	21,36±0,24 <sup>c</sup>	29,28±0,20 <sup>b</sup>	36,64±0,91 <sup>a</sup>	35,94±0,66 <sup>a</sup>	35,61±0,20 <sup>a</sup>	Δ.Α.
PHC571	Δ.Α.	9,89±0,12 <sup>f</sup>	22,98±0,16 <sup>e</sup>	30,46±0,90 <sup>c</sup>	34,23±0,30 <sup>b</sup>	40,30±0,09 <sup>a</sup>	26,21±0,62 <sup>d</sup>	Δ.Α.
PNS806	Δ.Α.	2,69±0,22 <sup>c</sup>	4,39±0,29 <sup>a</sup>	3,35±0,20 <sup>b</sup>	0,26±0,09 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PAC891	0,22±0,04 <sup>b</sup>	0,34±0,01 <sup>b</sup>	1,17±0,27 <sup>a</sup>	1,47±0,31 <sup>a</sup>	0,38±0,29 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PAC854	0,10±0,02 <sup>b</sup>	0,26±0,11 <sup>b</sup>	1,02±0,23 <sup>a</sup>	0,69±0,13 <sup>a</sup>	0,09±0,05 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PCC884	0,47±0,01 <sup>c</sup>	1,58±0,07 <sup>b</sup>	2,62±0,59 <sup>ab</sup>	3,72±0,95 <sup>a</sup>	3,50±0,37 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PCL660	0,85±0,03 <sup>c</sup>	1,05±0,02 <sup>c</sup>	3,34±0,30 <sup>b</sup>	5,07±0,27 <sup>a</sup>	3,59±0,10 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PCC897	Δ.Α.	0,24±0,08 <sup>c</sup>	1,54±0,45 <sup>b</sup>	2,08±0,25 <sup>b</sup>	2,85±0,10 <sup>a</sup>	0,58±0,07 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
PDC855	0,40±0,06 <sup>c</sup>	0,90±0,08 <sup>c</sup>	4,17±0,22 <sup>b</sup>	7,09±0,60 <sup>a</sup>	6,33±0,29 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PEC847	0,22±0,02 <sup>c</sup>	0,57±0,10 <sup>c</sup>	2,72±0,33 <sup>b</sup>	4,67±0,18 <sup>a</sup>	2,85±0,01 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PEL063	Δ.Α.	0,38±0,05 <sup>d</sup>	1,60±0,00 <sup>c</sup>	2,96±0,31 <sup>a</sup>	2,51±0,20 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PEC810	0,29±0,04 <sup>c</sup>	0,70±0,07 <sup>c</sup>	2,10±0,10 <sup>b</sup>	3,15±0,37 <sup>a</sup>	2,31±0,14 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PEC856	0,60±0,04 <sup>c</sup>	1,28±0,14 <sup>b</sup>	4,16±0,43 <sup>a</sup>	4,54±0,12 <sup>a</sup>	0,41±0,11 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PFC860	0,56±0,06 <sup>b</sup>	1,02±0,11 <sup>ab</sup>	1,32±0,08 <sup>a</sup>	1,15±0,38 <sup>a</sup>	0,09±0,00 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PNL126	0,21±0,06 <sup>c</sup>	0,45±0,04 <sup>c</sup>	1,39±0,24 <sup>a</sup>	1,04±0,11 <sup>b</sup>	0,13±0,02 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PNC816	0,22±0,03 <sup>bc</sup>	0,56±0,08 <sup>b</sup>	1,12±0,42 <sup>a</sup>	0,46±0,06 <sup>b</sup>	0,03±0,02 <sup>c</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
POC843	0,77±0,31 <sup>c</sup>	2,33±0,13 <sup>bc</sup>	4,42±0,38 <sup>ab</sup>	5,89±0,20 <sup>a</sup>	4,33±0,06 <sup>ab</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
POC847	0,68±0,10 <sup>cd</sup>	1,46±0,24 <sup>bc</sup>	6,43±0,19 <sup>a</sup>	7,28±0,16 <sup>a</sup>	1,80±0,74 <sup>b</sup>	0,26±0,00 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
POL067	1,33±0,25 <sup>d</sup>	2,64±0,05 <sup>c</sup>	7,26±0,08 <sup>a</sup>	7,36±0,43 <sup>a</sup>	4,00±0,63 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PPL111	0,66±0,08 <sup>d</sup>	1,06±0,35 <sup>d</sup>	4,09±0,25 <sup>c</sup>	7,01±0,15 <sup>a</sup>	6,14±0,26 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PPC823	0,70±0,05 <sup>b</sup>	0,91±0,23 <sup>b</sup>	3,37±0,40 <sup>a</sup>	3,36±0,82 <sup>a</sup>	0,94±0,09 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PSC757	0,64±0,22 <sup>bc</sup>	1,07±0,36 <sup>ab</sup>	1,35±0,08 <sup>a</sup>	1,18±0,14 <sup>a</sup>	0,43±0,01 <sup>cd</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PTC822	0,36±0,07 <sup>c</sup>	0,54±0,10 <sup>c</sup>	1,54±0,47 <sup>b</sup>	3,35±0,50 <sup>a</sup>	2,01±0,02 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
SHC608	Δ.Α.	7,73±0,15 <sup>c</sup>	12,28±0,16 <sup>a</sup>	12,29±0,11 <sup>a</sup>	8,37±0,42 <sup>b</sup>	0,21±0,00 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
THC610	Δ.Α.	3,76±0,23 <sup>e</sup>	6,90±0,10 <sup>c</sup>	8,47±0,07 <sup>b</sup>	9,66±0,42 <sup>a</sup>	5,44±0,11 <sup>d</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
TLL473	Δ.Α.	2,17±0,06 <sup>c</sup>	4,55±0,05 <sup>d</sup>	6,55±0,10 <sup>c</sup>	8,01±0,16 <sup>a</sup>	7,47±0,05 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
TVL469	Δ.Α.	4,60±0,09 <sup>d</sup>	6,89±0,14 <sup>c</sup>	8,49±0,14 <sup>b</sup>	8,88±0,13 <sup>a</sup>	0,38±0,10 <sup>e</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
TVC614	Δ.Α.	5,39±0,49 <sup>c</sup>	10,53±0,18 <sup>a</sup>	11,24±0,23 <sup>a</sup>	10,93±0,58 <sup>a</sup>	1,52±0,16 <sup>b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
TLC616	Δ.Α.	5,55±0,17 <sup>d</sup>	8,01±0,12 <sup>c</sup>	9,29±0,06 <sup>b</sup>	10,25±0,12 <sup>a</sup>	0,48±0,02 <sup>e</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.

Δ.Α.: Δεν αναπτύχθηκε.

### 2.7.3.2 Αξιολόγηση της ανάπτυξης 60 στελεχών ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων σε ΥΑΕ

Στην επόμενη συγκριτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε, ο μυκηλιακός ρυθμός ανάπτυξης όλων των στελεχών μετρήθηκε στη βέλτιστη θερμοκρασία για το καθένα και σε τρεις διαφορετικές αραιώσεις ΥΑΕ σε νερό (25%, 50% και 100% v/v), ενώ το υπόστρωμα PDA αποτέλεσε τον μάρτυρα. Όπως αναμενόταν, ο ρυθμός ανάπτυξης στο PDA ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερος από αυτόν στα στερεοποιημένα ΥΑΕ, με μόνη εξαίρεση το *Ganoderma carnosum* GCL448 στο υπόστρωμα 25% ΥΑΕ (Πίνακας 2.7.4). Αρκετά ακόμη στελέχη παρουσίασαν ικανοποιητική ταχύτητα ανάπτυξης τόσο σε 25% όσο και σε 50% ΥΑΕ, ενώ λίγα μόνο αναπτύχθηκαν επαρκώς στο 100% ΥΑΕ. Στις αξιοσημείωτες αυτές περιπτώσεις (εκτός από το GCL448) περιλαμβάνονταν τα *Abortiporus biennis*, *Coriolopsis trogii*, *Daedalea*

*quercina*, *Ganoderma adspersum*, *G. resinaceum* (GRL344 και GRL403), *Hapalopilus croceus*, *Hericium erinaceus* (μόνο το HEL801), *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus djamor*, *P. pulmonarius*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor* και *Tyromyces lacteus*. Αντίθετα, καμία ανάπτυξη δεν παρατηρήθηκε στα *Auricularia mesenterica*, *Fistulina hepatica*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus* (μόνο για το HEL802), *Hypsizygus ulmarius*, *Laetiporus sulphureus* (μόνο για το LSL331), *Lentinula edodes*, *Pholiota nameko* και *Pleurotus abieticola*. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με παλιότερα ευρήματα στα οποία αναφέρεται υψηλή ενδοειδική παραλλακτικότητα ανάμεσα σε είδη *Pleurotus* όσον αφορά την αποδόμηση φαινολικών των ΥΑΕ (Ntougias et al., 2012) όπου οι διαφορές ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου είδους είναι εξίσου σημαντικές με αυτές μεταξύ διαφορετικών ειδών.

**Πίνακας 2.7.4. Γραμμική ταχύτητα αύξησης (mm day<sup>-1</sup>) για 60 στελέχη βασιδιομυκήτων σε PDA και στερεοποιημένα με άγαρ διαλύματα ΥΑΕ σε τρεις αραιώσεις σε νερό (25, 50, 100%, v/v). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση, n = 3. Οι αριθμοί στους εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's t-test, p < 0,05) για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών στελεχών και τα πεζά γράμματα τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων σε κάθε στέλεχος.**

Στέλεχος	PDA	25% ΥΑΕ	50% ΥΑΕ	100% ΥΑΕ
ABC521	10.56±0.09 <sup>5,a</sup>	6.31±0.15 <sup>6,7,8,b</sup>	4.59±0.08 <sup>6,7,8,c</sup>	2.64±0.05 <sup>3,4,d</sup>
ABL436	11.86±0.17 <sup>4,a</sup>	9.03±0.10 <sup>4,5,b</sup>	7.65±0.28 <sup>1,c</sup>	5.15±0.05 <sup>1,d</sup>
ACL834	3.81±0.38 <sup>16,17,18,19,a</sup>	2.38±0.13 <sup>15,16,b</sup>	1.81±0.19 <sup>13,14,b</sup>	Δ.Α.
AML472	4.88±1.00 <sup>13,14,15,15,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
CTL447	9.20±0.16 <sup>6,a</sup>	6.84±0.06 <sup>6,b</sup>	4.16±0.10 <sup>7,8,9,c</sup>	2.40±0.13 <sup>4,5,d</sup>
DQC528	10.96±0.10 <sup>5,a</sup>	6.04±0.06 <sup>7,8,9,b</sup>	5.94±0.08 <sup>3,4,b</sup>	5.23±0.18 <sup>1,c</sup>
DSC750	11.19±0.46 <sup>4,5,a</sup>	2.87±0.04 <sup>14,15,b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
FHL295	1.88±0.12 <sup>24,25,26,27,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
FVS803	5.71±0.34 <sup>11,12,13,a</sup>	3.98±0.19 <sup>12,13,b</sup>	2.88±0.26 <sup>11,c</sup>	Δ.Α.
FPL302	8.04±0.14 <sup>7,8,9,a</sup>	0.40±0.00 <sup>22,23,24,b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
GAL401	9.03±0.20 <sup>6,7,a</sup>	6.05±0.29 <sup>6,7,8,9,b</sup>	3.88±0.18 <sup>9,c</sup>	2.51±0.12 <sup>4,d</sup>
GCL642	6.20±0.19 <sup>11,12,a</sup>	2.44±0.33 <sup>15,16,b</sup>	1.70±0.13 <sup>13,14,c</sup>	Δ.Α.
GLC448	7.52±0.18 <sup>9,10,a</sup>	6.62±0.17 <sup>6,7,a</sup>	5.45±0.62 <sup>4,5,b</sup>	2.29±0.09 <sup>4,5,c</sup>
GPL336	2.57±0.23 <sup>22,23,24,25,a</sup>	1.68±0.06 <sup>16,17,18,b</sup>	0.90±0.03 <sup>16,17,18,c</sup>	0.54±0.06 <sup>7,8,9,10,d</sup>
GRL334	7.73±0.42 <sup>8,9,a</sup>	5.43±0.91 <sup>9,10,b</sup>	4.83±0.33 <sup>5,6,b</sup>	2.32±0.49 <sup>4,5,c</sup>
GRL403	8.12±0.03 <sup>7,8,9,a</sup>	5.87±0.00 <sup>7,8,9,b</sup>	3.96±0.06 <sup>8,9,c</sup>	2.14±0.14 <sup>4,5,d</sup>
GRC604	4.62±0.10 <sup>14,15,16,17,a</sup>	3.57±0.08 <sup>13,14,b</sup>	2.59±0.18 <sup>11,12,c</sup>	0.96±0.15 <sup>6,7,d</sup>
GRS805	3.24±0.19 <sup>17,18,19,20,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
HCC522	32.99±0.57 <sup>1,a</sup>	12.12±0.10 <sup>1,b</sup>	1.05±0.00 <sup>15,16,17,18,c</sup>	Δ.Α.
HEL801	13.96±0.07 <sup>2,a</sup>	8.27±0.89 <sup>5,b</sup>	5.51±0.21 <sup>4,c</sup>	3.16±0.12 <sup>2,3,d</sup>
HEL802	1.50±0.28 <sup>25,26,27,28,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
HAL340	7.58±0.04 <sup>8,9,10,a</sup>	3.62±0.13 <sup>13,14,b</sup>	2.08±0.09 <sup>12,13,c</sup>	0.98±0.03 <sup>6,7,d</sup>
HUL417	1.87±0.02 <sup>24,25,26,27,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
ITL314	4.45±0.04 <sup>14,15,16,17,a</sup>	0.08±0.03 <sup>24,b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
ILC238	13.42±0.50 <sup>2,3,a</sup>	10.04±0.05 <sup>2,3,b</sup>	6.80±0.22 <sup>2,c</sup>	0.70±0.00 <sup>7,8,9,d</sup>
LSL331	4.19±0.79 <sup>15,16,17,18,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
LSL332	6.53±0.48 <sup>10,11,a</sup>	2.86±0.14 <sup>14,15,b</sup>	2.71±0.08 <sup>11,12,b,c</sup>	1.96±0.33 <sup>5,c</sup>
LES812	2.33±0.20 <sup>22,23,24,25,26,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
NLL317	3.95±0.22 <sup>16,17,18,19,a</sup>	1.70±0.34 <sup>16,17,18,b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
OIL347	2.25±0.05 <sup>23,24,25,26,a</sup>	1.49±0.04 <sup>17,18,19,b</sup>	0.80±0.00 <sup>16,17,18,19,c</sup>	0.42±0.08 <sup>8,9,10,d</sup>
PFL346	3.22±0.05 <sup>20,21,22,23,a</sup>	2.09±0.04 <sup>15,16,17,b</sup>	1.35±0.03 <sup>14,15,16,c</sup>	0.55±0.33 <sup>7,8,9,10,d</sup>
PHL322	36.64±0.92 <sup>1,a</sup>	12.57±0.18 <sup>1,b</sup>	6.48±0.03 <sup>2,3,c</sup>	Δ.Α.
PHC571	34.23±0.30 <sup>1,a</sup>	10.83±0.10 <sup>2,b</sup>	4.18±0.15 <sup>6,7,8,9,c</sup>	Δ.Α.
PNS806	3.97±0.38 <sup>16,17,18,19,a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PAC891	2.74±0.11 <sup>21,22,23,24,a</sup>	0.44±0.16 <sup>22,23,24,b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.

PAC854	1.02±0.12 <sup>a</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
PCC884	4.69±0.05 <sup>13.14.15.16.a</sup>	2.56±0.32 <sup>15.b</sup>	2.06±0.17 <sup>14.15.16.17.b</sup>	0.23±0.05 <sup>9.10.c</sup>
PCL660	2.55±0.68 <sup>22.23.24.25.a</sup>	0.06±0.01 <sup>22.23.24.b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
PCC897	2.30±0.23 <sup>23.24.25.26.a</sup>	1.05±0.12 <sup>18.19.20.21.b</sup>	0.58±0.16 <sup>17.18.19.20.c</sup>	Δ.Α.
PDC855	5.38±0.28 <sup>12.13.14.a</sup>	4.19±0.29 <sup>11.12.13.b</sup>	3.09±0.27 <sup>10.11.c</sup>	0.78±0.24 <sup>6.7.8.d</sup>
PEC847	3.98±0.38 <sup>16.17.18.19.a</sup>	0.87±0.06 <sup>20.21.22.23.b</sup>	0.32±0.03 <sup>19.20.21.c</sup>	Δ.Α.
PEL063	3.59±0.24 <sup>18.19.20.21.a</sup>	0.90±0.09 <sup>19.20.21.22.b</sup>	0.20±0.00 <sup>20.21.c</sup>	Δ.Α.
PEC810	3.76±0.12 <sup>17.18.19.20.a</sup>	1.30±0.34 <sup>17.18.19.20.b</sup>	0.42±0.13 <sup>18.19.20.c</sup>	Δ.Α.
PEC856	1.48±0.04 <sup>26.27.28.a</sup>	0.42±0.20 <sup>22.23.24.b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
PFC860	1.03±0.28 <sup>27.28.a</sup>	0.51±0.02 <sup>21.22.23.24.b</sup>	0.32±0.03 <sup>19.20.21.b</sup>	Δ.Α.
PNL126	0.94±0.01 <sup>27.28.a</sup>	0.36±0.02 <sup>23.24.b</sup>	0.07±0.04 <sup>21.c</sup>	Δ.Α.
PNC816	0.64±0.04 <sup>28.a</sup>	0.15±0.10 <sup>22.23.24.b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
POC843	3.45±0.69 <sup>19.20.21.22.a</sup>	1.74±0.06 <sup>16.17.18.b</sup>	0.47±0.41 <sup>18.19.20.c</sup>	Δ.Α.
POC847	5.10±0.03 <sup>12.13.14.a</sup>	1.76±0.07 <sup>16.17.18.b</sup>	1.15±0.05 <sup>18.19.20.21.c</sup>	Δ.Α.
POL067	6.64±0.22 <sup>10.11.a</sup>	2.39±0.05 <sup>15.16.b</sup>	0.75±0.48 <sup>16.17.18.19.c</sup>	0.07±0.03 <sup>10.c</sup>
PPL111	7.80±0.21 <sup>8.9.a</sup>	2.74±0.05 <sup>15.b</sup>	1.67±0.16 <sup>13.14.15.c</sup>	Δ.Α.
PPC823	3.71±0.28 <sup>17.18.19.20.a</sup>	1.56±0.10 <sup>17.18.19.b</sup>	1.06±0.09 <sup>15.16.17.18.c</sup>	0.20±0.00 <sup>9.10.d</sup>
PSC757	0.80±0.06 <sup>27.28.a</sup>	0.50±0.06 <sup>22.23.24.b</sup>	0.30±0.00 <sup>19.20.21.c</sup>	Δ.Α.
PTC822	2.70±0.24 <sup>21.22.23.24.a</sup>	0.97±0.12 <sup>18.19.20.21.b</sup>	Δ.Α.	Δ.Α.
SHC608	12.83±0.14 <sup>3.a</sup>	5.81±0.07 <sup>8.9.b</sup>	4.71±0.03 <sup>6.7.c</sup>	3.61±0.08 <sup>2.d</sup>
THC610	9.08±0.06 <sup>6.7.a</sup>	5.78±0.05 <sup>8.9.b</sup>	3.74±0.19 <sup>9.10.c</sup>	2.62±0.02 <sup>4.d</sup>
TLL473	7.40±0.12 <sup>9.10.a</sup>	4.93±0.03 <sup>10.11.b</sup>	4.80±0.00 <sup>10.11.b</sup>	1.24±0.10 <sup>6.c</sup>
TVL469	8.64±0.18 <sup>6.7.8.a</sup>	5.61±0.03 <sup>8.9.10.b</sup>	4.37±0.03 <sup>6.7.8.9.c</sup>	3.61±0.08 <sup>2.d</sup>
TVC614	8.98±0.18 <sup>6.7.a</sup>	4.42±0.04 <sup>11.12.b</sup>	4.14±0.05 <sup>7.8.9.c</sup>	3.37±0.07 <sup>2.c</sup>
TLC616	13.41±0.20 <sup>2.3.a</sup>	9.34±0.10 <sup>3.4.b</sup>	6.77±0.07 <sup>2.c</sup>	2.61±0.06 <sup>4.d</sup>

Δ.Α.: Δεν αναπτύχθηκε.

### 2.7.3.3 Αξιολόγηση της μείωσης του ρυπαντικού φορτίου ΥΑΕ από επιλεγμένα στελέχη ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων

Με βάση τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν παραπάνω, οκτώ στελέχη από ισάριθμα είδη (*Abortiporus biennis* ABL436, *Ganoderma carnosum* GCL448, *Haralopilus croceus* HCC522, *Hericium erinaceus* HEL801, *Irpex lacteus* ILC238, *Phanerochaete chrysosporium* PHL322, *Pleurotus djamor* PDC855 και *P. pulmonarius* PPL111) προκρίθηκαν για περαιτέρω μελέτη όσον αφορά στην αποδόμηση-αποτοξικοποίηση των ΥΑΕ.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η μυκηλιακή αύξηση οδήγησε σε μείωση του pH από την αρχική τιμή 5,65 έως και 4,48 για το *I. lacteus*, ενώ στα υπόλοιπα στελέχη κυμάνθηκε από 5,00 έως 5,50 (Πίνακας 2.7.5). Ωστόσο, οι διαφοροποιήσεις στις τιμές του pH ήταν λιγότερο έντονες στα είδη *Pleurotus*, εύρημα το οποίο συμφωνεί και με παλιότερα σχετικά αποτελέσματα που αφορούν το *P. ostreatus* (Tsioulpas et al., 2002). Οι μετρήσεις της ηλεκτρικής αγωγιμότητας έδειξαν βαθμιαία αύξηση των τιμών από 1,80 mS cm<sup>-1</sup> στο αρχικό υλικό έως 3,85 – 5,97 mS cm<sup>-1</sup> στο βιοεπεξεργασμένο απόβλητο (Πίνακας 2.7.5). Ανάλογα αποτελέσματα για τις τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας μετά την επεξεργασία ΥΑΕ με μικροοργανισμούς έχουν αναφερθεί και στο παρελθόν (Mekki et al., 2006).



**Πίνακας 2.7.5. Μυκηλιακή βιομάζα και pH, ηλεκτρική αγωγιμότητα, δείκτης βλάστησης σπόρων μαρουλιού (GI), αποχρωματισμός και περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά υποστρώματος από ΥΑΕ (25% v/v) , όπως μετρήθηκαν σε πέντε χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια ανάπτυξης οκτώ επιλεγμένων στελεχών μακρομυκήτων σε υπόστρωμα. Τα T1 έως T5 αντιπροσωπεύουν 4, 8, 12, 16 και 20 ημέρες για τα στελέχη HCC522 και PHL322, 5, 10, 15, 20 και 25 ημέρες για τα ABL436, GCL448, HEL801 και ILC238 και 6, 12, 18, 24 και 30 ημέρες για τα PDC855 και PPL111.**

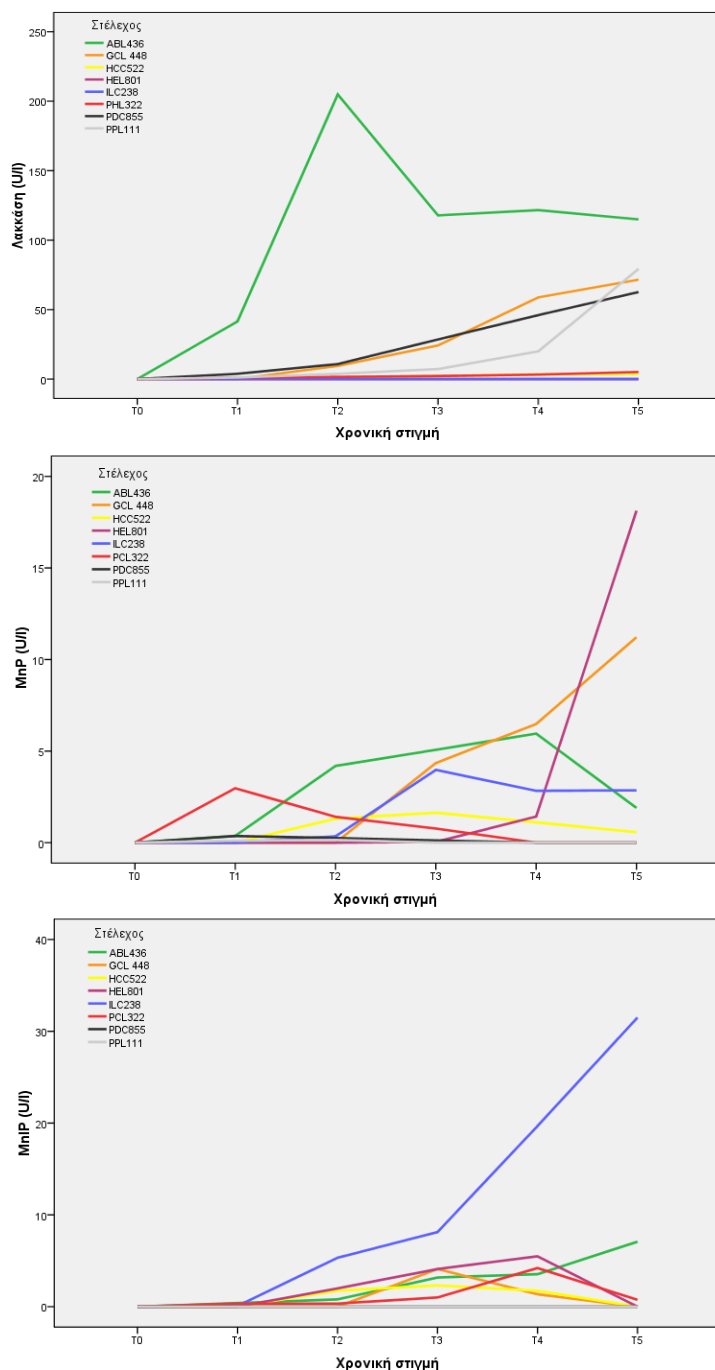
Παράμετρος	Χρονική στιγμή	ABL436	GCL448	HCC522	HEL801	ILC238	PDC855	PHL322	PPL111	Μάρτυρας
pH	T1	5,57 ± 0,06 <sup>BCa</sup>	5,55 ± 0,10 <sup>BCab</sup>	5,62 ± 0,00 <sup>ABa</sup>	5,55 ± 0,01 <sup>ABCa</sup>	5,44 ± 0,10 <sup>Cb</sup>	5,64 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	5,65 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	5,60 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	5,65 ± 0,00a
	T2	5,49 ± 0,10 <sup>Cab</sup>	5,50 ± 0,00 <sup>Cab</sup>	5,59 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	5,53 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	5,25 ± 0,05 <sup>Dbc</sup>	5,60 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	5,65 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	5,50 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	5,65 ± 0,00a
	T3	5,35 ± 0,05 <sup>Bbc</sup>	5,43 ± 0,05 <sup>ABb</sup>	5,53 ± 0,05 <sup>Ab</sup>	5,52 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	5,07 ± 0,06 <sup>Bc</sup>	5,50 ± 0,00 <sup>Ac</sup>	5,4 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	5,44 ± 0,00 <sup>Bc</sup>	5,65 ± 0,00a
	T4	5,29 ± 0,12 <sup>BCc</sup>	5,40 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	5,4 ± 0,00 <sup>Bc</sup>	5,52 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	5,00 ± 0,05 <sup>Dc</sup>	5,50 ± 0,00 <sup>Ac</sup>	5,18 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	5,18 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	5,65 ± 0,00a
	T5	5,20 ± 0,05 <sup>Cc</sup>	5,30 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	5,13 ± 0,12 <sup>Cd</sup>	5,50 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	4,48 ± 0,06 <sup>Dc</sup>	5,48 ± 0,01 <sup>Ac</sup>	5,00 ± 0,00 <sup>CDd</sup>	5,14 ± 0,00 <sup>Cd</sup>	5,65 ± 0,00a
Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS cm <sup>-1</sup> )	T1	4,25 ± 0,03 <sup>Ae</sup>	3,80 ± 0,10 <sup>Abe</sup>	2,63 ± 0,01 <sup>Ce</sup>	4,09 ± 0,04 <sup>Ad</sup>	2,52 ± 0,04 <sup>Ce</sup>	2,60 ± 0,03 <sup>Ce</sup>	2,21 ± 0,01 <sup>Ee</sup>	2,45 ± 0,06 <sup>CDa</sup>	1,80 ± 0,00b
	T2	4,47 ± 0,02 <sup>Ad</sup>	4,09 ± 0,03 <sup>Cd</sup>	3,27 ± 0,01 <sup>Bd</sup>	4,21 ± 0,03 <sup>Bd</sup>	3,05 ± 0,02 <sup>Fd</sup>	3,03 ± 0,05 <sup>Fd</sup>	2,75 ± 0,03 <sup>Gd</sup>	2,89 ± 0,02 <sup>Gc</sup>	1,82 ± 0,00b
	T3	4,92 ± 0,04 <sup>Ac</sup>	4,31 ± 0,07 <sup>Bc</sup>	4,05 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	4,40 ± 0,04 <sup>Bc</sup>	4,17 ± 0,02 <sup>Cc</sup>	3,68 ± 0,05 <sup>Ec</sup>	3,02 ± 0,04 <sup>Fc</sup>	3,45 ± 0,10 <sup>Fb</sup>	1,89 ± 0,02a
	T4	5,27 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	4,53 ± 0,09 <sup>BCb</sup>	4,87 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	4,62 ± 0,05 <sup>Cb</sup>	4,84 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	4,19 ± 0,13 <sup>Dd</sup>	3,33 ± 0,06 <sup>Eb</sup>	3,99 ± 0,00 <sup>Ab</sup>	1,94 ± 0,03a
	T5	5,97 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	4,79 ± 0,07 <sup>Da</sup>	5,67 ± 0,02 <sup>Ba</sup>	4,85 ± 0,12 <sup>Da</sup>	5,54 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	4,97 ± 0,05 <sup>Da</sup>	3,85 ± 0,01 <sup>Fa</sup>	4,23 ± 0,08 <sup>Ea</sup>	1,95 ± 0,03a
Βιομάζα (g)	T1	0,05 ± 0,01 <sup>Ac</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>Ec</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>BCe</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>Ec</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>ABd</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>DEc</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>CDe</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>DEd</sup>	-
	T2	0,15 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>Cbc</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>Cd</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>BCb</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>Bc</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>BCb</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>Cd</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>Ccd</sup>	-
	T3	0,2 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>Fb</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>Dc</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>EFb</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>Ec</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>Fc</sup>	-
	T4	0,21 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>BCa</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>BCa</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>Ba</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	-
	T5	0,21 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>BCa</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>ABa</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	-
Αποχρωματισμός %	T1	-25,82 ± 4,37 <sup>Fe</sup>	2,41 ± 0,32 <sup>Be</sup>	-0,99 ± 0,02 <sup>De</sup>	14,23 ± 1,93 <sup>Ab</sup>	-6,59 ± 0,41 <sup>Fd</sup>	-28,24 ± 1,88 <sup>Gd</sup>	-2,35 ± 0,39 <sup>Ce</sup>	-23,22 ± 1,89 <sup>Fd</sup>	0,44 ± 0,04b
	T2	48,08 ± 3,71 <sup>Ad</sup>	4,57 ± 0,54 <sup>Ed</sup>	4,55 ± 1,20 <sup>Ed</sup>	18,36 ± 0,84 <sup>Bb</sup>	8,52 ± 1,30 <sup>Dc</sup>	13,76 ± 1,52 <sup>Cc</sup>	1,78 ± 0,25 <sup>Fd</sup>	-21,44 ± 3,34 <sup>Gd</sup>	0,68 ± 0,11ab
	T3	56,84 ± 0,71 <sup>Ac</sup>	7,31 ± 0,87 <sup>Fc</sup>	17,99 ± 0,45 <sup>Dc</sup>	25,21 ± 2,86 <sup>Ca</sup>	35,16 ± 3,24 <sup>Bb</sup>	21,09 ± 2,80 <sup>Cb</sup>	11,72 ± 0,46 <sup>Ec</sup>	17,68 ± 1,45 <sup>Dc</sup>	0,89 ± 0,20a
	T4	60,99 ± 0,78 <sup>Ab</sup>	10,48 ± 1,53 <sup>Eb</sup>	25,73 ± 1,32 <sup>Db</sup>	27,09 ± 1,31 <sup>Da</sup>	51,51 ± 2,57 <sup>Ba</sup>	40,64 ± 1,93 <sup>Ca</sup>	21,65 ± 1,80 <sup>Db</sup>	23,43 ± 2,26 <sup>Db</sup>	1,21 ± 0,14a
	T5	64,01 ± 0,32 <sup>Aa</sup>	13,86 ± 1,90 <sup>Fa</sup>	33,63 ± 2,40 <sup>Da</sup>	29,13 ± 0,57 <sup>Ea</sup>	55,91 ± 1,64 <sup>Ba</sup>	48,12 ± 2,32 <sup>Ca</sup>	33,16 ± 2,19 <sup>Da</sup>	38,76 ± 3,14 <sup>Da</sup>	1,31 ± 0,13a

Μείωση ολικών φαινολικών %	T1	54,45 ± 3,98 <sup>Ad</sup>	2,8 ± 0,41 <sup>Dc</sup>	0,50 ± 0,09 <sup>Ee</sup>	13,54 ± 3,73 <sup>Bcc</sup>	15,28 ± 0,79 <sup>Bcb</sup>	17,33 ± 1,23 <sup>Bd</sup>	5,06 ± 0,69 <sup>CDe</sup>	11,19 ± 3,55 <sup>BCd</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>d</sup>
	T2	72,13 ± 3,91 <sup>Ac</sup>	48,57 ± 5,48 <sup>Bb</sup>	9,57 ± 0,93 <sup>Ed</sup>	18,42 ± 1,60 <sup>Db</sup>	16,02 ± 1,60 <sup>Db</sup>	32,14 ± 1,62 <sup>Cc</sup>	8,85 ± 0,93 <sup>Ed</sup>	16,61 ± 1,23 <sup>Dd</sup>	0,58 ± 0,15 <sup>c</sup>
	T3	81,80 ± 2,59 <sup>Ab</sup>	53,8 ± 3,20 <sup>Bab</sup>	22,03 ± 1,23 <sup>Dc</sup>	19,32 ± 2,28 <sup>Db</sup>	54,45 ± 0,64 <sup>Bca</sup>	43,3 ± 3,21 <sup>Ccb</sup>	18,60 ± 1,72 <sup>Dc</sup>	46,94 ± 5,96 <sup>Bcc</sup>	1,10 ± 0,09 <sup>b</sup>
	T4	86,73 ± 2,11 <sup>Ab</sup>	60,66 ± 2,16 <sup>Ca</sup>	30,69 ± 0,91 <sup>Db</sup>	23,83 ± 1,99 <sup>Eb</sup>	56,67 ± 0,61 <sup>Ca</sup>	69,15 ± 2,50 <sup>Ba</sup>	29,43 ± 2,12 <sup>Db</sup>	56,15 ± 3,86 <sup>Cb</sup>	1,45 ± 0,37 <sup>ab</sup>
	T5	92,39 ± 1,39 <sup>Aa</sup>	61,03 ± 3,21 <sup>Ca</sup>	47,48 ± 1,78 <sup>Da</sup>	45,63 ± 3,60 <sup>DEa</sup>	58,89 ± 0,58 <sup>Ca</sup>	76,01 ± 2,39 <sup>Ba</sup>	41,74 ± 2,57 <sup>Ea</sup>	70,59 ± 3,60 <sup>Ba</sup>	2,14 ± 0,42 <sup>a</sup>
GI %	T1	7,58 ± 1,17 <sup>Ad</sup>	0	0,78 ± 0,09 <sup>Cd</sup>	0	6,51 ± 0,68 <sup>Ad</sup>	0,71 ± 0,08 <sup>Cd</sup>	1,42 ± 0,06 <sup>Bd</sup>	0,73 ± 0,14 <sup>Cc</sup>	0,00
	T2	9,23 ± 0,74 <sup>Ad</sup>	6,62 ± 1,31 <sup>Bb</sup>	2,77 ± 0,41 <sup>Dcd</sup>	5,26 ± 0,94 <sup>Bb</sup>	8,78 ± 1,20 <sup>Ad</sup>	1,49 ± 0,10 <sup>Ec</sup>	3,27 ± 0,16 <sup>Cc</sup>	1,85 ± 0,36 <sup>Ec</sup>	0,00
	T3	20,47 ± 0,57 <sup>cA</sup>	8,91 ± 0,87 <sup>Cb</sup>	4,05 ± 0,71 <sup>Dbc</sup>	6,41 ± 1,16 <sup>Cdb</sup>	14,49 ± 0,47 <sup>Bc</sup>	2,13 ± 0,41 <sup>Ec</sup>	3,91 ± 0,40 <sup>Dc</sup>	4,27 ± 0,85 <sup>Db</sup>	0,00
	T4	24,89 ± 1,57 <sup>Ab</sup>	13,28 ± 0,47 <sup>Ba</sup>	5,92 ± 1,02 <sup>CDab</sup>	7,33 ± 0,54 <sup>Cb</sup>	15,78 ± 0,12 <sup>Bb</sup>	4,75 ± 0,51 <sup>Db</sup>	6,76 ± 0,16 <sup>Cb</sup>	6,76 ± 1,52 <sup>Ca</sup>	0,00
	T5	30,01 ± 0,97 <sup>Aa</sup>	17,57 ± 1,47 <sup>Ba</sup>	8,11 ± 2,03 <sup>Ca</sup>	15,01 ± 2,12 <sup>Ba</sup>	17,04 ± 0,78 <sup>Ba</sup>	8,11 ± 0,71 <sup>Ca</sup>	8,89 ± 0,26 <sup>Ca</sup>	8,89 ± 0,94 <sup>Ca</sup>	0,00

Όλα τα υπό διερεύνηση στελέχη παρήγαγαν άφθονη μυκηλιακή βιομάζα στις στατικές καλλιέργειες σε ΥΑΕ. Ωστόσο, σε τέσσερα από αυτά (*A. biennis*, *H. croceus*, *P. djamor* και *P. pulmonarius*) η παραγωγή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα (200 – 230 mg, Πίνακας 2.7.5). Όμως, η παραγωγή βιομάζας στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης ήταν σχετικά περιορισμένη λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του υποστρώματος σε άμεσα αφομοιώσιμα θρεπτικά συστατικά, με βάση τα όσα έχουν αναφερθεί για τη σύσταση των ΥΑΕ (Ntougias et al., 2013). Γενικά, η ανάπτυξη της μυκητιακής βιομάζας συνοδεύτηκε από διαφορετικό βαθμό παραγωγής ενζύμων μεταξύ των στελεχών που εξετάστηκαν. Το *A. biennis* ήταν το μόνο είδος στο οποίο παρατηρήθηκε σχετικά υψηλή ενεργότητα λακκάσης κατά τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, η μέγιστη τιμή της οποίας σημειώθηκε 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό ( $205 \text{ U L}^{-1}$ ) και παρέμεινε σε υψηλές τιμές ( $115 - 122 \text{ U L}^{-1}$ ) μέχρι το τέλος της επώασης (Γράφημα 2.7.2). Στα υπόλοιπα στελέχη μετρήθηκαν μικρότερες ή και μηδενικές τιμές ενεργότητας της λακκάσης. Εντός της πρώτης ομάδας τόσο στα είδη *Pleurotus* όσο και στο *G. carnosum* η παραγωγή της λακκάσης αυξήθηκε παράλληλα με την ανάπτυξη της βιομάζας και έλαβε τις υψηλότερες τιμές στο τελευταίο στάδιο της καλλιέργειας ( $63 - 79 \text{ U L}^{-1}$ ), ενώ τα *H. croceus* και *Ph. chrysosporium* παρουσίασαν πολύ χαμηλότερες τιμές ( $3,6 - 5,1 \text{ U L}^{-1}$ ). Αντιθέτως, στις περιπτώσεις των *H. erinaceus* και *I. lacteus* δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή λακκάσης.

Όσον αφορά την παραγωγή της MnP, παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση στις μέγιστες τιμές αλλά και στη χρονική περίοδο στην οποία εκφράστηκε (Γράφημα 2.7.2). Οι υψηλότερες τιμές ενεργότητας της MnP καταγράφηκαν στα *H. erinaceus* και *G. carnosum* ( $18$  και  $11 \text{ U L}^{-1}$ ) προς το τέλος της καλλιέργειας. Τα είδη *A. biennis*, *H. croceus* και *I. lacteus* έδωσαν τις μέγιστες τιμές της MnP προς το μέσο της επώασης ( $1,6 - 5,9 \text{ U L}^{-1}$ ), ενώ για τα *Ph. chrysosporium* και *P. ostreatus* οι μεγαλύτερες τιμές της ενεργότητας MnP μετρήθηκαν κατά τις 12 πρώτες ημέρες της ανάπτυξης τους. Η έκφραση της MnP έχει συσχετιστεί στο παρελθόν με τον δευτερογενή μεταβολισμό και την έλλειψη αζώτου ή/και άνθρακα (Kirk and Farrell, 1987). Αυτό δεν παρατηρήθηκε στα πρώτα στάδια της επώασης των *Ph. chrysosporium* και των ειδών *Pleurotus* αλλά θα μπορούσε να ισχύει στην περίπτωση των υπολοίπων πέντε στελεχών στα οποία η μέγιστη παραγωγή σημειώθηκε προς το πέρας της καλλιέργειας. Αντίθετα, δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα της MnIP στα είδη *Pleurotus* (Γράφημα 2.7.2), ενώ σε όλα τα υπόλοιπα η μέγιστη παραγωγή καταγράφηκε στο δεύτερο μισό της καλλιεργητικής περιόδου.

Γενικότερα, τα *P. djamor* και *P. pulmonarius* εμφάνισαν παρόμοια χρονική κλιμάκωση της ενεργότητας και των τριών ένζυμων κατά την παραγωγή βιομάζας, ενώ κάτι αντίστοιχο συνέβη και για τα *H. croceus* και *Ph. chrysosporium*. Πέραν αυτών, στα υπόλοιπα στελέχη ακολουθήθηκε παρόμοια παραγωγή των ενζύμων MnP και MnIP κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μύκητα.



**Γράφημα 2.7.2.** Μετρήσεις ενεργότητας ( $U L^{-1}$ ) των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (MnIP) σε οκτώ επιλεγμένα στελέχη μυκήτων ανεπτυγμένα σε YAE (25% v/v με νερό) τις χρονικές στιγμές 4, 8, 12, 16 και 20 ημέρες για τα στελέχη *H. croceus* HCC522 και *Ph. chrysosporium* PHL322, 5, 10, 15, 20 και 25 ημέρες για τα *A. biennis* ABL436, *G. carnosum* GCL448, *H. erinaceus* HEL801 και *I. lacteus* ILC238 και 6, 12, 18, 24 και 30 ημέρες για τα *P. djamor* PDC855 και *P. pulmonarius* PPL111.

Παρόλο που σε μερικές περιπτώσεις, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας είναι σε συμφωνία με παλιότερες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την ενζυμική ενεργότητα σε σχέση με τη μυκηλιακή ανάπτυξη, όπως για παράδειγμα η ενεργότητα της MnP για στελέχη των γενών *Pleurotus* και *Ganoderma* (Ntougias et al., 2012, Tsioupras et al., 2002), υπήρξαν και διαφοροποιήσεις. Έτσι, η παραγωγή της MnIP σε είδη *Ganoderma* συμβαίνει σε πιο προχωρημένα στάδια της καλλιέργειας και η παραγωγή της MnP νωρίτερα σε σχέση με όσα αναφέρονται σε προηγούμενη εργασία (Ntougias et al., 2012). Οι διαφορές αυτές στις τιμές της ενζυμικής ενεργότητας και της πορείας παραγωγής της μπορούν να αποδοθούν τόσο στις πειραματικές συνθήκες (συμπεριλαμβανομένων της σύστασης του αρχικού υποστρώματος και του βαθμού αραίωσης) όσο και στις ενδογενείς ιδιότητες του κάθε στελέχους.

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των ΥΑΕ μειώθηκε σημαντικά από όλα τα υπό εξέταση στελέχη. Ωστόσο ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του *A. biennis* στο οποίο η μείωση ξεπέρασε το 50% κατά τις πρώτες 6 μέρες, ενώ μέχρι το τέλος του πειράματος άγγιξε το 92% (Πίνακας 2.7.5). Πολύ μεγάλη μείωση (παρόλο που διέφερε σημαντικά από το προηγούμενο) καταγράφηκε επίσης στα δύο είδη *Pleurotus* (71 – 76%) ακολουθούμενα από τα *I. lacteus* και *G. carnosum*. Το τελευταίο, ήταν το δεύτερο ταχύτερο στην αποδόμηση των φαινολικών μετά το *A. biennis*, με ποσοστό μείωσης που έφτασε το 49% τις πρώτες 12 ημέρες της επώασης. Είναι αξιοσημείωτο ότι και σε άλλα είδη/στελέχη *Ganoderma* έχει αναφερθεί παρόμοια συμπεριφορά, όσον αφορά το χρονικό διάστημα που απαιτείται για μείωση του φαινολικού φορτίου σε παρόμοια επίπεδα (41 – 44% σε 10 μέρες) αλλά και στην ολική απόδοση (64%) (Matos et al., 2007, Ntougias et al., 2012). Αντίθετα, επιλεγμένα στελέχη *P. ostreatus* και *P. eryngii* έχουν δείξει πιο αργή αποδόμηση, η οποία ξεπέρασε το 50% μόνο μετά την ολοκλήρωση του πρώτου μισού της καλλιέργειας (Ntougias et al., 2012). Σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. στα *A. biennis*, *G. carnosum* και *I. lacteus*) παρατηρήθηκε σημαντική επιβράδυνση του ρυθμού μείωσης των φαινολικών κατά το δεύτερο μισό της καλλιεργητικής περιόδου, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στη δυστροπία επιμέρους φαινολικών συστατικών που απομένουν στο θρεπτικό μέσο, όπως το κινναμικό οξύ που δεν αποδομείται από τη λακάση (Casa et al., 2003).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μείωση των φαινολικών συσχετίζεται με την ενεργότητα της λακκάσης και της MnP ( $r = 0,43$  και  $r = 0,71$  αντίστοιχα) όταν εξετάστηκε το σύνολο των οκτώ στελεχών, ενώ οι τιμές αυτές είναι ιδιαίτερα υψηλές σε επιμέρους υπολογισμούς (για την λακκάση στα *H. croceus*, *Ph. chrysosporium* και σε είδη *Pleurotus*:  $r = 0,94 - 1,00$ ,  $p < 0,01$ , για την MnP στα είδη *A. biennis*, *G. carnosum*, *H. erinaceus*

και *I. lacteus*:  $r = 0,71 - 0,94$ ,  $p < 0,05$  και για την MnIP στα είδη *A. biennis*, *I. lacteus*, και *Ph. chrysosporium*:  $r = 0,81 - 1,00$ ,  $p < 0,01$ ). Παρόμοιες συσχετίσεις έχουν καταγραφεί παλιότερα όχι μόνο στην αποδόμηση ΥΑΕ από το *P. ostreatus* (Ntougias et al., 2012, Tsioulpas et al., 2002) αλλά και στην επεξεργασία αποβλήτων από την εκπίκραση επιτραπέζιων ελιών με διάφορους μύκητες λευκής σήψης (Aggelis et al., 2002). Σε αυτή την κατηγορία οργανισμών, η παραγωγή της λακκάσης συχνά επάγεται από την παρουσία κατάλληλου υποστρώματος στο περιβάλλον ανάπτυξης (Thurston, 1994). Ειδικότερα όσον αφορά τα ΥΑΕ η επαγωγή για τα είδη *Pleurotus* έχει συνδεθεί με τη συγκέντρωση του αποβλήτου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Υψηλή ενεργότητα λακκάσης ανιχνεύτηκε όταν τα ολικά φαινολικά υπερέβησαν το  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (Perez et al., 1998, Tomati et al., 1991, Tsioulpas et al., 2002), όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της παρούσας έρευνας ( $> 2,0 \text{ g l}^{-1}$ ). Στα περισσότερα από τα στελέχη που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε μια φάση υστέρησης στην παραγωγή λακκάσης (εξαιρέση αποτελεί μόνο το *A. biennis*) η οποία είναι ενδεικτική του χρόνου που απαιτείται για την προσαρμογή στις απαιτήσεις ανάπτυξης σε ΥΑΕ (D'Annibale et al., 2004, Zouari and Elluz, 1996).

Όπως και στην περίπτωση της μείωσης των φαινολικών, ο μύκητας *A. biennis* ήταν ο αποδοτικότερος συγκριτικά με όλους τους υπόλοιπους στον αποχρωματισμό του αποβλήτου επιτυγχάνοντας μείωση του χρώματος έως και 64% στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (Πίνακας 2.7.5). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας το χρώμα έγινε σκουρότερο (για το συγκεκριμένο και για μερικά ακόμη στελέχη) κατά τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας ως αποτέλεσμα της οξειδωσης και του πολυμερισμού των φαινολικών συστατικών (Thurston, 1994, Jaouani et al., 2006). Στο *A. biennis* επετεύχθη ταχύς και υψηλός βαθμός αποχρωματισμού (48% μετά από 12 ημέρες) ο οποίος ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος από τις αντίστοιχες τιμές που παρατηρήθηκαν στα υπόλοιπα στελέχη κατά την ίδια περίοδο (2 – 18%). Τα στελέχη *I. lacteus* και ειδών *Pleurotus* ακολούθησαν όσον αφορά τον αποχρωματισμό (39 έως 56%), ενώ πολύ χαμηλότερες τιμές μετρήθηκαν στο *G. carnosum* (14%). Στο *H. erinaceus* σημειώθηκε το υψηλότερο ποσοστό αποχρωματισμού κατά το πρώτο μισό της καλλιέργειας χωρίς όμως ανάλογη συνέχεια στο υπόλοιπο της ανάπτυξης του.

Ο αποχρωματισμός που επετεύχθη με τη χρήση του *A. biennis* είναι ανάμεσα στους υψηλότερους που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τους βασιδιομύκητες. Παρόμοια ποσοστά αποχρωματισμού αναφέρθηκαν σε παλαιότερες εργασίες για στελέχη ειδών *Pleurotus* και των *Ganoderma applanatum*, *Lentinula edodes*, *Pycnoporus coccineus*, *Coriolopsis polyzona* και *Lentinus tigrinus*, ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις, το αρχικό

υλικό και οι καλλιεργητικές συνθήκες διέφεραν σημαντικά (Matos et al., 2007, Ntougias et al. 2012, D'Annibale et al., 1998, Jaouani et al., 2003). Επιπλέον από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι ο αποχρωματισμός των ΥΑΕ συσχετίζεται σημαντικά με τη μείωση των φαινολικών ( $r = 0,71$ ,  $p < 0,05$ ), το οποίο συμφωνεί με προηγούμενα αποτελέσματα που συνδέουν τον αποχρωματισμό με την αποδόμηση πολυφαινολών μεγάλου μοριακού βάρους (Zouari and Elluz, 1996, Sayadi et al., 2000). Υψηλή επίσης συσχέτιση καταγράφηκε μεταξύ αποχρωματισμού και ενεργότητας της λακκάσης για την πλειοψηφία των στελεχών που εξετάστηκαν ( $r = 0,83 - 0,99$ ,  $p < 0,01$  για τα *G. carnosum*, *H. croceus*, *Ph. chrysosporium* και είδη *Pleurotus*), όπως επίσης με την MnP ( $r = 0,66 - 0,99$ ,  $p < 0,05$ , για τα *A. biennis*, *G. carnosum*, *H. erinaceus* και *I. lacteus*) και την MnIP ( $r = 0,83 - 0,99$ ,  $p < 0,01$  στην περίπτωση των *G. carnosum*, *I. lacteus* και *Ph. chrysosporium*). Στο παρελθόν ο αποχρωματισμός των ΥΑΕ έχει συσχετιστεί με την παραγωγή λακκάσης και σε άλλα είδη μυκήτων λευκής σήψης (D'Annibale et al., 2004, Ntougias et al., 2012, Dias et al., 2004).

Αναφορικά με την αξιολόγηση της φυτοτοξικότητας, ο μύκητας *A. biennis* έδειξε τη μεγαλύτερη μείωση επιφέροντας 30% αύξηση στον δείκτη βλαστικότητας (BI%) σε σχέση με το ανεπεξέργαστο ΥΑΕ, ενώ τα *G. carnosum*, *I. lacteus* και *H. erinaceus* παρουσίασαν σημαντικά μικρότερες τιμές (15 – 18%). Σε αυτές τις περιπτώσεις η αύξηση στη βλαστικότητα των σπόρων ήταν ιδιαίτερα αργή κατά τις πρώτες δύο εβδομάδες, το οποίο συμφωνεί με αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών με τα *P. ostreatus* και *P. eryngii* όπου αναφέρθηκε αύξηση του GI% κατά 19 – 27% στο τελικό στάδιο της ανάπτυξης τους σε ΥΑΕ (Ntougias et al., 2012). Αντίθετα, στα υπόλοιπα τέσσερα στελέχη σημειώθηκε πολύ μικρότερη μεταβολή του GI% (< 10%), κάτι που θα μπορούσε να αποδοθεί στον σχηματισμό φαινόξυ-ριζών ή/και κινόνων, των οποίων η τοξικότητα είναι μεγαλύτερη από αυτή των αρχικών φαινολικών συστατικών (Martiranni et al., 1996, Saavedra et al., 2006). Γενικά, η τοξικότητα των ΥΑΕ συνδέεται με την παρουσία αρωματικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους και φαινολικών ουσιών (Capasso et al., 1992, Fiorentino et al., 2003). Η αύξηση της βλαστικότητας των σπόρων συσχετίστηκε σημαντικά τόσο με τη μείωση των φαινολικών όσο και του χρώματος ( $r = 0,84$  και  $0,71$ ,  $p < 0,05$  αντίστοιχα). Η υψηλή αυτή συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης στο παρελθόν στην βλάστηση σπόρων *Triticum* και *Lepidium* σε βιοεπεξεργασμένα ΥΑΕ με μύκητες ειδών *Pleurotus* και του *L. edodes* (D'Annibale et al., 2004, Ntougias et al., 2012).

Όταν τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω επαναξιολογήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο που απαιτήθηκε για τη μείωση των ολικών φαινολικών, του χρώματος και της φυτοτοξικότητας, η κατάταξη των στελεχών δεν διαφοροποιήθηκε

σημαντικά. Για παράδειγμα το *A. biennis* ήταν το αποδοτικότερο για όλες τις παραμέτρους επιτυγχάνοντας ημερήσια μείωση κατά 3,7% για τα ολικά φαινολικά, 2,56% για το χρώμα και 1,20% για την αύξηση της βλαστικότητας των σπόρων μαρουλιού. Τα είδη *Pleurotus*, *G. carnosum*, *H. croceus* και *I. lacteus* ακολούθησαν όσον αφορά τη μείωση των φαινολικών (2,35 – 2,53%), το *I. lacteus* για τον αποχρωματισμό (2,24%) και τα *G. carnosum*, *I. lacteus* και *H. croceus* για τον δείκτη BI% (0,60 – 0,70% ανά ημέρα).

**Πίνακας 2.7.6. Συντελεστές συσχέτισης (Pearson's) μεταξύ όλων των παραμέτρων που αφορούν την αποδόμηση των ΥΑΕ και της μυκηλιακής αύξησης υπολογισμένοι για οκτώ επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων. Τα \* και \*\* υποδηλώνουν στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο 1% και 5% αντίστοιχα.**

Παράμετροι	Μυκηλιακή βιομάζα	Ενεργότητα λακκάσης	Ενεργότητα MnlP	Ενεργότητα MnP	Αποχρωματισμός	Μείωση φαινολικών	GI%
Μυκηλιακή βιομάζα	-	0,50**	0,56**	0,56**	0,86**	0,76**	0,88**
Ενεργότητα λακκάσης		-	0,00	0,28	0,34*	0,63**	0,51**
Ενεργότητα MnlP			-	0,55**	0,46**	0,32*	0,60**
Ενεργότητα MnP				-	0,33*	0,47**	0,62**
Αποχρωματισμός					-	0,71**	0,71**
Μείωση φαινολικών							0,84**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι παραπάνω παράγοντες που σχετίζονται με το ρυπαντικό φορτίο του αποβλήτου, οι ενζυμικές ενεργότητες και η βιομάζα των βασιδιομυκήτων φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους εξετάζοντας συνολικά και τα οκτώ στελέχη (Πίνακας 2.7.6). Ιδιαίτερα η μυκηλιακή βιομάζα και ο δείκτης βλαστικότητας εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους.

Εν κατακλείδι, όλοι οι ξυλοσηπτικοί βασιδιομυκήτες που επιλέχθηκαν για τους σκοπούς αυτής της μελέτης αποδείχτηκαν αποτελεσματικοί στον αποικισμό και την αποδόμηση των ΥΑΕ μέσω του ισχυρού ενζυμικού μηχανισμού τους. Ιδιαίτερα ο *A. biennis* και δευτερευόντως οι *I. lacteus*, *G. carnosum* και τα είδη *Pleurotus* επέφεραν υψηλή μείωση του φαινολικού φορτίου και του χρώματος, η οποία συσχετίστηκε με την παραγωγή λακκάσης ή/και των λιγνολυτικών υπεροξειδασών. Η αύξηση του δείκτη βλαστικότητας κυμάνθηκε σε χαμηλότερα ποσοστά σε σχέση με τη μείωση των ολικών φαινολικών και του αποχρωματισμού, αλλά αποδείχθηκε ότι συνδέεται με τη μείωση των δύο προαναφερθέντων παραμέτρων. Η προσέγγιση αυτή φαίνεται ότι είναι κατάλληλη (μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους) στην ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης-αειφορικής διαδικασίας που δύναται να οδηγήσει στην αποτελεσματική επεξεργασία των ΥΑΕ.



#### 2.7.3.4 Βελτιστοποίηση διαδικασίας διαχείρισης ΥΑΕ με επιλεγμένα στελέχη ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων

Στην προηγούμενη ενότητα ένα μεγάλο εύρος ξυλοσηπτικών μυκήτων δοκιμάστηκε ως προς την ικανότητα του να αναπτύσσεται σε ΥΑΕ και να βελτιώνει τις τιμές επιλεγμένων ρυπαντικών παραμέτρων. Επιπλέον, αποδείχθηκε ο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζει ο λιγνινολυτικός ενζυμικός μηχανισμός των μυκήτων λευκής σήψης στο τελικό αποτέλεσμα και συγκεκριμένα των ενζύμων λακκάση (Lac), υπεροξειδάση του Mn (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP). Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την υπεροξειδάση της λιγνίνης και αρκετά ακόμη συνοδευτικά ένζυμα δίνουν την δυνατότητα στους εν λόγω οργανισμούς να καταλύουν τόσο τον αποπολυμερισμό των πολυφαινολών μεγάλου μοριακού βάρους όσο και τον οξειδωτικό πολυμερισμό φαινολικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους, οδηγώντας στην απομάκρυνση τους από το διάλυμα ανάπτυξης (Zerva et al., 2016). Οι ιδιότητες αυτές έχουν βρει εφαρμογές στη λεύκανση χαρτοπολτού (Bermek et al., 2002) και υφασμάτων (Heinfling et al., 1998) και τη σταθεροποίηση χυμών και ποτών (Minussi 2002, 2007). Εκτός από την αποτοξικοποίηση των αποβλήτων ελαιοτριβείων, η βιολογική τους επεξεργασία με μύκητες λευκής σήψης, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως οι β-γλουκάνες (Crognale et al., 2003) και τα αντιοξειδωτικά (Hamza et al., 2012, Khoufi et al., 2011), διάφορα βιοπολυμερή (Ntaïκου et al., 2009) και λιπαρά (Yousuf et al., 2013), αλλά και βιομάζας με φαρμακευτική ή/και σημαντική διατροφική αξία (Zervakis et al., 1996, 2013).

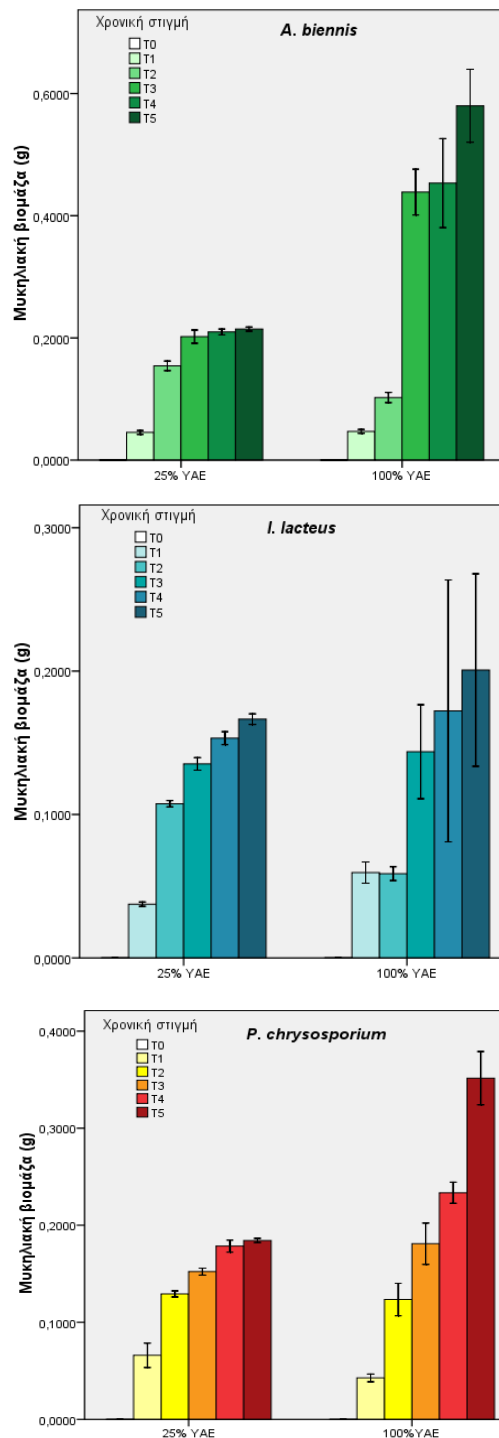
Ορισμένοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα και τη μυκηλιακή ανάπτυξη στις παραπάνω εφαρμογές έχουν μελετηθεί εκτενώς, όπως ο ρυθμός ανακίνησης των υγρών καλλιεργειών, το pH, η θερμοκρασία επώασης και η προσθήκη επιπλέον πηγών άνθρακα ή αζώτου, με σκοπό να βελτιστοποιηθεί όσο γίνεται η σχετική διαδικασία (Jing, 2010, Kachlishvili et al., 2006, Kissi et al., 2001, Singhal and Thakur, 2009, Singhal and Rathore, 2001, Zerva et al., 2016). Ανάμεσα στα είδη που έχουν αξιολογηθεί είναι εκείνα των γενών *Pleurotus*, *Phlebia*, *Ganoderma*, *Trametes* και *Phanerochaete*. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιλέχθηκε το στέλεχος PHL 322 του ευρέως μελετημένου βασιδιομύκητα *Phanerochaete chrysosporium* καθώς και τα λιγότερο μελετημένα είδη *Irpex lacteus* (στέλεχος ILC 238) και *Abortiporus biennis* (στέλεχος ABL436) με βάση την ικανότητα τους να αναπτύσσονται και να αποδομούν το ρυπαντικό φορτίο των ΥΑΕ (Παράγραφος 2.7.3.3) Σε αυτά μελετήθηκε η βελτιστοποίηση της διαδικασίας αποτοξικοποίησης και αποχρωματισμού μέσω της εξέτασης διαφόρων παραγόντων όπως ο βαθμός αραίωσης και

η θερμική προεπεξεργασία του αποβλήτου, αλλά και η προσθήκη αζώτου ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) και μετάλλων Cu και Mg (με τη μορφή  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$  αντίστοιχα) στο αρχικό διάλυμα. Ο κύριος σκοπός των παρακάτω πειραμάτων ήταν να αποτιμηθεί η δυνατότητα της βιολογικής επεξεργασίας των ΥΑΕ με τη μέγιστη δυνατή μείωση του ρυπαντικού φορτίου τους, μέσω της αύξησης της ενεργότητας των λιγνινολυτικών ενζύμων και της μυκηλιακής ανάπτυξης.

#### 2.7.3.4.1 Επίδραση του βαθμού αραιώσης των ΥΑΕ στη διαδικασία αποτοξικοποίησης με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων

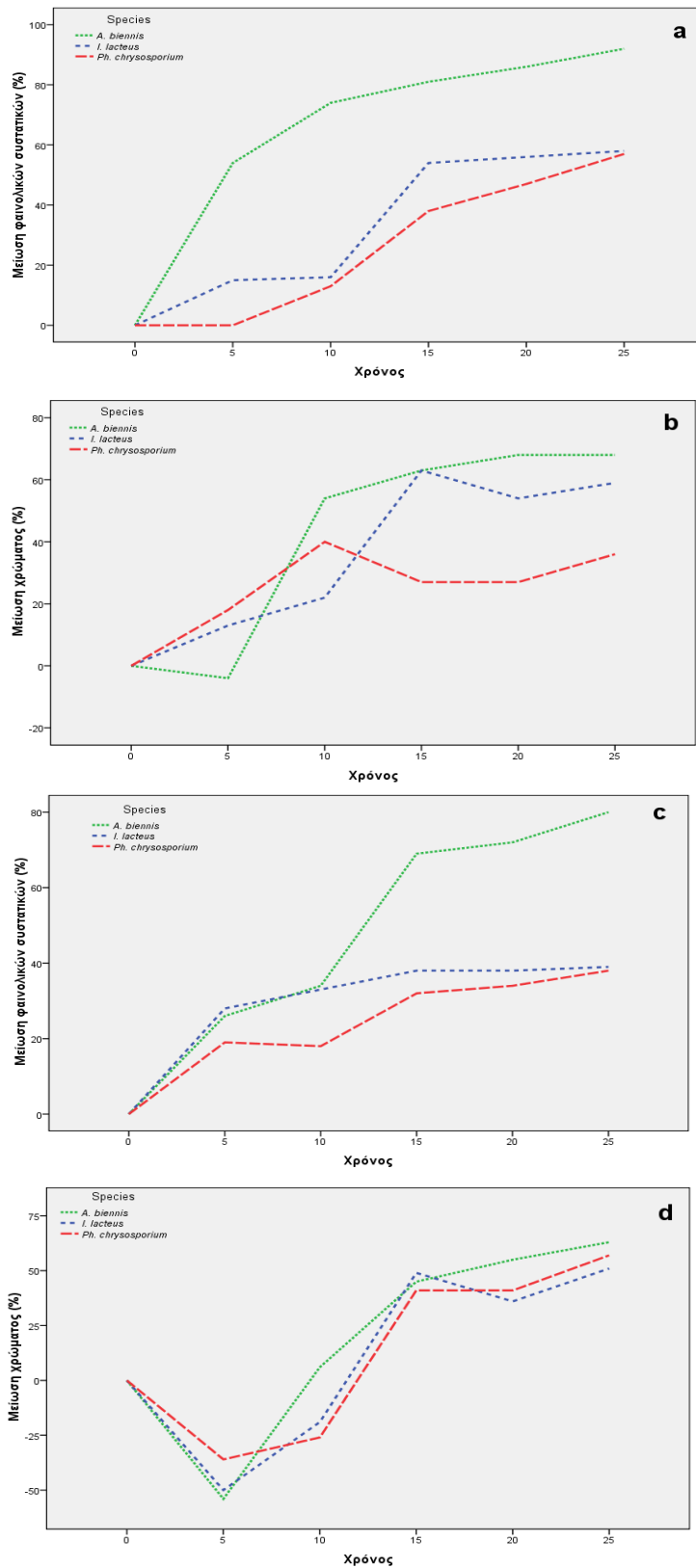
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας σχηματίστηκε και για τα τρία στελέχη στο μη αραιωμένο ΥΑΕ μετά από 25 ημέρες επώασης, παρουσιάζοντας στατιστικά υψηλότερες τιμές από αυτές στο 25% ΥΑΕ (με εξαίρεση το είδος *I. lacteus* για το οποίο οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές). Σε όλες τις περιπτώσεις μέχρι και την δεύτερη μέτρηση (δηλ. 10 ημέρες από τον εμβολιασμό) περισσότερη βιομάζα είχε σχηματιστεί στο αραιωμένο υπόστρωμα, ενώ μετά τις 15 ημέρες παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση στο μη αραιωμένο υλικό (Γράφημα 2.7.3). Αυτή η αύξηση είναι πιο έντονη στο είδος *A. biennis* και μπορεί να ερμηνευτεί λόγω της μικρότερης τοξικότητας που εμφανίζει το υπόστρωμα 25% ΥΑΕ και από την ταχύτερη εξάντληση των θρεπτικών συστατικών στη συγκεκριμένη επέμβαση μετά την παρέλευση της αρχικής περιόδου καλλιέργειας. Μεταξύ των τριών επιλεγμένων στελεχών παρατηρείται διαφορετική συμπεριφορά στα δύο υπό εξέταση υποστρώματα. Αρχικά στο είδος *I. lacteus* δεν σημειώνεται καμία σημαντική διαφορά (με εξαίρεση την 2η μέτρηση στις 10 ημέρες) μεταξύ των δύο επεμβάσεων. Αντίθετα, η διαφορά είναι σημαντική υπέρ του μη αραιωμένου υλικού μετά την πάροδο 15 και 20 ημερών για τα είδη *A. biennis* και *Ph. chrysosporium* αντίστοιχα. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής δοκιμής όπου μετρήθηκε η βιομάζα σε στατικές καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στις αντίστοιχες τιμές, παρόλο που στη μια περίπτωση εξασφαλίστηκε καλύτερος -λόγω ανακίνησης- αερισμός της καλλιέργειας.

Η μείωση των ολικών φαινολικών ήταν σαφώς υψηλότερη στο αραιωμένο υπόστρωμα, ξεπερνώντας το 58% σε όλες τις περιπτώσεις. Αντίθετα στο μη αραιωμένο ΥΑΕ, μόνο το *A. biennis* επέφερε υψηλή μείωση (81%) των ολικών φαινολικών, ενώ στα άλλα δύο στελέχη η μείωση δεν ξεπέρασε το 39% (Γράφημα 2.7.4). Όπως και στο προκαταρκτικό πείραμα, παρατηρήθηκε επιβράδυνση του ρυθμού μείωσης των φαινολικών συστατικών κατά το δεύτερο μισό της καλλιέργειας, κάτι που αποδίδεται στην αδυναμία αποδόμησης των ενώσεων που παραμένουν στο διάλυμα (Casa et al., 2003)

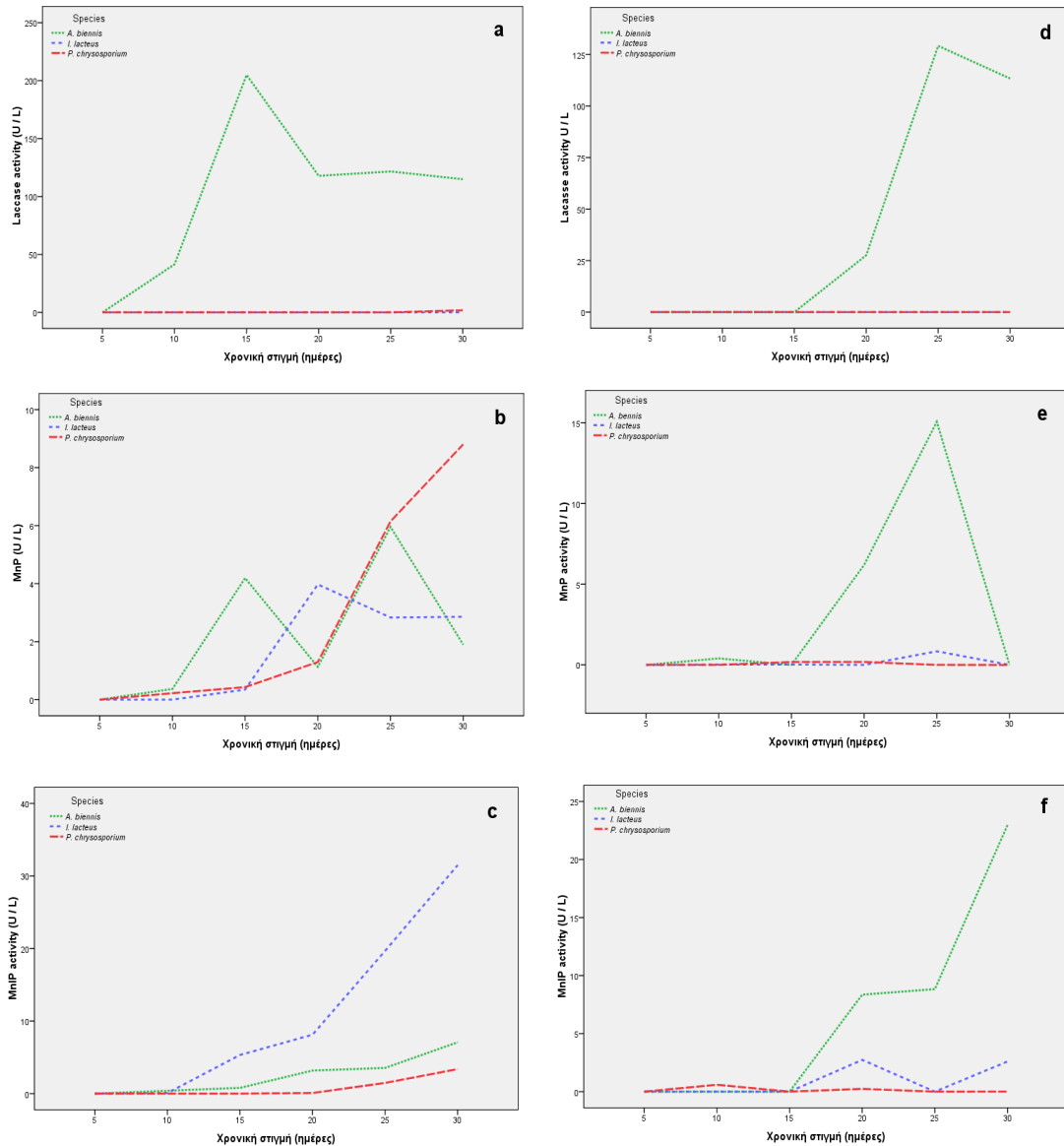


Γράφημα 2.7.3. Μυκηλιακή βιομάζα (g) τριών επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων που παρήχθησε σε YAE αραιωμένα σε νερό (25% v/v) ή μη (100% YAE) για διάστημα επώασης 25 ημερών.

Αντίθετα στον αποχρωματισμό, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αραιώσεων με εξαίρεση του είδος *Ph. chrysosporium* στο οποίο μετρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη μείωση του χρώματος στο μη αραιωμένο θρεπτικό υλικό (57% έναντι 36% στο αραιωμένο, Γράφημα 2.7.4.).



Γράφημα 2.7.4. Ποσοστό μείωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος σε σχέση με τον μάρτυρα (μη εμβολιασμένο υπόστρωμα) κατά την ανάπτυξη τριών επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων, σε υπόστρωμα ΥΑΕ αραιωμένο με νερό (25% v/v) [α και c αντίστοιχα] ή μη αραιωμένο [εικόνες b και d αντίστοιχα] για διάστημα επώασης 25 ημερών.



**Γράφημα 2.7.5.** Ενεργότητα των ενζύμων λακκάση (Lac), υπεροξειδάση εξαρτημένη του μαγγανίου (MnIP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (MnIP) από τρία επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων ανεπτυγμένα σε υπόστρωμα YAE αραιωμένο με νερό (25% v/v) [a, b και c αντίστοιχα] ή μη αραιωμένο [d, e και f αντίστοιχα] για διάστημα 25 ημερών.

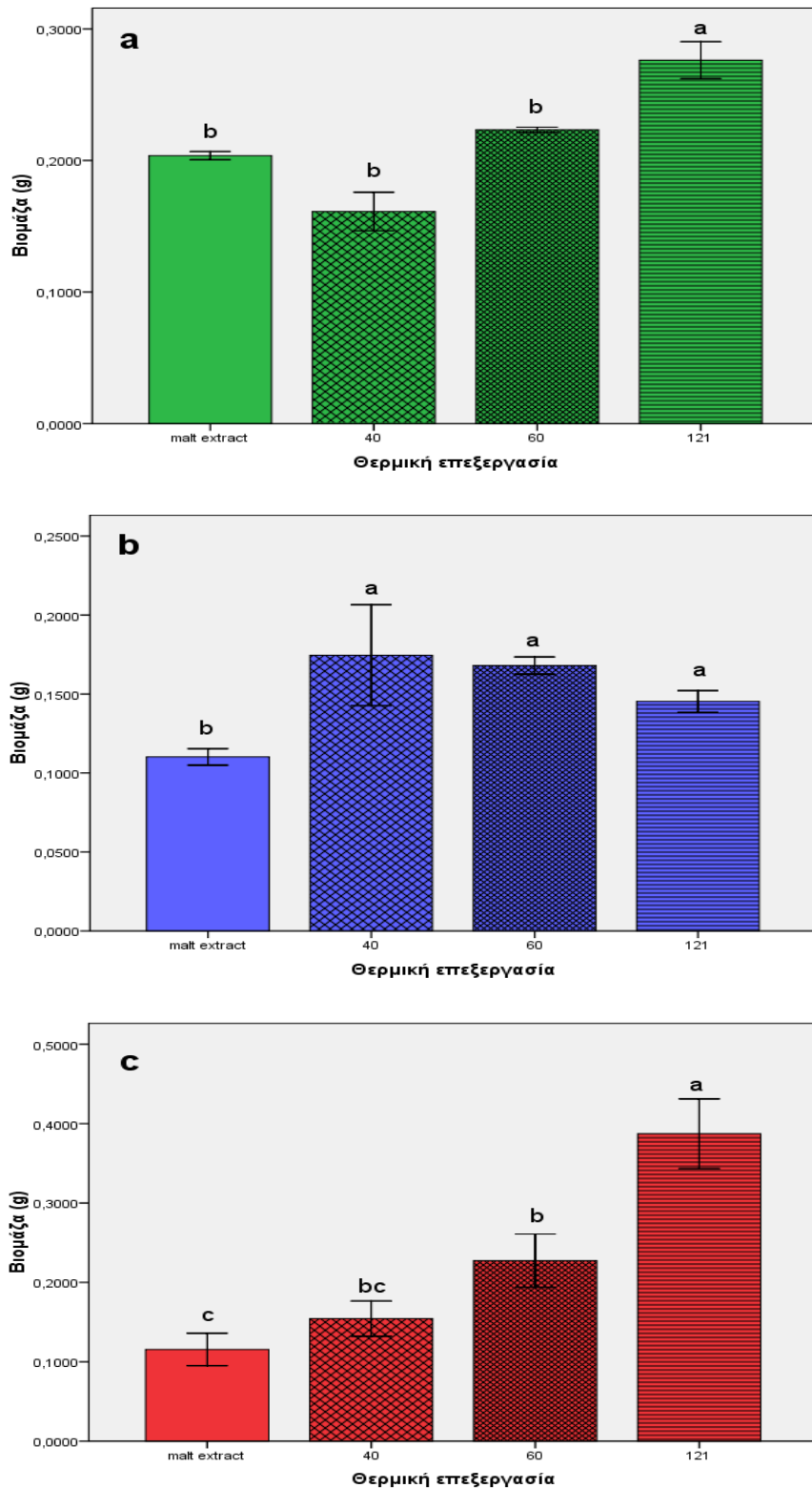
Ενεργότητα της λακκάσης μετρήθηκε μόνο για το είδος *A. biennis*. Σε πρόσφατες εργασίες εξάλλου έχει αναφερθεί η αδυναμία του *I. lacteus* να επάγει τον σχηματισμό του συγκεκριμένου ενζύμου (Xu et al., 2009, Salvachua et al., 2013), ενώ υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη δυνατότητα παραγωγής του ή μη από το *Ph. chrysosporium*, που πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά στελέχη και τη διαφορετική σύσταση του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση (Gassara et al., 2010, Podgornik et al., 2001). Γενικά, η παραγωγή της λακκάσης από το *A. biennis* εμφανίστηκε πιο πρώιμα στο αραιωμένο υπόστρωμα (από την 5<sup>η</sup> ημέρα), ενώ καθυστέρησε σημαντικά στο μη αραιωμένο υλικό (μετά την 15<sup>η</sup> ημέρα). Και στις δύο περιπτώσεις το μέγιστο της ενεργότητας

σημειώθηκε στα ενδιάμεσα στάδια της καλλιέργειας (την 10<sup>η</sup> και 20<sup>η</sup> ημέρα αντίστοιχα), ενώ μετά την πάροδο 25 ημερών οι τιμές ήταν παρόμοιες για τις δύο επεμβάσεις (113 και 115 U/L). Επιπλέον, στο *A. biennis*, προσδιορίστηκαν υψηλές τιμές ενεργότητας υπεροξειδασών (MnP και MnIP). Η μέγιστη παραγωγή παρατηρήθηκε κατά τα τελευταία στάδια της καλλιέργειας (μετά την 20<sup>η</sup> ημέρα και για τις δύο επεμβάσεις), ενώ στο μη αραιωμένο ΥΑΕ καταγράφηκε τριπλάσια τιμή ενεργότητας υπεροξειδασών συγκριτικά με το αραιωμένο υλικό. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή παραγωγή λακκάσης του *A. biennis* συνέβαλαν στη σημαντική μείωση των ρυπαντικών παραμέτρων στο μη αραιωμένο υλικό (Γράφημα 2.7.5) σε σύγκριση με τα άλλα δύο είδη. Η μείωση των ολικών φαινολικών και του χρώματος στα είδη *I. lacteus* και *Ph. chrysosporium* συνδέθηκε όπως και στο προηγούμενο πείραμα (Παράγραφος 2.7.3.3) με την παραγωγή υπεροξειδασών. Στην παρούσα δοκιμή η ενεργότητα και των δύο ενζύμων ήταν σημαντικά υψηλότερη στο αραιωμένο υλικό, όπου οι μέγιστες τιμές σημειώθηκαν προς το τελικό στάδιο της καλλιέργειας και για τα δύο είδη (μετά την 20<sup>η</sup> ημέρα, Γράφημα 2.7.5).

#### 2.7.3.4.2 Επίδραση της θερμικής προεπεξεργασίας των ΥΑΕ στη βιοαποδόμηση τους από επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων.

Η μελέτη της δυνατότητας αποδόμησης των ΥΑΕ από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, προϋποθέτει την αποστείρωση του υπό εξέταση υλικού, λόγω του υψηλού αυτόχθονου μικροβιακού φορτίου του (Ntougias et al., 2013). Ωστόσο η αποστείρωση των υποστρωμάτων που περιέχουν ΥΑΕ σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, επιφέρει σημαντικές φυσικοχημικές μεταβολές με αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας τους (Fountoulakis et al., 2002). Επιπλέον οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί (μύκητες και βακτήρια) των ΥΑΕ έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στην αποδόμηση και σταδιακή αποτοξικοποίηση των εν λόγω αποβλήτων (Morillo et al., 2009, Ntougias et al., 2013). Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η επίδραση εναλλακτικής της αποστείρωσης θερμικής κατεργασίας στο αρχικό υλικό (πριν τον εμβολιασμό με τα επιλεγμένα στελέχη).

Τα είδη *A. biennis* και *Ph. chrysosporium* αναπτύχθηκαν καλύτερα στο αποστειρωμένο ΥΑΕ παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις. Αντίθετα, το *I. lacteus* σχημάτισε περισσότερη βιομάζα στα υποστρώματα που είχε εφαρμοστεί η μικρότερη θερμοκρασία (40 °C για 6h) και έβαινε μειούμενη με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την προεπεξεργασία του αποβλήτου. Παρόλο που το αποστειρωμένο



Γράφημα 2.7.6. Μυκηλιακή βιομάζα των ειδών (a) *A. biennis*, (b) *I. lacteus* και (c) *Ph. chrysosporium* μετά την καλλιέργεια τους σε malt extract, παστεριωμένο ΥΑΕ (40 °C για 6h ή 60 °C για 2h) ή αποστειρωμένο ΥΑΕ (25% με νερό) για 35 ημέρες. Τα γράμματα πάνω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν τις στατιστιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ).

υλικό εμφάνιζε την υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών (19% μεγαλύτερη σε σχέση με το παστεριωμένο), η πιθανή ύπαρξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στα παστεριωμένα μέσα φαίνεται να παρεμπόδιζε μερικώς την ανάπτυξη των *A. biennis* και *Ph. chrysosporium*, Αντίθετα η υψηλότερη βιομάζα που ανέπτυξε το *I. lacteus* στο παστεριωμένο υπόστρωμα, ίσως να οφείλεται στην μικρότερη τοξικότητα (λόγω χαμηλότερης συγκέντρωσης φαινολικών) συγκριτικά με το αποστειρωμένο υλικό.

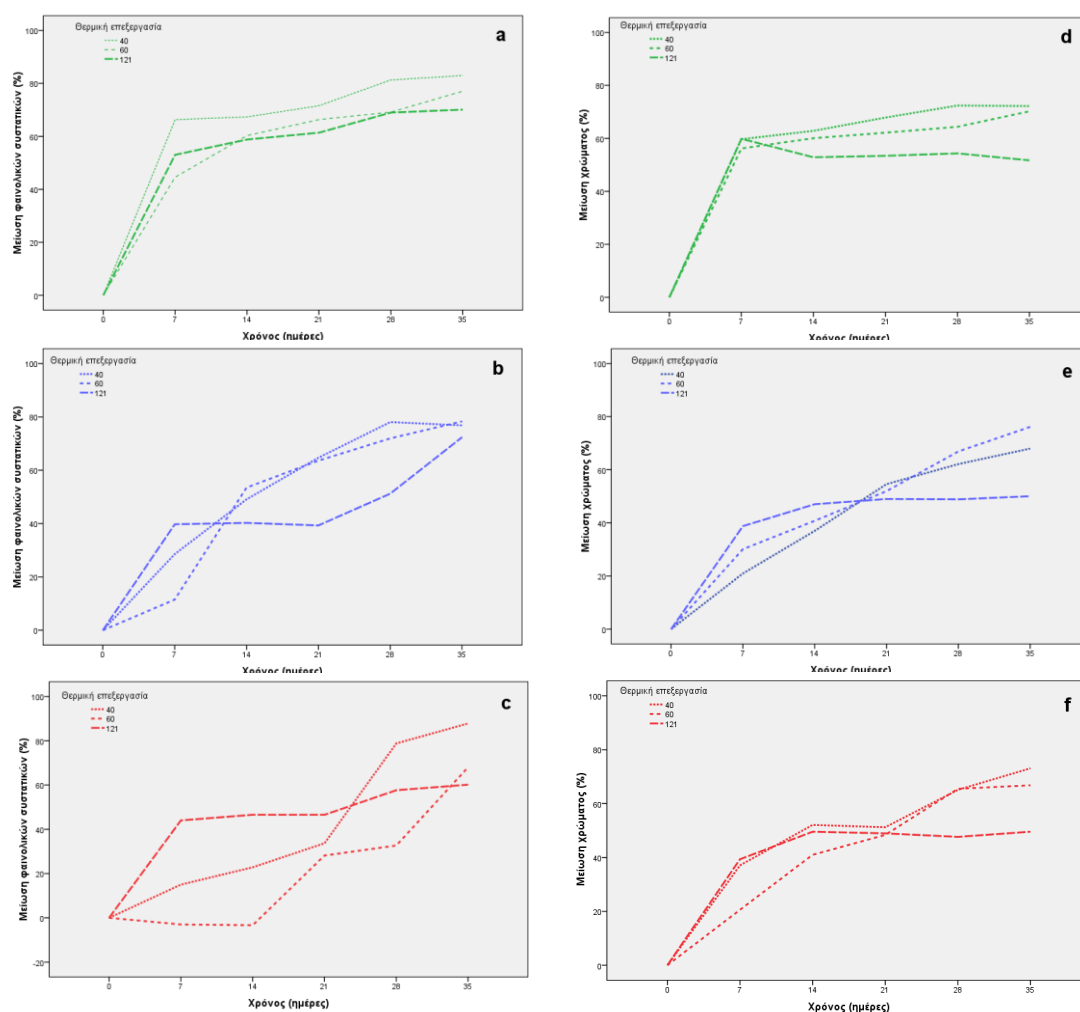
Με βάση τις μετρήσεις της συνολικής μυκηλιακής βιομάζας των τριών στελεχών, γίνεται αντιληπτό ότι παρά την διαδεδομένη χρήση του malt extract ως κοινό θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη μυκήτων, στα ΥΑΕ υπήρξε μεγαλύτερη μυκηλιακή ανάπτυξη πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης και πιο μακροπρόθεσμης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών.

Η τελική μείωση των ολικών φαινολικών φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση που εφαρμόστηκε η μικρότερη θερμοκρασία προεπεξεργασίας και για τα τρία στελέχη (Γράφημα 2.7.7), αλλά η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντικές για τα δύο από αυτά (*A. biennis* και *Ph. chrysosporium*). Όπως προκύπτει από το Γράφημα 2.7.7, με τη χρήση του *A. biennis* επιτεύχθηκε η μεγαλύτερη μείωση φαινολικών κατά τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας (58 έως 66% εντός των πρώτης εβδομάδας), ενώ πιο αργή μείωση σημειώθηκε στα άλλα δύο είδη. Με ανάλογο τρόπο επιτεύχθηκε ο μέγιστος αποχρωματισμός στα μη αποστειρωμένα ΥΑΕ και για τα τρία είδη. Ωστόσο σε αυτό μπορεί να συνέβαλε το γεγονός ότι με την αποστείρωση, το χρώμα του αποβλήτου αυξήθηκε σημαντικά (τιμή απορρόφησης αποστειρωμένου υποστρώματος: 0,73 έναντι τιμών 0,52 και 0,54 των παστεριωμένων ΥΑΕ). Στο παρελθόν έχει μελετηθεί εκτενώς η αναερόβια αποδόμηση ΥΑΕ με τη χρήση αυτόχθονων μικροοργανισμών (Bertin et al., 2004, Chen et al., 2009, Rizzi et al., 2006), ενώ λιγότερη έμφαση έχει δοθεί στην ανάπτυξη αερόβιων διαδικασιών. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί, λόγω της προσαρμογής τους στις ιδιαίτερες συνθήκες των ΥΑΕ, μπορούν να αναπτυχθούν ταχύτερα από τους μύκητες λευκής σήψης και να επιφέρουν σημαντική μείωση του ρυπαντικού του φορτίου (Morillo et al., 2008).

Όσον αφορά την παραγωγή ενζύμων, παραγωγή λακκάσης ανιχνεύτηκε στις καλλιέργειες των ειδών *A. biennis* και *I. lacteus* χωρίς να παρουσιάζει διαφορετική τάση μεταξύ των τριών επεμβάσεων (Γράφημα 2.7.8). Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις οι τιμές της ενεργότητας της ήταν σημαντικά μικρότερες στη χαμηλότερη θερμοκρασία προεπεξεργασίας (40 °C για 6h). Επιπλέον στο *A. biennis* η μέγιστη τιμή (178 U/l την 7η ημέρα ανάπτυξης) ήταν στατιστικά υψηλότερη στο αποστειρωμένο υλικό συγκριτικά και με τις δύο μεθόδους παστερίωσης. Αντίθετα δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές



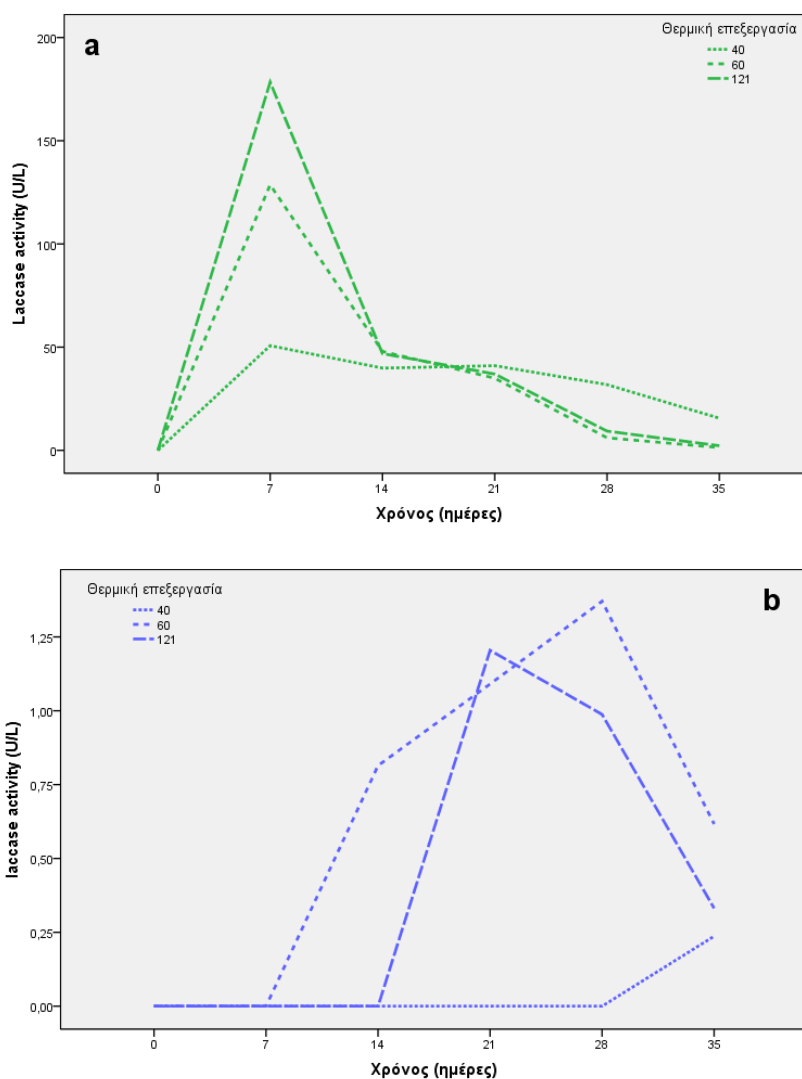
στην παραγωγή λακκάσης για το είδος *I. lacteus*. Παρομοίως, η παραγωγή της ΜhP ήταν μεγαλύτερη στο αποστειρωμένο υπόστρωμα, αλλά δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των τριών επεμβάσεων με εξαίρεση το είδος *P. chrysosporium* (Γράφημα 2.7.8). Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, η παραγωγή της ΜhP ήταν σχεδόν μηδενική στο αποστειρωμένο υλικό και αρκετά υψηλότερη στο παστεριωμένο ειδικά τις τελευταίες ημέρες της καλλιέργειας και στα τρία στελέχη που μελετήθηκαν (Γράφημα 2.7.8).



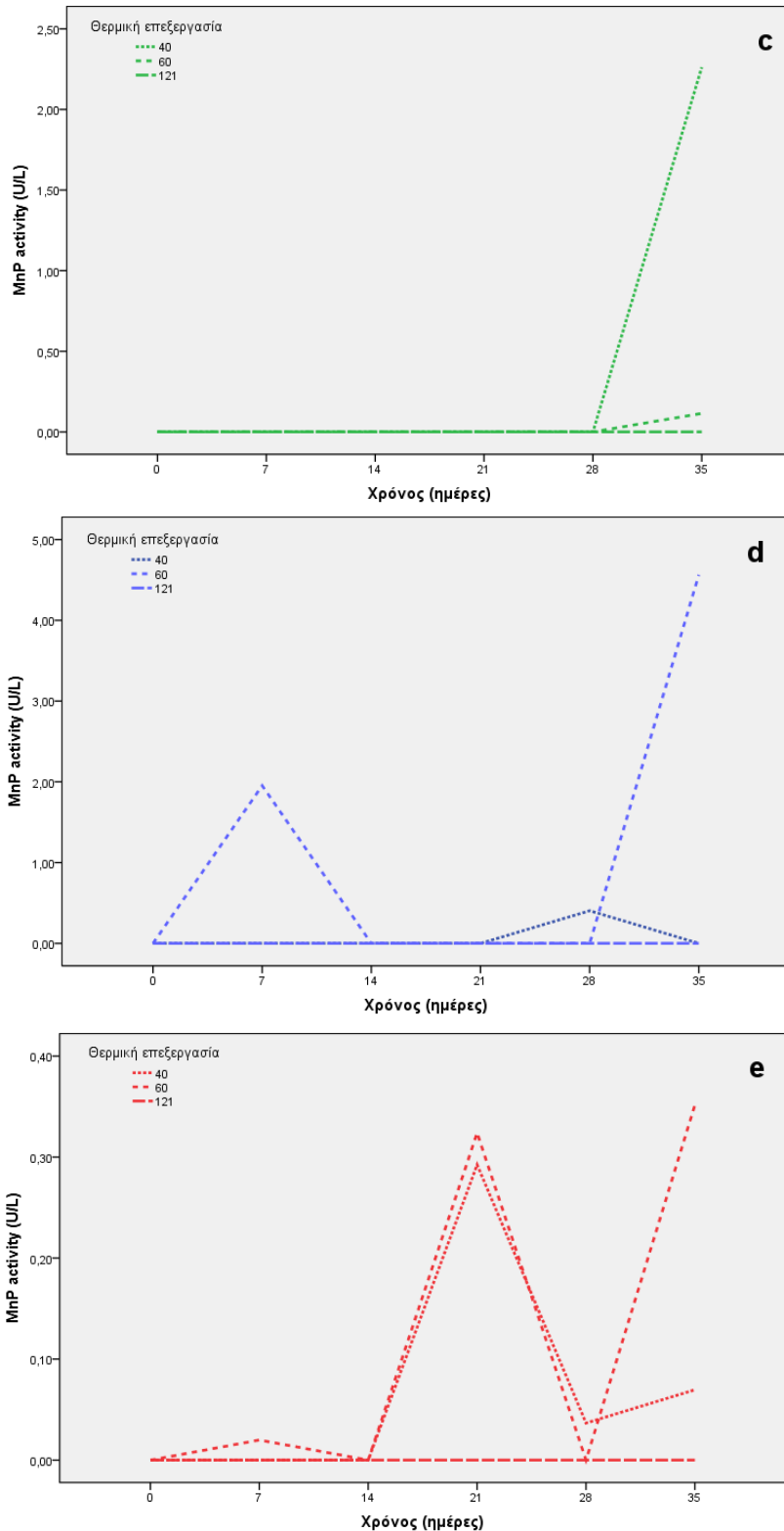
**Γράφημα 2.7.7.** Μείωση των ολικών φαινολικών και του χρώματος κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των μυκήτων *A. biennis* (a, d), *I. lacteus* (b, e) και *Ph. chrysosporium* (c, f) σε παστεριωμένο ΥΑΕ (40 °C για 6h ή 60 °C για 2h) ή αποστειρωμένο ΥΑΕ (25% με νερό) για διάστημα 35 ημερών.

Με δεδομένη την αδυναμία αποστείρωσης στην τεράστιων όγκων υγρών αποβλήτων που παράγονται κάθε χρόνο επιλέχθηκε να δοκιμαστεί στα πλαίσια του παραπάνω πειράματος η παστερίωση του υλικού στους 40 ή τους 60 °C. Οι θερμοκρασίες αυτές μπορούν να επιτευχθούν με πολύ χαμηλότερο κόστος εγκατάστασης και δαπάνη ενέργειας ή ακόμη και με φυσικό τρόπο μέσω της δραστηριότητας των αυτόχθονων μικροοργανισμών ή την

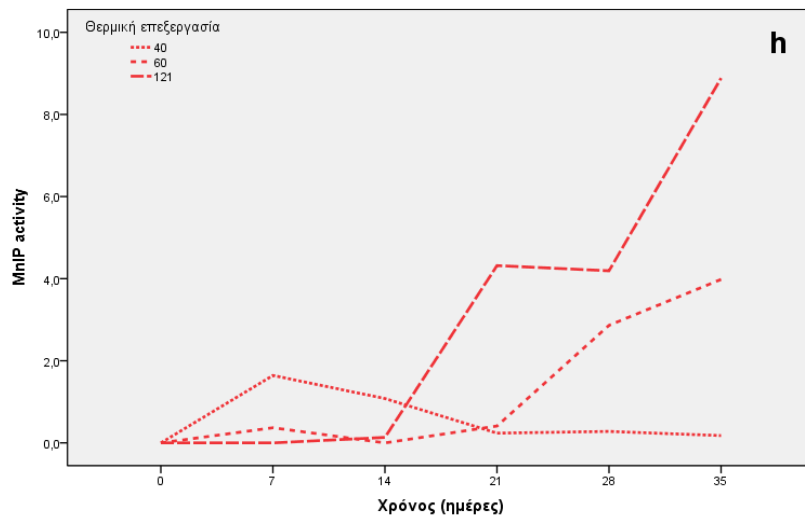
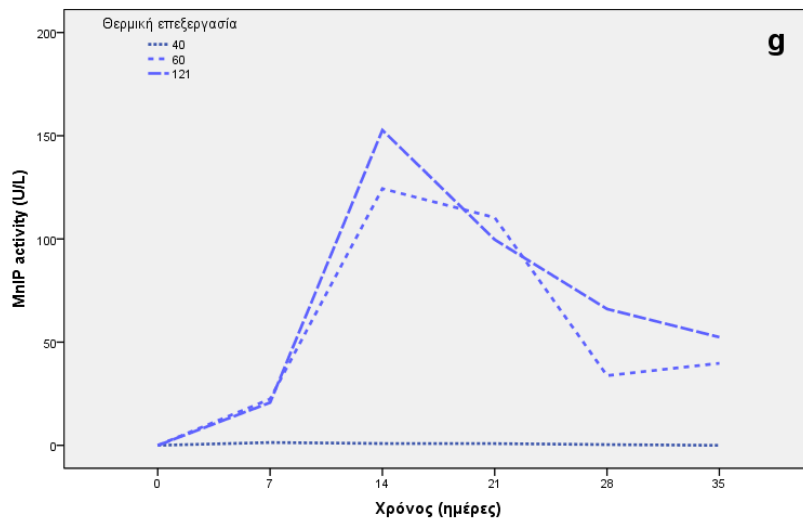
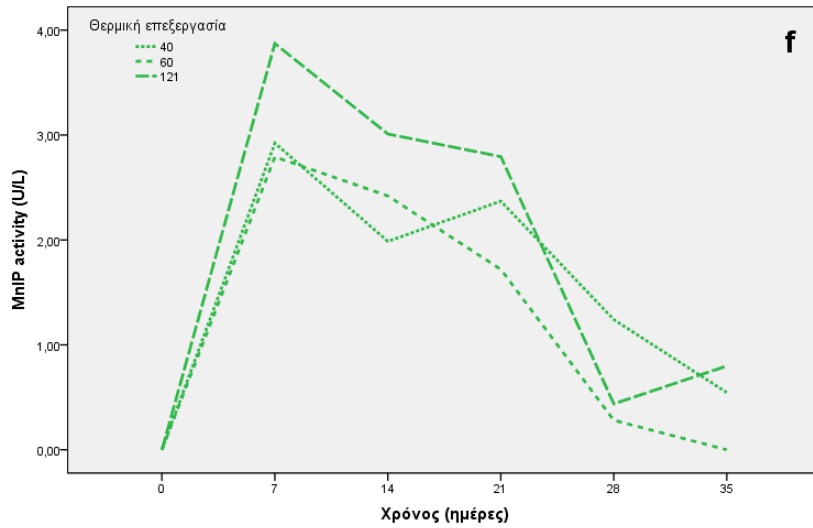
αξιοποίηση της ηλιακής ακτινοβολίας. Επομένως, τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που αφορούν τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου σε παστεριωμένο ΥΑΕ, ανοίγουν το δρόμο για την χρήση των μυκήτων λευκής σήψης σε εφαρμογές βιοεπεξεργασίας σε μεγαλύτερη κλίμακα.



Γράφημα 2.7.8. Ενεργότητα (U/L) του ενζύμου λακκάση που παράχθηκε από τους μύκητες *A. biennis* και *I. lacteus* με πράσινο και κυανό χρώμα αντίστοιχα) μετά την καλλιέργεια τους σε ΥΑΕ (25% με νερό) παστεριωμένο (40 °C για 6h ή 60 °C για 2h) ή αποστειρωμένο (25% με νερό) για διάστημα επώασης 35 ημερών.



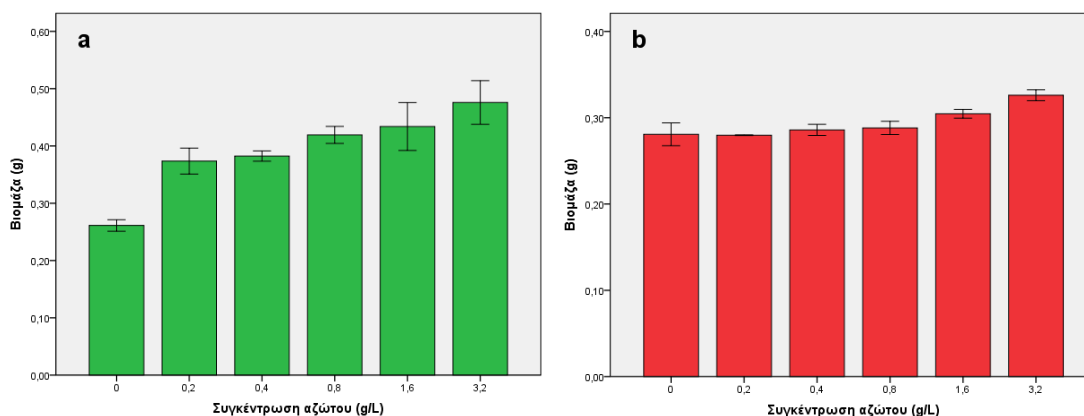
Γράφημα 2.7.8. Ενεργότητα (U/L) του ενζύμου υπεροξειδάση του Mn (MnP) που παρήχθη από τους μύκητες *A. biennis*, *I. lacteus* και *Ph. chrysosporium* (με πράσινο, κυανό και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα) μετά την καλλιέργεια τους σε ΥΑΕ (25% με νερό) παστεριωμένο (40 °C για 6h ή 60 °C για 2h) ή αποστειρωμένο για διάστημα επώασης 35 ημερών.



Γράφημα 2.7.8. Ενεργότητα (U/L) του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MniP) που παρήχθη από τους μύκητες *A. biennis*, *I. lacteus* και *Ph. chrysosporium* (με πράσινο, κυανό και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα) μετά την καλλιέργεια τους σε ΥΑΕ (25% με νερό) παστεριωμένο (40 °C για 6h ή 60 °C για 2h) ή αποστειρωμένο για διάστημα επώασης 35 ημερών.

### 2.7.3.4.3 Επίδραση της προσθήκης ανόργανου αζώτου στη διαδικασία αποτοξικοποίησης ΥΑΕ με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων λευκής σήψης

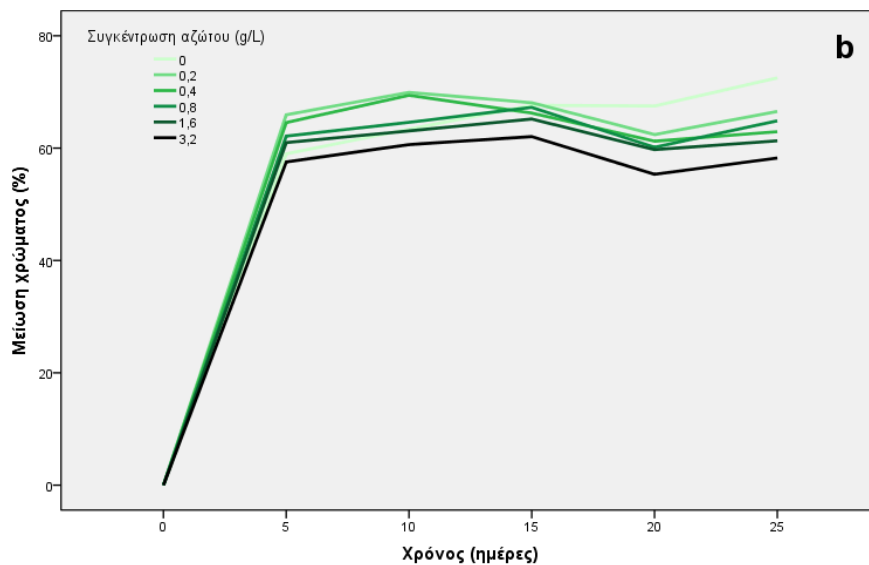
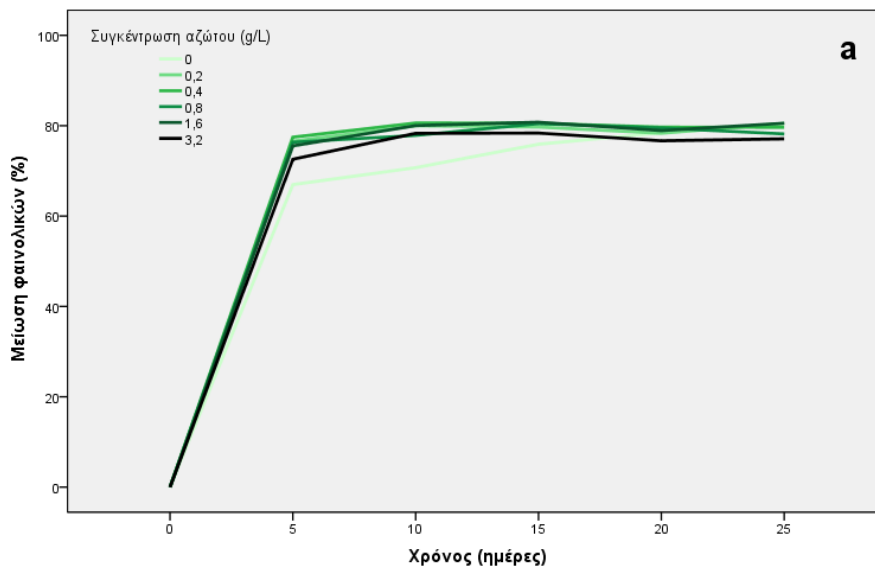
Το στέλεχος *Abortiporus biennis* ABL 436 αξιολογήθηκε με βάση τα πειράματα που προηγήθηκαν, ως το πλέον γρήγορο και αποδοτικό στη μείωση επιλεγμένων ρυπαντικών παραμέτρων των ΥΑΕ μεταξύ 60 στελεχών της συλλογής καθαρών καλλιεργειών του ΕΓΓΜ - ΓΠΑ, ενώ το είδος *Ph. chrysosporium* -όπως προαναφέρθηκε- είναι από τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα σε περιπτώσεις επεξεργασίας αποβλήτων. Ως εκ τούτου, τα δύο στελέχη επιλέχθηκαν για να διερευνηθεί η δυνατότητα περαιτέρω βελτιστοποίησης της αποδόμησης ΥΑΕ μέσω του εμπλουτισμού του αποβλήτου με ανόργανο άζωτο και μέταλλα (Cu και Mn) που αποδεδειγμένα επηρεάζουν την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων. Η συγκέντρωση αζώτου είναι πολύ χαμηλή στα ΥΑΕ και εξαιρουμένης της τοξικότητας αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μυκήτων (Zerva et al., 2016). Συν τοις άλλοις, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πως η έλλειψή του επιδρά στην παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων (Grinhut et al., 2011, Jing, 2010; Kachlishvili et al., 2006, Mansur et al., 1998). Επιπροσθέτως, η ενεργότητα των ενζύμων λακκάση και υπεροξειδάση του Mn έχει αποδειχθεί να αυξάνεται με την προσθήκη χαλκού και μαγγανίου αντίστοιχα στα διαλύματα ανάπτυξης (Baldrian et al., 2005, Levin et al., 2002, Yamanaka et al., 2008).

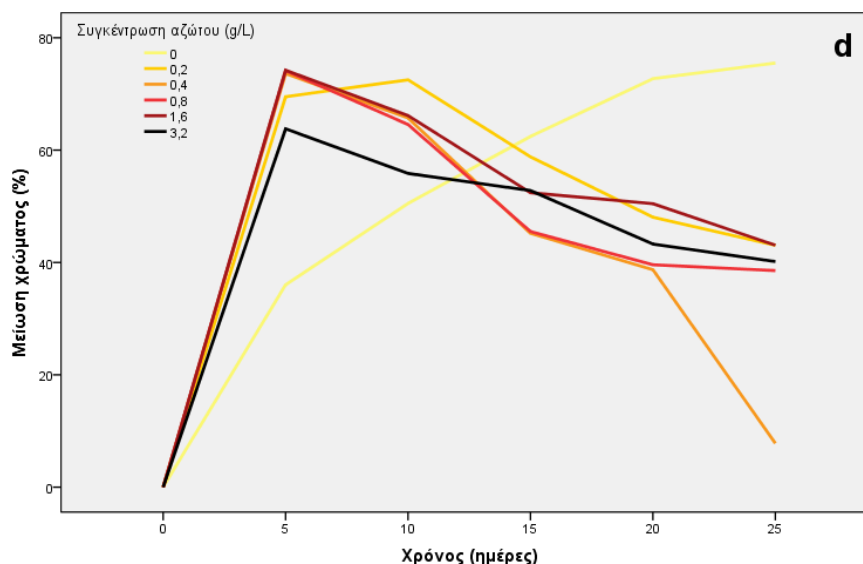
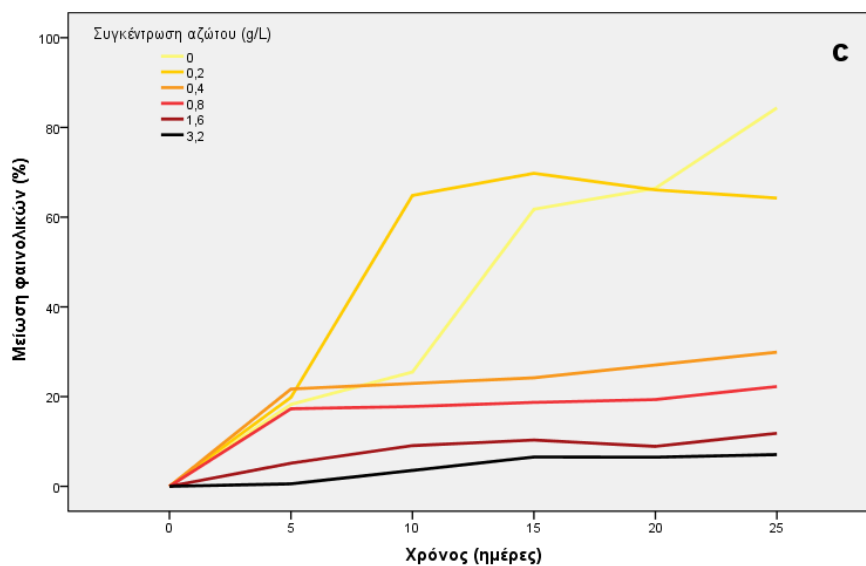


**Γράφημα 2.7.9.** Παραγωγή βιομάζας των ειδών *A. biennis* και *Ph. chrysosporium* σε ΥΑΕ (25% με νερό) με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 και 3,2 g/l) μετά από διάστημα 25 ημερών. Τα γράμματα πάνω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν τις στατιστιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ).

Σύμφωνα με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, η προσθήκη αζώτου οδήγησε στη αύξηση της μυκηλιακής βιομάζας και στα δύο στελέχη, παρόλο που στατιστικά σημαντική (θετική) επίπτωση παρατηρήθηκε μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (3,2 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) για το *Ph. chrysosporium* (Γράφημα 2.7.9). Αντιθέτως, στο *A.*

*biennis* σημαντική διαφορά επισημάνθηκε σε όλες τις επεμβάσεις που περιείχαν επιπλέον άζωτο συγκριτικά με το μάρτυρα (0.26 g/100ml), χωρίς όμως να διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά όταν η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0,8 έως 3,2 g/l. Στις καλλιέργειες του *A. biennis* το τελικό ποσοστό μείωσης (μετά από 25 ημέρες) των ολικών φαινολικών δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων (77 – 81%), σε αντίθεση με το χρώμα, το οποίο μειώθηκε περισσότερο στον μάρτυρα (73%) σε σύγκριση με τα διαλύματα στα οποία προστέθηκε επιπλέον άζωτο (58 – 67%).





Γράφημα 2.7.10. Μείωση ολικών φαινολικών και χρώματος σε ΥΑΕ (25% με νερό) κατά την διάρκεια καλλιέργειας των μυκήτων *A. biennis* (a, b) και *Ph. chrysosporium* (c, d) σε διάφορες συγκεντρώσεις αζώτου (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 και 3,2 g/l) μετά από διάστημα επώασης 25 ημερών.

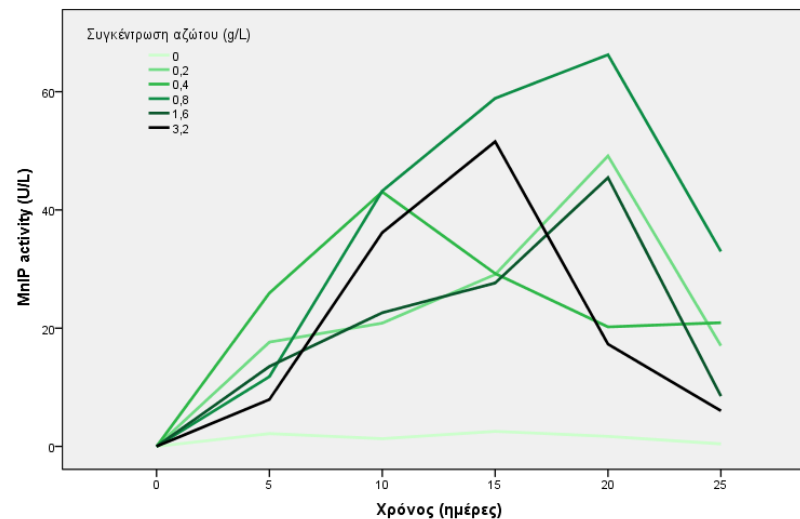
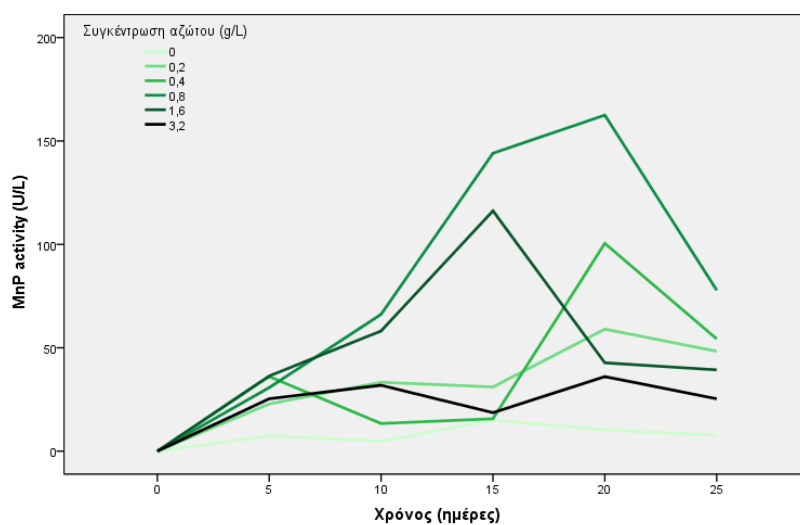
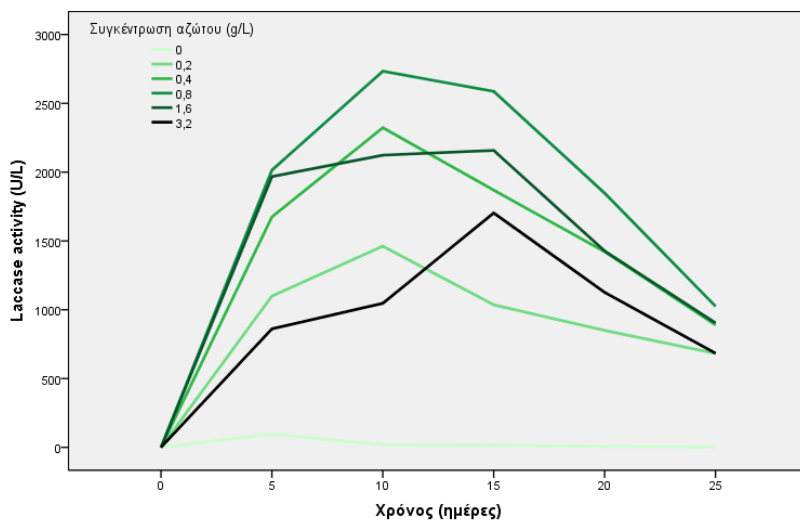
Η ταχύτερη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών στις καλλιέργειες του *Ph. chrysosporium* επιτεύχθηκε όταν προστέθηκε  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  σε συγκέντρωση 0,2 g/l (72,5% στις 10 πρώτες ημέρες) διαφέροντας σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Με την ολοκλήρωση όμως του πειράματος, αποδείχθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  είχε αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τη μείωση των φαινολικών συστατικών (Γράφημα 2.7.10). Με παρόμοιο τρόπο μεταβλήθηκε και το χρώμα στα ΥΑΕ υπό την επίδραση της προσθήκης αζώτου στο είδος *Ph. chrysosporium*. Κατά τις πρώτες 5 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του (έως και 75%) στις περιπτώσεις που προστέθηκε επιπλέον άζωτο στο απόβλητο, αλλά με το πέρας της καλλιεργητικής διαδικασίας (25 ημέρες)

η σημαντικότερη μείωση μετρήθηκε στις καλλιέργειες που δεν περιείχαν επιπλέον άζωτο. Σε παρόμοια μελέτη των Zerva et al (2016) για την αποτοξικοποίηση ΥΑΕ με τη βοήθεια των μυκήτων *Irpex lacteus* και *Pleurotus citrinopileatus* φάνηκε ότι η προσθήκη ανόργανου αζώτου με τη μορφή  $\text{KNO}_3$  ή  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  είχε αρνητική επίδραση στην ελάττωση των ολικών φαινολικών σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ μόνο η προσθήκη  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (10 g /l) συνέβαλε στη μείωση του χρώματος. Αντίθετα και στα δύο είδη σημαντική μείωση των προαναφερθέντων ρυπαντικών παραγόντων επετεύχθη με την προσθήκη αζώτου οργανικής προέλευσης (corn steep liquor ή diammonium tartrate). Πρέπει όμως να τονιστεί, ότι στατιστικά σημαντικότερη αποτοξικοποίηση και στα δύο είδη παρατηρήθηκε όταν η προσθήκη των οργανικών πηγών αζώτου ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή που δοκιμάστηκε στην παρούσα εργασία (10 – 30 g/l).

Η παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων από το *A. biennis* επηρεάστηκε θετικά από την προσθήκη του ανόργανου αζώτου. Όλες οι επεμβάσεις στις οποίες έγινε εμπλουτισμός εμφάνισαν τιμές ενεργότητας (και των τριών ενζύμων που μελετήθηκαν) σημαντικά υψηλότερες από τον μάρτυρα, με τη μέγιστη τιμή να ανιχνεύεται σε όλες τις περιπτώσεις στο διάλυμα που περιείχε 0,8 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Γράφημα 2.7.11). Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι μολονότι σημειώθηκε μεγάλη αύξηση στις τιμές της ενζυμικής ενεργότητας, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή ούτε στον χρόνο επαγωγής αλλά ούτε και στις χρονικές στιγμές που λαμβάνονταν οι μέγιστες τιμές και για τα τρία ένζυμα που μελετήθηκαν (Lac, MnP και MnIP). Στην περίπτωση του *Ph. chrysosporium* δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα της λακκάσης. Σημαντική αύξηση προκλήθηκε στην ενεργότητα των MnP και MnIP από την προσθήκη 0,2 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ενώ η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής αζώτου μείωσε την ενζυμική παραγωγή ακόμη και σε επίπεδα που δεν ανιχνεύονταν (Γράφημα 2.7.12).

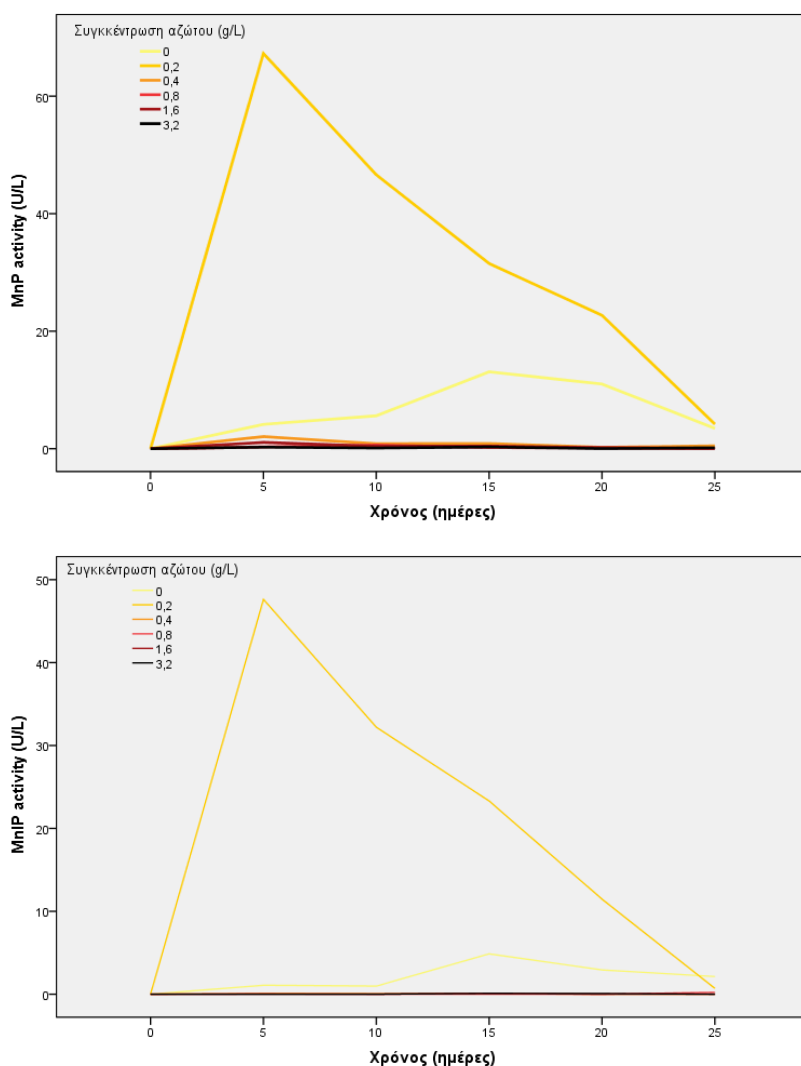
Στο πρόσφατο παρελθόν έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη αζώτου ή/και εύκολα αφομοιώσιμων πηγών άνθρακα όπως η πεπτόνη ή το εκχύλισμα βύνης (malt extract) αυξάνει κατά πολύ την παραγωγή των Lac και MnP σε μύκητες λευκής σήψης (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Trametes trogii*) σε συνθήκες στερεάς ζύμωσης λιγνοκυτταρινούχων παραπροϊόντων όπως τα υπολείμματα ξύλου (Levin et al., 2008, Vršanská et al., 2018). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος, το είδος *A. biennis* παράγει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για την αποδόμηση των φαινολικών των ΥΑΕ και η θετική επίδραση που ασκεί στην ενζυμική παραγωγή η προσθήκη αζώτου δεν διαφοροποιεί σημαντικά τον βαθμό





Γράφημα 2.7.11. Ενεργότητα (U/L) των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση του Mn και υπεροξειδάση ανεξάρτητης του Mn που παρήχθησαν από τον μύκητα *A. biennis*) μετά την καλλιέργεια του επί 25 ημέρες σε YAE (25% με νερό) εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 και 3,2 g/l).

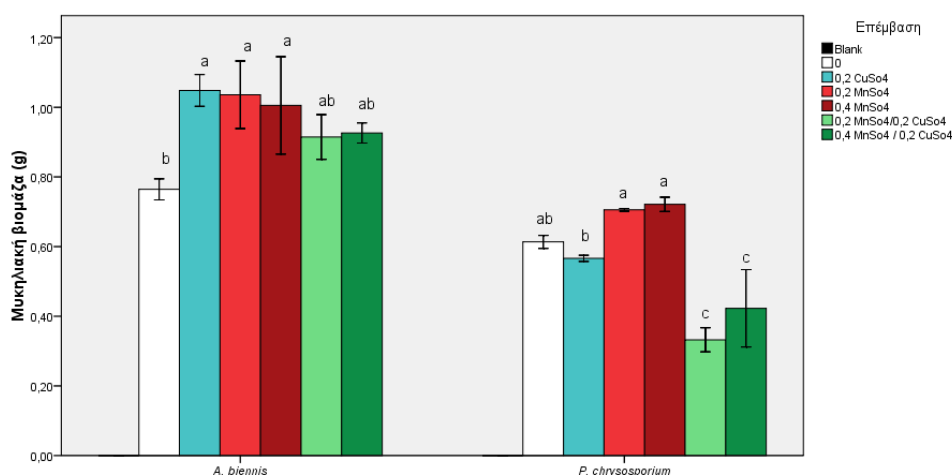
αποτοξικοποίησης. Συνεκτιμώντας τα παραπάνω αποτελέσματα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα (Kachlishvili et al., 2006, Zerva et al., 2016) φαίνεται ότι η διαθεσιμότητα αζώτου επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων. Επιπλέον, η προσθήκη αζώτου ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις αυξάνει σημαντικά την παραγωγή της MnIP τόσο στα είδη που μελετήθηκαν όσο και στο *I. lacteus* (Rothschild et al., 2002, Salvachua et al., 2013 Zerva et al., 2016).



**Γράφημα 2.7.12.** Ενεργότητα (U/L) των ενζύμων υπεροξειδάση του Mn και υπεροξειδάση ανεξάρτητης του Mn που παρήχθησαν από τον μύκητα *Ph. chrysosporium* μετά την καλλιέργεια του επί 25 ημέρες σε ΥΑΕ (25% με νερό) εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 και 3,2 g/l).

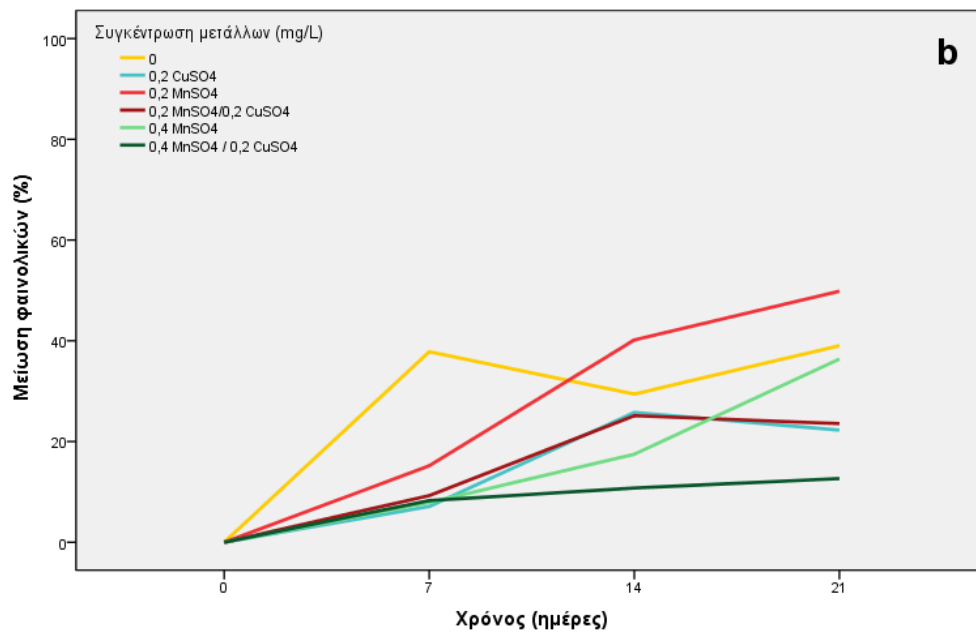
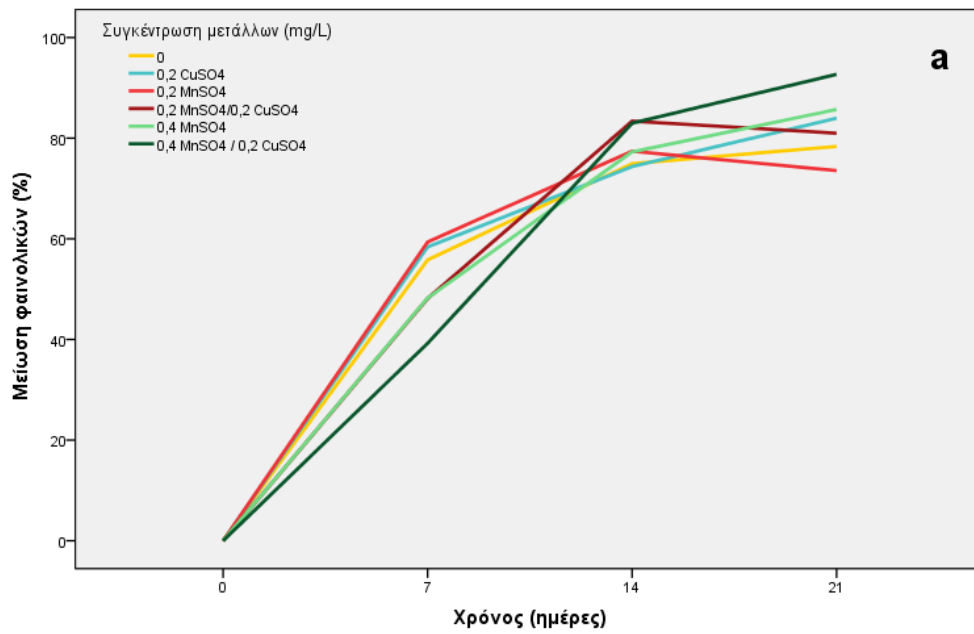
#### 2.7.3.4.4 Επίδραση της προσθήκης χαλκού και μαγγανίου στη διαδικασία αποτοξικοποίησης ΥΑΕ με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων

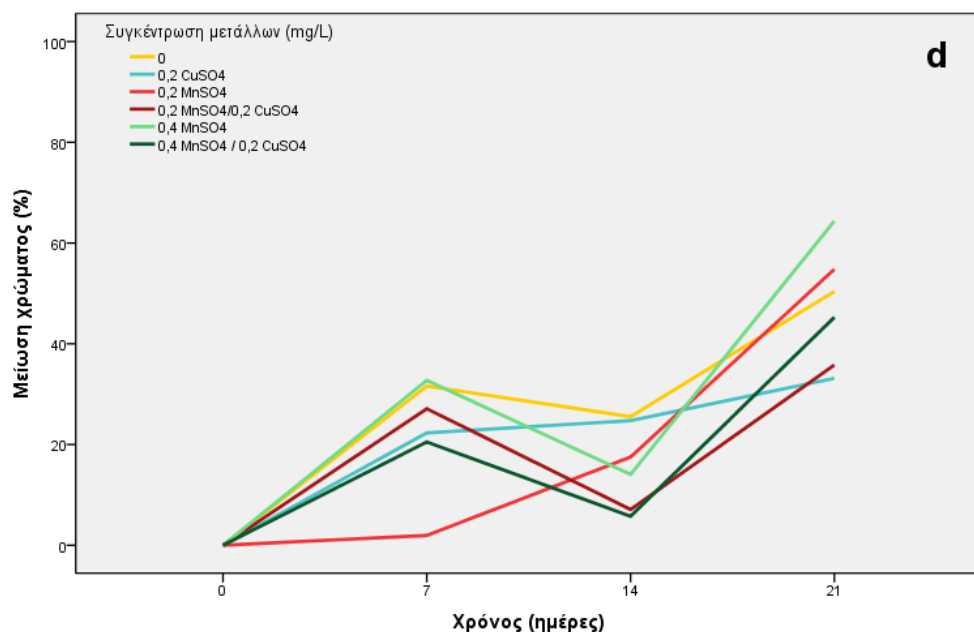
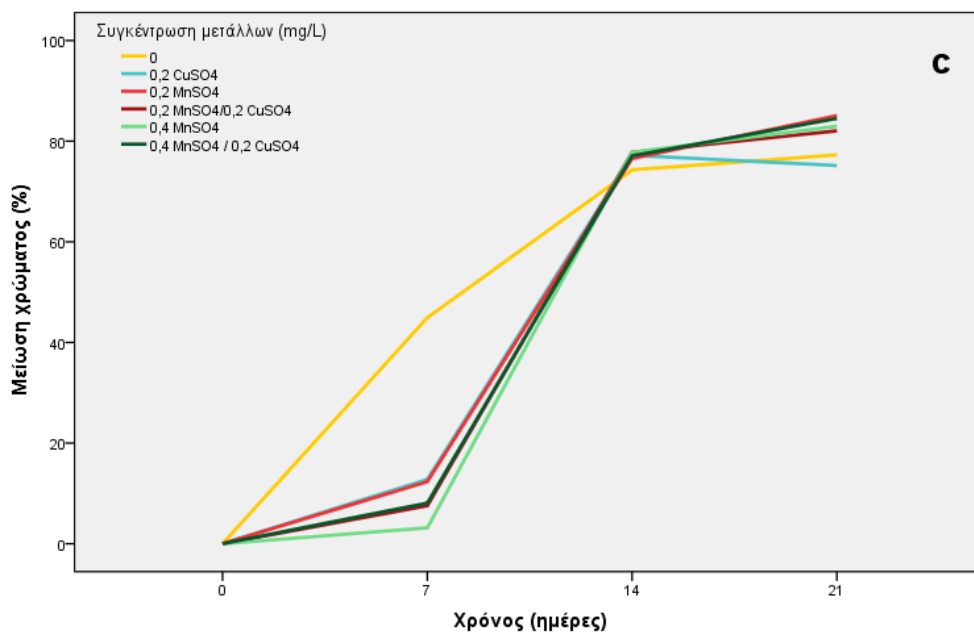
Η προσθήκη χαλκού και μαγγανίου επηρέασε σημαντικά τον σχηματισμό της μυκηλιακής βιομάζας στα δύο είδη που μελετήθηκαν (Γράφημα 2.7.13). Στην περίπτωση του *A. biennis* τόσο η προσθήκη μαγγανίου ( $MnSO_4$ ) όσο και του χαλκού ( $CuSO_4$ ) οδήγησαν σε στατιστικά μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ανάλογη αύξηση σημειώθηκε και στην περίπτωση του *Ph. chrysosporium* αλλά μόνο με την προσθήκη  $MnSO_4$ . Τέλος, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι και στα δύο είδη, η συνδυασμένη χρήση  $CuSO_4$  και  $MnSO_4$  επέφερε μείωση της παραγόμενης βιομάζας σε σχέση με την προσθήκη του καθενός ανεξάρτητα.



**Γράφημα 2.7.13.** Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας των ειδών *A. biennis* και *Ph. chrysosporium* κατά την ανάπτυξη τους σε διαλύματα ΥΑΕ (25% με νερό) για διάστημα επώασης 21 ημερών, μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων των  $CuSO_4$  (0,2 και 0,4 mg/l) ή/και  $MnSO_4$  (0,2 και 0,4 mg/l).

Ο εμπλουτισμός των ΥΑΕ με τα άλατα των μετάλλων είχε θετική επίδραση τόσο στην μείωση των φαινολικών συστατικών όσο και του χρώματος του αποβλήτου (Γράφημα 2.7.14). Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση των ολικών φαινολικών επετεύχθη με την προσθήκη 0,4  $MnSO_4$  / 0,2  $CuSO_4$  mg/l στο *A. biennis* και 0,2  $MnSO_4$  mg/l στο *Ph. chrysosporium* (κατά 15% και 11% αντίστοιχα), ενώ και στις δύο περιπτώσεις οι εν λόγω επεμβάσεις διέφεραν σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες. Η μείωση του χρώματος στο *A. biennis*, εμφανίστηκε μεγαλύτερη του μάρτυρα με την προσθήκη  $MnSO_4$  ανεξάρτητα από την συγκέντρωση του (μείωση 83 – 85% και 77% στον μάρτυρα), ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου από την προσθήκη  $CuSO_4$ . Ομοίως, αυξημένος αποχρωματισμός παρατηρήθηκε και στο *Ph. chrysosporium* όταν προστέθηκε  $MnSO_4$  στο απόβλητο, ενώ η προσθήκη του θειικού χαλκού είχε αρνητική επίδραση.





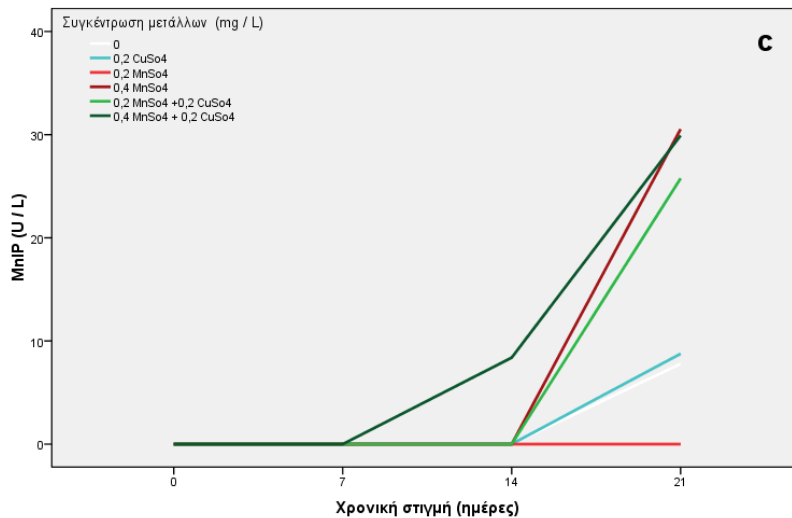
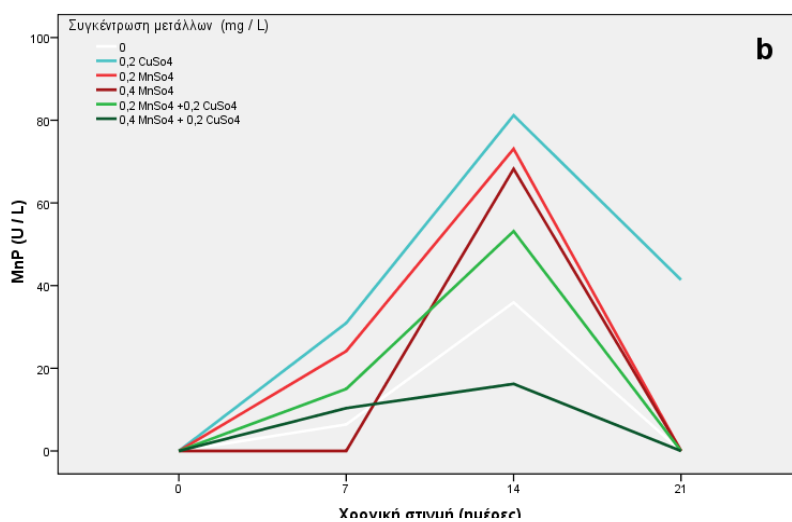
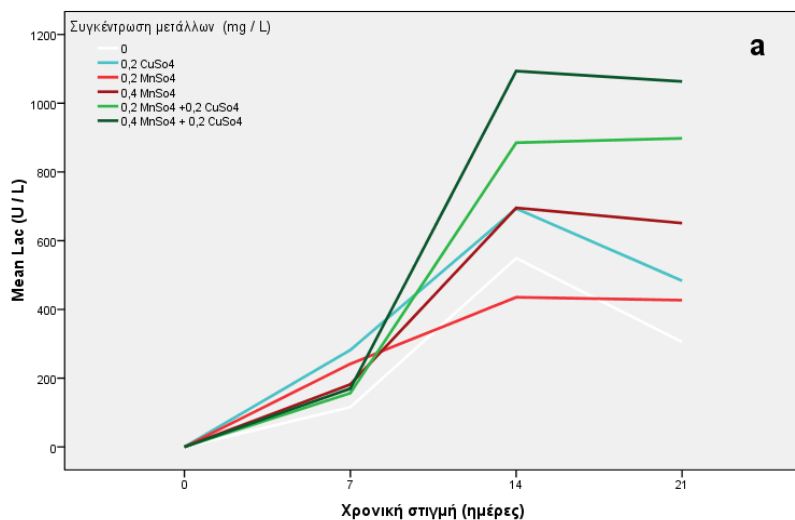
**Γράφημα 2.7.14.** Μείωση των ολικών φαινολικών και του χρώματος YAE (25% με νερό) εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις CuSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) ή/και MnSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) κατά την ανάπτυξη των μυκήτων *A. Biennis* (a,c) και *Ph. chrysosporium* (b,d) για χρονικό διάστημα επώασης 21 ημερών

Όσον αφορά την παραγωγή των ενζύμων, η ενεργότητα λακκάσης -όπως και στα προηγούμενα πειράματα- προσδιορίστηκε μόνο στις καλλιέργειες του *A. biennis*. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 2.7.15. η προσθήκη τόσο του MnSO<sub>4</sub> όσο και του CuSO<sub>4</sub> επέφεραν αύξηση στην ενεργότητα της, η οποία ήταν ακόμη πιο έντονη όταν έγινε συνδυασμός των δύο μετάλλων. Θετική επίδραση παρατηρήθηκε και στην MnP όταν προστέθηκαν τα παραπάνω άλατα στα μέσα ανάπτυξης του *A. biennis*, αλλά οι μέγιστες τιμές δεν

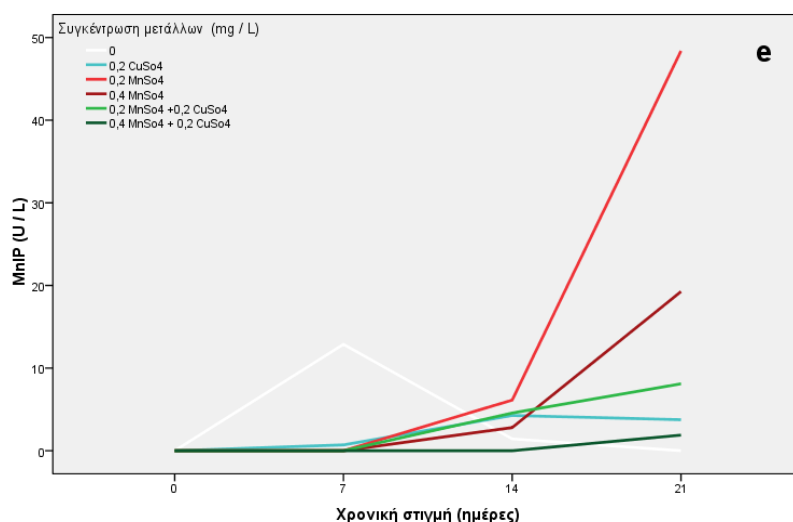
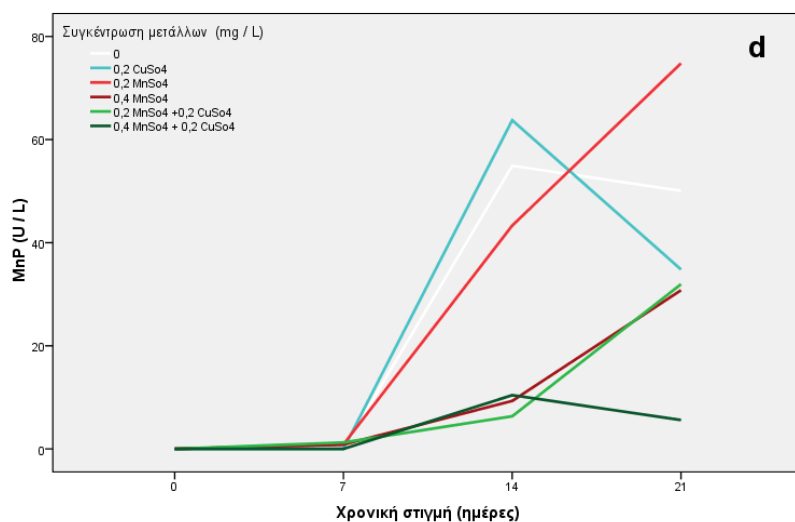
εμφανίστηκαν όταν συνδυάστηκαν τα δύο στοιχεία, αλλά μόνον όταν χρησιμοποιήθηκε το καθένα ανεξάρτητα (Γράφημα 2.7.15). Για το *Ph. chrysosporium*, συγκρίσιμες ή και μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας καταγράφηκαν μόνο για τις επεμβάσεις που περιείχαν 0,2 mg/l  $\text{CuSO}_4$  ή  $\text{MnSO}_4$ , ενώ μείωση καταγράφηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή κατά τον συνδυασμό των δύο μετάλλων (Γράφημα 2.7.16). Η παραγωγή της MnIP στο *A. biennis* επηρεάστηκε από την προσθήκη μετάλλων με τρόπο όμοιο με την λακκάση. Δηλαδή η υψηλότερη ενεργότητα σημειώθηκε στις επεμβάσεις που περιείχαν 0,4 mg/l  $\text{MnSO}_4$  ή όταν συνδυάστηκαν και τα δύο θειικά άλατα και μάλιστα διέφεραν σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Στο *Ph. chrysosporium*, αν και η επαγωγή του συγκεκριμένου ενζύμου καθυστέρησε σε σχέση με το μάρτυρα, τελικά ο εμπλουτισμός του μέσου ανάπτυξης με  $\text{MnSO}_4$  και ιδιαίτερα στην συγκέντρωση 0,2 mg/l επέφερε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας (Γράφημα 2.7.16).

Και για τα δύο είδη που μελετήθηκαν η μεγαλύτερη μείωση των ρυπαντικών παραμέτρων σημειώθηκε στις επεμβάσεις όπου μεγιστοποιήθηκε η παραγωγή των ενζύμων, επιβεβαιώνοντας τη συμβολή τους τόσο στη διάσπαση των ολικών φαινολικών όσο και των υπόλοιπων οργανικών μορίων που χρωματίζουν το απόβλητο. Επιπλέον ο μικρότερος αποχρωματισμός που παρατηρήθηκε στις επεμβάσεις που προστέθηκε  $\text{CuSO}_4$  μπορεί εν μέρει να οφείλεται στον χρωματισμό που επιφέρει η ίδια η ένωση με τη διάλυση της στο θρεπτικό μέσο.

Στο παρελθόν έχει μελετηθεί εκτενώς ο βιοχημικός ρόλος των μετάλλων στους μύκητες λευκής σήψης, αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα πολλών εξ αυτών στην παραγωγή ενζύμων και την αύξηση του μυκηλίου. Η παραγωγή ημικυτταρινολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων του *P. ostreatus* σε άχυρο σίτου αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται θετικά από την παρουσία μετάλλων όπως τα Cu και Mn (Baldrian et al., 2005), ενώ τα ίδια μέταλλα προάγουν επίσης και την παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων όπως η λακκάση και η υπεροξειδάση του Mn (Palmieri et al., 2000, Baldrian et al., 2005). Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, επίσης, επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις των Levin et al. (2002), οι οποίοι απέδειξαν ότι μικρές συγκεντρώσεις  $\text{CuSO}_4$  αυξάνουν την παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων. Οι ίδιοι συγγραφείς παρατήρησαν ότι η προσθήκη σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης της ίδιας ένωσης μειώνει σημαντικά την ενζυμική δράση και ιδιαίτερα της MnP. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 2.7.15, η προσθήκη  $\text{MnSO}_4$  στη μέγιστη συγκέντρωση ή ο συνδυασμός των δύο μετάλλων δεν φαίνεται να οδηγεί σε φαινόμενα τοξικότητας στο *A. biennis*.



**Γράφημα 2.7.15.** Ενεργότητα των ενζύμων λακκάση (Lac), υπεροξειδάση του Mn (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP) που παρήχθησαν κατά την ανάπτυξη του μύκητα *A. biennis* σε ΥΑΕ (25% με νερό) εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις CuSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) ή/και MnSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) για διάστημα επώασης 21 ημέρων.



**Γράφημα 2.7.16.** Ενεργότητα των ενζύμων υπεροξειδάση του Mn (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Mn (MnIP) που παρήχθησαν κατά την ανάπτυξη του μύκητα *Ph. chrysosporium* σε ΥΑΕ (25% με νερό) εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις CuSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) ή/και MnSO<sub>4</sub> (0,2 και 0,4 mg/l) για διάστημα 21 ημέρων.

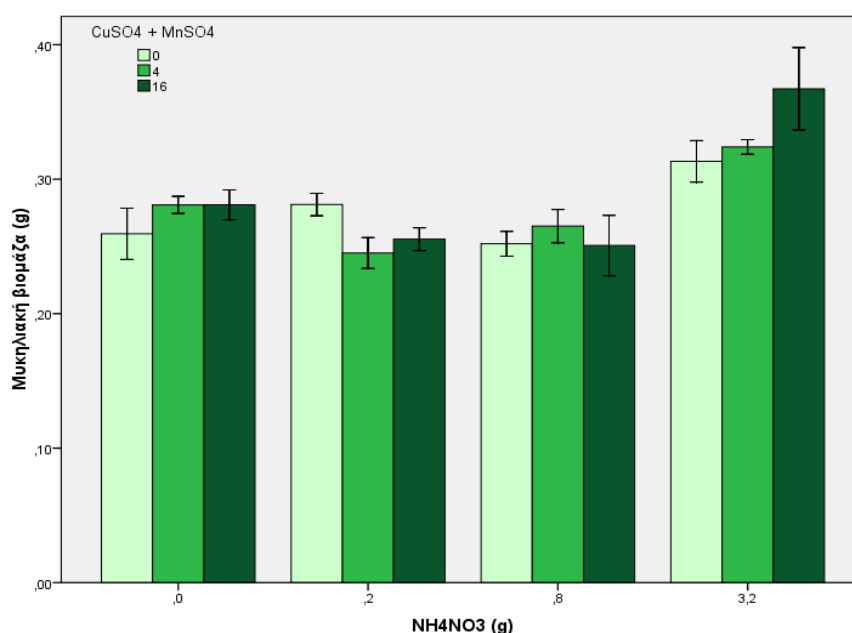
Συμπερασματικά τόσο η προσθήκη του αζώτου όσο και των μετάλλων που χρησιμοποιήθηκαν φάνηκε να βελτιώνει σημαντικά την παραγωγή των λιγνολυτικών ενζύμων και κατ' επέκταση και τις επιδόσεις όσον αφορά τη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος του αποβλήτου. Η επίδραση αυτή αποδείχθηκε ότι εξαρτάται από το είδος του μύκητα.

2.7.3.4.5. Συνδυασμός προσθήκης αζώτου και μετάλλων (χαλκός και μαγγάνιο) για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας επεξεργασίας των ΥΑΕ με τον βασιδιομύκητα *A. biennis*.



Στις δύο τελευταίες ενότητες (2.7.3.4.3 και 2.7.3.4.4) μελετήθηκε εκτενώς (και ανεξάρτητα) η επίδραση της προσθήκης αζώτου και συγκεκριμένων μετάλλων στην αποδόμηση του ρυπαντικού φορτίου των ΥΑΕ. Μεταξύ των ειδών που μελετήθηκαν, το *A. biennis* έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ταχύτητα αλλά και το τελικό ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών και του χρώματος. Επιπλέον στο εν λόγω είδος, σημειώθηκε αύξηση της παραγόμενης μυκηλιακής βιομάζας αυξανόμενης της συγκέντρωσης του  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ενώ η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα σημειώθηκε όταν προστέθηκαν στο απόβλητο 0,8 g/l της συγκεκριμένης πηγής αζώτου. Αναφορικά με την προσθήκη των μετάλλων αποδείχθηκε ότι η συνδυασμένη χρήση των  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$ , είχε ως αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της ενζυμικής δράσης και κατ' επέκταση τη βελτίωση της διαδικασίας βιοποδόμησης των ΥΑΕ.

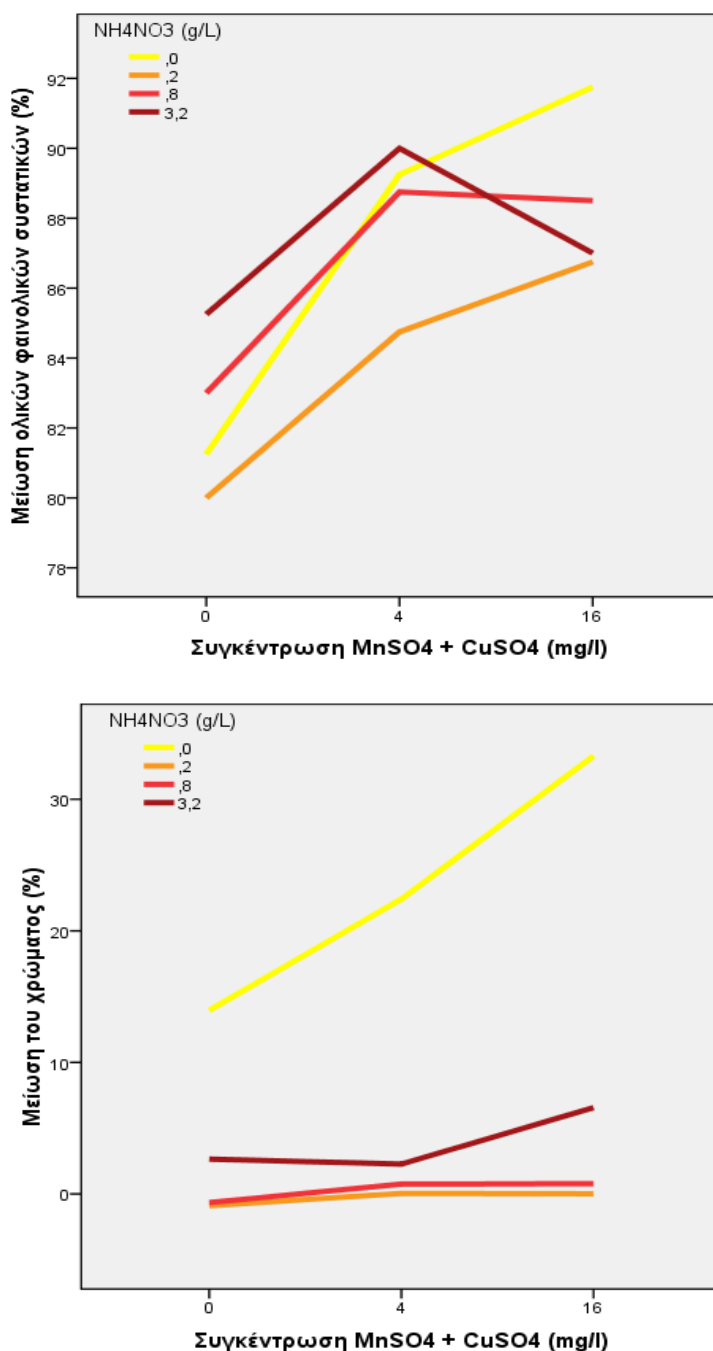
Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να διερευνηθεί η βέλτιστη συγκέντρωση των μετάλλων και η τυχόν ύπαρξη αλληλεπίδρασης της προσθήκης τους με τον εμπλουτισμό σε άζωτο όσον αφορά στη τελική μείωση του ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου.



Γράφημα 2.7.17. Παραγωγή βιομάζας του μύκητα *A. biennis* κατά την ανάπτυξη του για 35 ημέρες σε ΥΑΕ (25% με νερό) εμπλουτισμένα με άζωτο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), χαλκό και μαγγάνιο (με τη μορφή  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$ ).

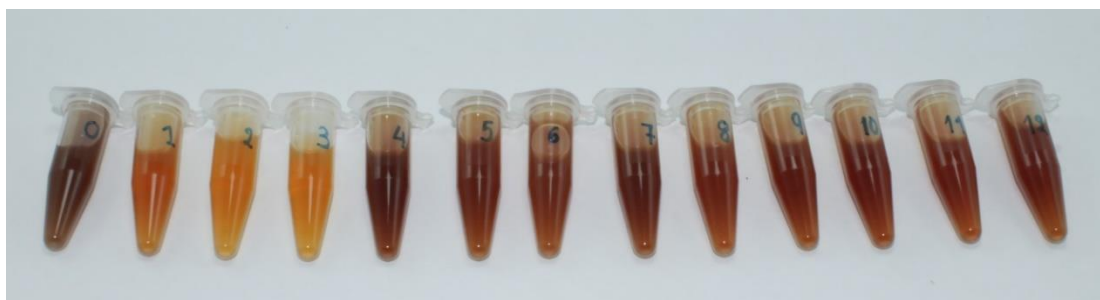
Ο προσδιορισμός της μυκηλιακής βιομάζας πραγματοποιήθηκε στο τέλος του πειράματος (35 ημέρες) και δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 12 επεμβάσεων. Ωστόσο, η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας μετρήθηκε στις επεμβάσεις που περιείχαν τη μέγιστη συγκέντρωση  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του

πειράματος που περιεγράφηκε στην ενότητα 2.7.3.4.3. Επιπλέον, μικρή αύξηση της βιομάζας καταγράφηκε ως αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης των Cu και Mn στη μέγιστη συγκέντρωση του αζώτου (3,2 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), (Γράφημα 2.7.17).



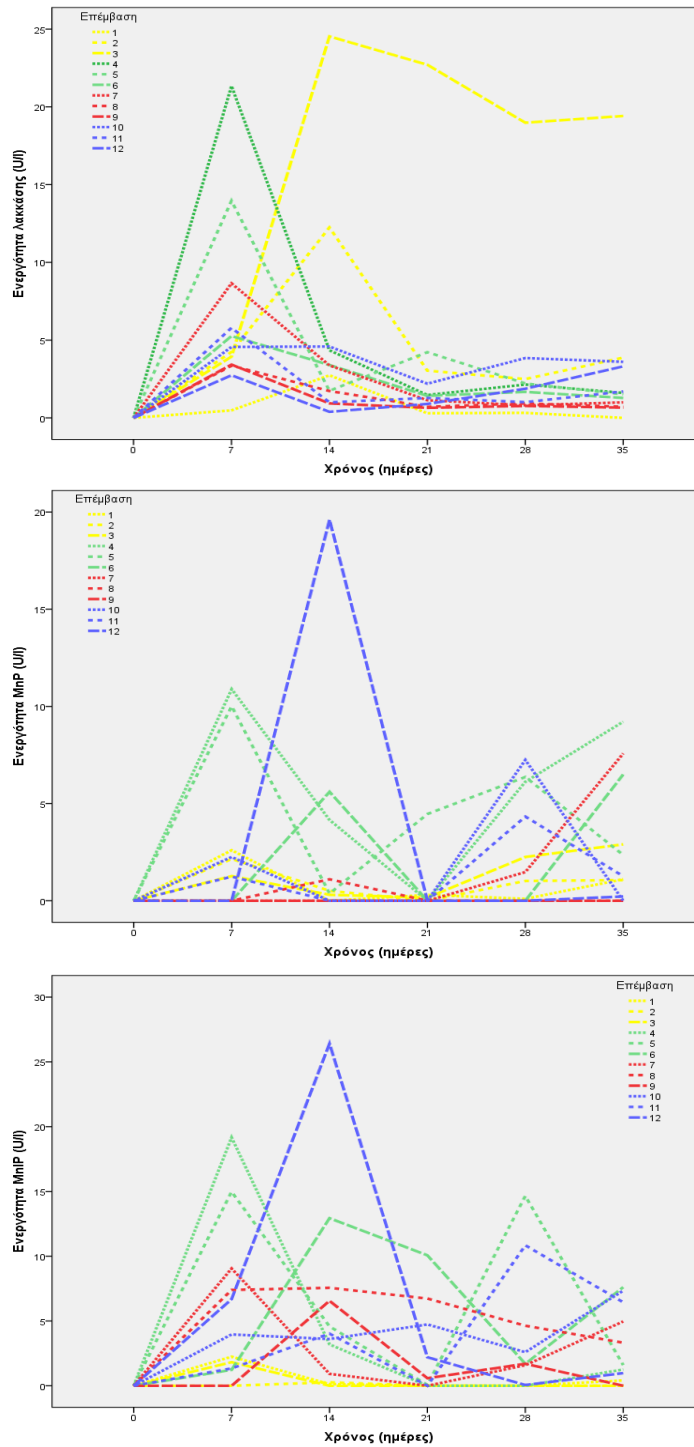
Γράφημα 2.7.18. Μείωση (%) συγκριτικά με το αρχικό υλικό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου στα οποία προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ή  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$ , μετά την βιοεπεξεργασία τους για 35 ημέρες με τον μύκητα *A. biennis*.

Αναφορικά με τον αποχρωματισμό και την ελάττωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών στο βιοεπεξεργασμένο (για 35 ημέρες) ΥΑΕ, ελέγχθηκε η επίδραση των δύο παραγόντων (προσθήκη μετάλλων και αζώτου), αλλά και η αλληλεπίδραση τους (Two Way Απονα). Από το Γράφημα 2.7.21 προκύπτει ότι η προσθήκη  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  είχε αρνητική επίδραση στη μείωση των ρυπαντικών παραμέτρων, ενώ η προσθήκη  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$  βοήθησε τη διαδικασία αποδόμησης των ΥΑΕ. Πιο συγκεκριμένα, ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη μείωση των φαινολικών, ενώ αντίθετα στατιστικά μεγαλύτερη μείωση επιτεύχθηκε με την προσθήκη μετάλλων σε συγκέντρωση 4 ή 16 mg/l. Τέλος σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν ανιχνεύτηκε σημαντική αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων ( $F=1,31$ ,  $\text{sig} = 0,277$ ). Η ελάττωση της απορρόφησης της ακτινοβολίας (σε μήκος κυματος 525 nm που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αποχρωματισμού) έδειξε ότι τόσο ο εμπλουτισμός με  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  όσο και με  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$  διαφοροποιεί σημαντικά τα τελικά αποτελέσματα ( $p < 0,05$ ). Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 2.7.18, το χρώμα μειώθηκε σημαντικά όταν δεν προστέθηκε επιπλέον άζωτο, ενώ θετικά συνέβαλε η αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων Cu και Mn. Επιπλέον, στην περίπτωση του αποχρωματισμού διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών είχε σημαντική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα ( $F=9,19$ ,  $\text{Sig} = 0.00$ ).



Εικόνα 2.7.1. Δείγματα ΥΑΕ μετά την βιοεπεξεργασία τους για 35 ημέρες με τον μύκητα *A.biennis*. Τα νούμερα σε κάθε φιαλίδιο αντιπροσωπεύουν τον κωδικό των επεμβάσεων που χρησιμοποιήθηκαν (βλ. Πίνακα 2.7.2).

Η παραγωγή της λακκάσης μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων παρουσίασε διαφορές τόσο όσον αφορά τις μέγιστες τιμές ενεργότητας όσο και του χρόνου που εμφανίστηκαν αυτές (Γράφημα 2.7.19). Η αύξηση του περιεχόμενου αζώτου στο διάλυμα επέφερε πρωίμιση της μέγιστης παραγωγής, αλλά μετά από 14 ημέρες ανάπτυξης, η ενεργότητα μειώθηκε σημαντικά. Αντίθετα στις επεμβάσεις που δεν περιείχαν άζωτο, η προσθήκη μετάλλων, όχι μόνο αύξησε την μέγιστη τιμή της ενεργότητας, αλλά η παραγωγή διατηρήθηκε υψηλή συγκριτικά με τον μάρτυρα μέχρι το τέλος της καλλιέργειας. Αντίθετα



**Γράφημα 2.7.19.** Ενεργότητα των ενζύμων a) Lac, b) MnP και c) MnIP κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του μύκητα *A. biennis* (35 ημέρες) αναπτυσσόμενου σε YAE (25% με νερό), στα οποία προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ή  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$ .

από την μελέτη της κινητικής των δύο υπεροξειδασών, προέκυψε ότι ο εμπλουτισμός των υποστρωμάτων με άζωτο και με μέταλλα συνέβαλε στην αύξηση των σχετικών ενεργοτήτων. Αξίζει να αναφερθεί ότι και για τα τρία ένζυμα και όλες τις χρονικές στιγμές (7 έως 35 ημέρες)

αποδείχθηκε ότι η παραγωγή των ενζύμων εξαρτάται σημαντικά και από τους δύο παράγοντες (συγκέντρωση αζώτου και μετάλλων), ενώ επιπροσθέτως αυτοί αλληλεπιδρούν σημαντικά μεταξύ τους όσον αφορά την τελική ενεργότητα. Τα δεδομένα αυτά, επιβεβαιώνουν τα ευρήματα των προηγούμενων πειραμάτων, σύμφωνα με τα οποία ναι μεν η παραγωγή των ενζύμων αυξάνεται όταν το υπόστρωμα από ΥΑΕ εμπλουτίζεται με άζωτο ή μέταλλα, αλλά οι τελικές τιμές μείωσης των ρυπαντικών παραμέτρων του από τον μύκητα *A. biennis* ουσιαστικά καθορίζονται μόνο από την προσθήκη των μετάλλων. Επιπλέον, αν και στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις των  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$  σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, δεν διαπιστώθηκε να επηρεάζουν δυσμενώς την ανάπτυξη του μύκητα ή την διαδικασία αποτοξικοποίησης. Αντίθετα, αυξανόμενης της συγκέντρωσης τους (μέχρι και τα 16 mg/l) μειώθηκε ακόμη περισσότερο η συγκέντρωση των φαινολικών και το χρώμα του αποβλήτου. Αυτό σημαίνει ότι θα μπορούσαν να δοκιμαστούν στο μέλλον ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετάλλων (μέχρι της τιμής που αυτές θα καταστούν τοξικές), οι οποίες πιθανώς να βελτίωναν περαιτέρω τη διαδικασία βιοαποδόμησης των ΥΑΕ.

### 2.7.3.5 Χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας του μύκητα *Abortiporus biennis* στην επεξεργασία ακατέργαστων ΥΑΕ

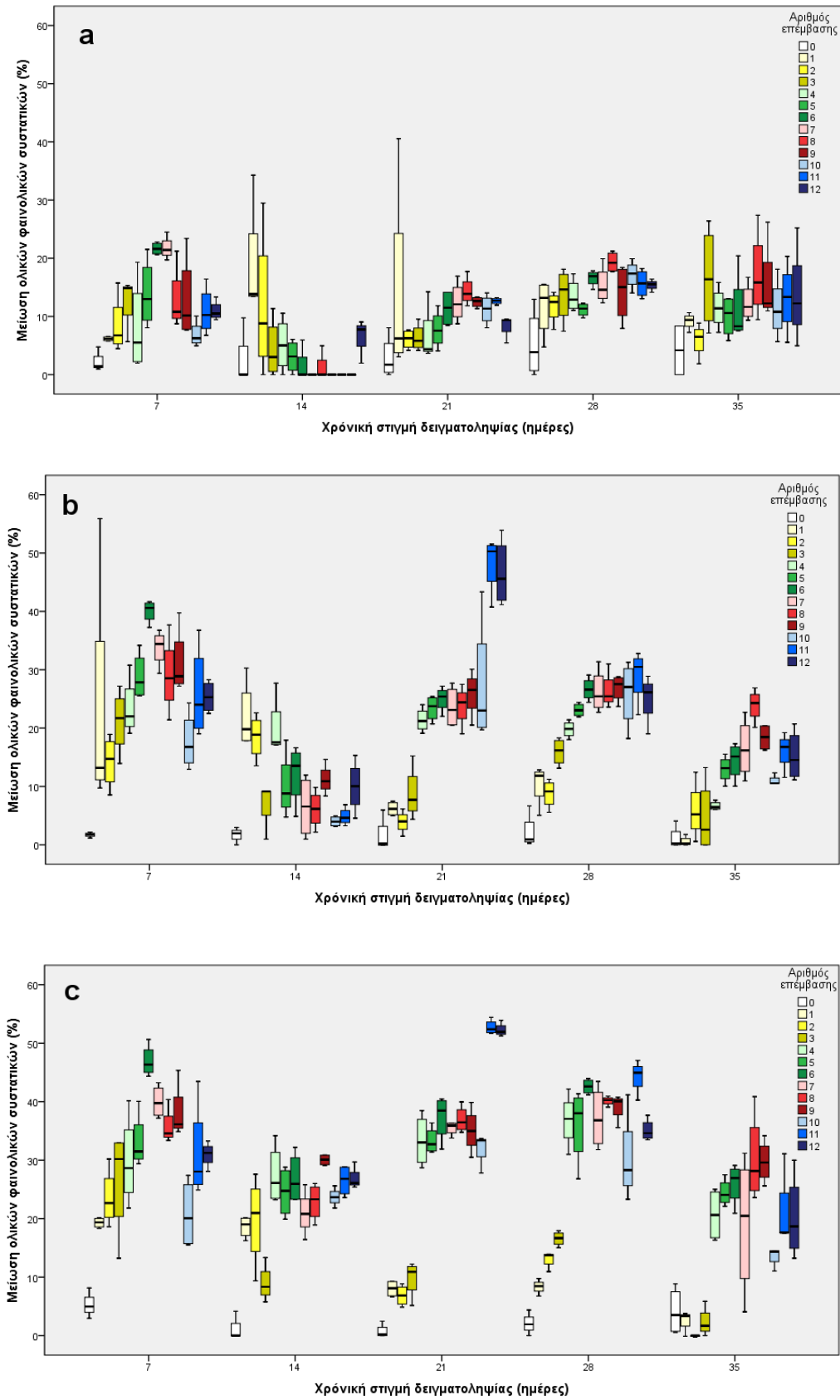
Παρόλα τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση μικροοργανισμών στη βιοεπεξεργασία των ΥΑΕ, η εφαρμογή τους σε μεγάλη-βιομηχανική κλίμακα είναι δύσκολη έως αδύνατη. Οι σημαντικότεροι λόγοι που δυσχεραίνουν την εφαρμογή τους είναι η αδυναμία προεπεξεργασίας (αποστείρωση, φυγοκέντρηση κλπ.) του τεράστιου όγκου των αποβλήτων που παράγονται σε κάθε ελαιοτριβείο και το υψηλό κόστος διατήρησης των συνθηκών που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (θερμοκρασία, αερισμός, pH κλπ.). Προς την κατεύθυνση της αντιμετώπισης των εν λόγω δυσχερειών, διερευνήθηκε η χρήση του υγρού μέσου που προκύπτει μετά την καλλιέργεια του *A. biennis* στη διαχείριση ανεπεξέργαστων ΥΑΕ (όπως αυτά παραλαμβάνονται από το ελαιοτριβείο), χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία (μυκήλιο) του μύκητα.

Η εφαρμογή του υγρού μέσου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ολικών φαινολικών του αποβλήτου και εξαρτήθηκε σε μεγάλο βαθμό από την επέμβαση και τη χρονική στιγμή λήψης του δείγματος από τις καλλιέργειες του μύκητα. Σύμφωνα με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, ο ρυθμός μείωσης των φαινολικών ήταν πολύ υψηλός κατά τις πρώτες

ώρες μετά την εφαρμογή (μέχρι και 22% μείωση στις πρώτες 4 ώρες) και έβαινε μειούμενος με την πάροδο του χρόνου. Τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης των φαινολικών, παρατηρήθηκαν 48 ώρες μετά την ανάμιξη με το υγρό μέσο και διέφεραν σημαντικά ( $p < 0,05$ ) με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στις 24 ώρες με ελάχιστες εξαιρέσεις. Ωστόσο ο ρυθμός μείωσης μετά τις 24 ώρες ήταν αισθητά μικρότερος ειδικά στις επεμβάσεις που σημειώθηκαν τα πιο θεαματικά αποτελέσματα (μέχρι και 5% τις τελευταίες 24 ώρες σε όσες επεμβάσεις μετρήθηκε συνολική μείωση μεγαλύτερη του 40%). Μεταξύ των υγρών μέσων που δοκιμάστηκαν, τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης των φαινολικών παρατηρήθηκαν στα δείγματα 7 ημερών που περιείχαν 0,2g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  + 16mg  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$  (έβδομη ημέρα, 22, 40 και 47% μετά από 4, 24 και 48 ώρες αντίστοιχα [Επέμβαση 6]) καθώς και με τη χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας 21 ημερών που περιείχαν 3,2g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  + 4 ή 16mg  $\text{CuSO}_4$  και  $\text{MnSO}_4$  (47-48% και 52-53%, μετά από 24 και 48 ώρες αντίστοιχα [Επεμβάσεις 11 και 12]) (Γράφημα 2.7.20).

Τις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές για τις προαναφερθείσες επεμβάσεις δεν παρατηρήθηκε η μέγιστη ενεργότητα για κανένα από τα ένζυμα που μελετήθηκαν (Γράφημα 2.7.19) υποδεικνύοντας ότι πιθανόν στην αποδόμηση των φαινολικών συμμετέχουν και άλλα ένζυμα. Σύμφωνα με τους Ntougias et al. (2015), οι οποίοι μελέτησαν την εφαρμογή αντίστοιχων εκχυλισμάτων από καλλιέργειες ξυλοσηπτικών μυκήτων σε ΥΑΕ σε συνδυασμό ή όχι με την προσθήκη καταλάσης, λακκάσης, ή  $\text{H}_2\text{O}_2$ , αποκλείστηκε το ενδεχόμενο η μείωση να οφείλεται σε χημικές διεργασίες.

Στις περισσότερες περιπτώσεις διαπιστώθηκε μικρή αύξηση της απορρόφησης στα 525 nm μετά την εφαρμογή του υγρού μέσου, ενώ μείωση του χρώματος σημειώθηκε μόνο σε κάποιες περιπτώσεις κατά τις 4 πρώτες ώρες μετά την εφαρμογή (μετά την παρέλευση 48 ωρών, η αύξηση του χρώματος κυμάνθηκε από 4 έως και 13%). Αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε πρόσφατα μετά την εφαρμογή υγρών μέσων που προέκυψαν με την καλλιέργεια των ειδών *C. cylindracea* και *P. ostreatus* αλλά όχι του *Trametes versicolor* (Ntougias et al., 2015). Αυτό υποδεικνύει ότι κάθε είδος μεταβολίζει επιλεκτικά τα έγχρωμα οργανικά συστατικά των ΥΑΕ. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τα ευρήματα των Bohlin et al. (2008), σύμφωνα με τα οποία η επιλεκτική αποδόμηση συμβάλει περισσότερο στον καταβολισμό της λιγνίνης σε σχέση με την χημική οξείδωση. Επιπλέον η προσθήκη καθαρού σκευάσματος λακκάσης είχε επίσης οδήγησει σε ελαφρά αύξηση του χρώματος (Ntougias et al., 2015) πιθανόν λόγω της οξείδωσης των φαινολικών συστατικών σε ενώσεις σκουρότερου χρώματος.



Γράφημα 2.7.20. Μείωση των ολικών φαινολικών μετά την εφαρμογή (10% v/v) υγρού μέσου καλλιέργειας του *A. biennis* σε μη επεξεργασμένα ΥΑΕ. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 4 (a), 24 (b) και 48 (c) ώρες από τον εμβολιασμό.

Συμπερασματικά, τα υγρά μέσα καλλιέργειας του *A. biennis* (που περιέχουν τα εξωκυτταρικά παραγόμενα λιγνινολυτικά ένζυμα) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδος μείωσης των φαινολικών συστατικών ΥΑΕ καθώς επιτυγχάνουν μείωση της συγκέντρωσης τους μέχρι και 53% μέσα σε 48 ώρες και μάλιστα χωρίς να απαιτείται κανενός είδους επεξεργασία του αποβλήτου. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή τους στην επεξεργασία των ΥΑΕ, ανοίγουν το δρόμο για την περαιτέρω διερεύνηση παρόμοιων μεθοδολογιών και σε άλλα οργανικά απόβλητα. Θα είχε ενδιαφέρον να δοκιμαστούν τόσο η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ίδιου εκχυλίσματος όσο και η ταυτόχρονη ή η διαδοχική προσθήκη εκχυλισμάτων από διαφορετικά είδη για να διαπιστωθεί αν η συνεργιστική δράση τους μπορεί να οδηγήσει σε ακόμη καλύτερα αποτελέσματα.



---

# Κεφάλαιο 2.8

---

**Διαχείριση παραπροϊόντων  
ελαιοκομίας-ελαιουργίας με τη  
χρήση επιλεγμένων  
βασιδιομυκήτων**

## 2.8.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα ενότητα αξιολογήθηκε η ικανότητα πέντε ειδών βασιδιομυκήτων -τα οποία στα προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι μπορούν να αναπτυχθούν επιτυχώς σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν απόβλητα ελαιοτριβείων (υγρά ή στερεά)- στον αποικισμό υποστρωμάτων αποτελούμενα από ημίρευστο απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW) και τη μείωση των ρυπαντικών παραμέτρων αυτού. Επιπλέον, διερευνήθηκε το κατά πόσον τα βιοεπεξεργασμένα παραπροϊόντα ελαιοκομίας-ελαιουργίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οργανικά υποστρώματα για τη βλάστηση σπόρων και την παραγωγή φυτών γεωργικού ενδιαφέροντος.

## 2.8.2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.8.2.1 Βιολογικό υλικό

Στον αρχικό σχεδιασμό υλοποίησης της συγκεκριμένης εργασίας συμπεριλήφθηκαν πέντε είδη βασιδιομυκήτων λευκής σήψης με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη *Abortiporus biennis* (LGAM 436) και *Phanerochaete chrysosporium* (LGAM 322) επιλέχθηκαν μεταξύ 60 στελεχών (Κεφάλαιο 2.7) με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης τους σε τρυβλία που περιείχαν ΥΑΕ, ενώ τα *Pleurotus ostreatus* (LGAM22), *Cyclocybe cylindracea* (LGAM496) και *Ganoderma lucidum* (LGAM 9720) με βάση την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα τους σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας (Κεφάλαια 2.3, 2.4 και 2.6).

### 2.8.2.2 Αξιολόγηση της ικανότητας ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας

Το αρχικό πείραμα αξιολόγησης έλαβε χώρα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες ("race tubes", 30 × 200mm) που περιείχαν μείγμα αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW) και τεμαχισμένων κλαδεμάτων ελαιόδεντρων (OLPR) σε αναλογία 1:1 (w/w). Τα υπό εξέταση είδη, αναπτύχθηκαν αρχικά σε αραιωμένο ΥΑΕ (25% με νερό) σε τρυβλία Petri και ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση ενός κυκλικού δισκίου διαμέτρου 1cm (παραλήφθηκε από την περιφέρεια ενεργά αναπτυσσόμενης αποικίας στην επιφάνεια

κάθε σωλήνα. Για τις ανάγκες της αξιολόγησης, προσδιορίστηκαν η γραμμική ταχύτητα αύξησης των πέντε στελεχών, η μείωση των ολικών φαινολικών συστατικών και ο αποχρωματισμός του υδατικού εκχυλίσματος στα προαναφερθέντα υποστρώματα με τις μεθόδους που περιγράφονται στις Παραγράφους 2.1.2.6 και 2.4.2.4 .

### 2.8.2.3 Διαχείριση μη αποστειρωμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων

Με βάση τα προηγούμενα σχετικά αποτελέσματα, επιλέχθηκαν τα στελέχη *A. biennis* LGAM 436, *P. chrysosporium* LGAM 320 και *P. ostreatus* LGAM 22, ώστε να μελετηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα η δυνατότητα αξιοποίησης τους στη διαχείριση αποβλήτων προερχόμενων από ελαιοτριβεία δύο φάσεων. Προετοιμάστηκαν υποστρώματα των 3 kg από μείγματα ημίρευστου αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TROMW) και κλαδέματα ελαιοδέντρων (OLPR) σε αναλογίες 1:1 και 3:1 w/w και εμβολιάστηκαν σε αναλογία 10% w/w, με τεμαχισμένο ξύλο οξιάς στο οποίο προηγουμένως είχαν αναπτυχθεί τα υπό εξέταση στελέχη μυκήτων. Επειδή τα εν λόγω απόβλητα δεν μπορούν να αποστειρωθούν σε συνθήκες βιομηχανικής κλίμακας (λόγω του τεράστιου όγκου παραγωγής τους, της έλλειψης ή υψηλού κόστους εξοπλισμού αποστείρωσης) επιλέχθηκε να μην προηγηθεί καμία θερμική προεπεξεργασία στα υπό εξέταση υποστρώματα. Η επώαση των καλλιεργειών των μυκήτων έγινε στους 25 °C μέσα σε ειδικές σακούλες ανάπτυξης με μικροβιολογικά φίλτρα για την αποφυγή επιμολύνσεων. Συνολικά η ανάπτυξη του μυκηλίου διήρκεσε 6-8 εβδομάδες (ανάλογα με το είδος) και κάθε εβδομήντα ημέρα λαμβάνονταν δείγματα (10 g) από κάθε επανάληψη για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων λακκάση (Lac), υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (MnIP) (σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στην Παράγραφο 2.4.2.7) και της μείωσης των ολικών φαινολικών και του χρώματος των υδατικών εκχυλισμάτων (Παράγραφος 2.1.2.3).

### 2.8.2.4 Επίδραση της προσθήκης βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στη βλάστηση σπόρων μαρουλιού και τομάτας

Το βιοεπεξεργασμένο υλικό που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία (Ενότητα 2.8.2.3) αναμίχθηκε σε ποσοστό 25% (w/w) με έδαφος και αξιολογήθηκε η επίδραση του στη

φύτρωση σπόρων μαρουλιού (*Lactuca sativa*) και τομάτας (*Solanum lycopersicum*). Για την εκτίμηση της διαφοροποίησης ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος επιλέχθηκαν τα ακόλουθα: α) άμμος, β) τύρφη και γ) μείγμα άμμου και βερμικουλίτη (1:1 v/v). Δίσκοι διογκωμένης πολυουρεθάνης γεμίστηκαν με τα μείγματα υποστρώματος και βιοεπεξεργασμένου υλικού (3:1, w/w). Οι σπόροι των φυτών τοποθετήθηκαν σε βάθος 0,5 cm από την επιφάνεια, ένας σε κάθε θέση φύτευσης (12 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση). Οι δίσκοι τοποθετήθηκαν στους 25 °C και μετρήθηκαν το ποσοστό των σπόρων που φύτευσαν, ο χρόνος που απαιτήθηκε μέχρι την εμφάνιση του φυταρίου και το βάρος της υπέρχειας βιομάζας που παράχθηκε.

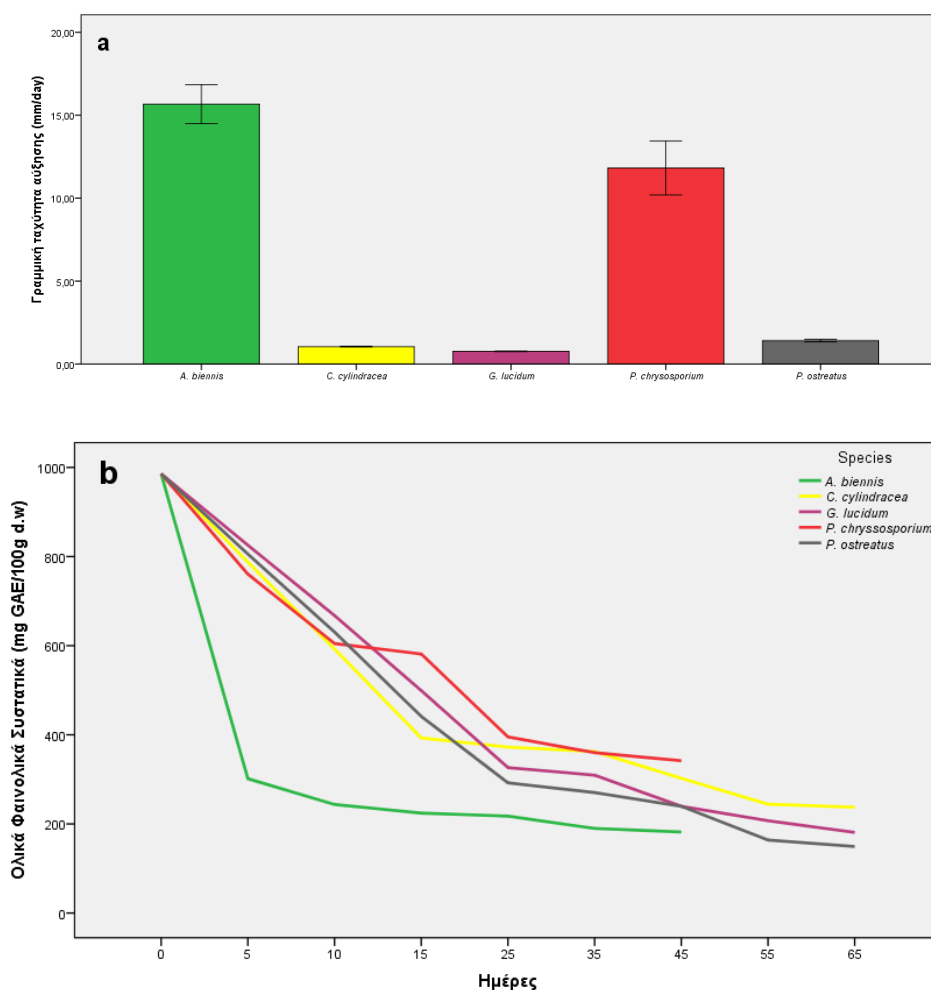
#### 2.8.2.5 Διερεύνηση της καταλληλότητας εφαρμογής βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στο έδαφος για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού.

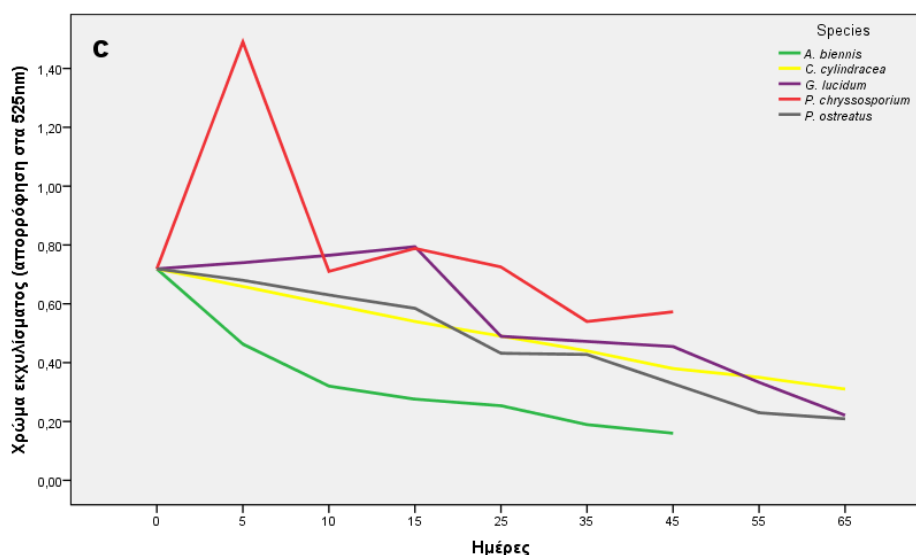
Το υλικό που προέκυψε από το παραπάνω πείραμα (Ενότητα 2.8.2.3) χρησιμοποιήθηκε εκτός από τη δοκιμή βλάστησης των σπορών (Ενότητα 2.8.2.4) και για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού. Το βιοεπεξεργασμένο ή μη υλικό αναμίχθηκε με χώμα μέσης σύστασης σε αναλογία 4:1 (20%). Οι πειραματικές μονάδες αποτελούνταν από πλαστικές γλάστρες διαστάσεων 9x9x9,5 cm (16 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση), οι οποίες γεμίστηκαν με τα παραπάνω μείγματα και μεταφυτεύθηκαν σε αυτές ανεπτυγμένα (ύψους 4-5 cm) φυτά μαρουλιού της εμπορικής ποικιλίας “romaine”. Η ανάπτυξη των μαρουλιών έλαβε χώρα σε κλειστό θερμοκήπιο και διήρκησε συνολικά 75 ημέρες. Κάθε 10 ημέρες στις μισές επαναλήψεις κάθε επέμβασης, εφαρμόστηκε λίπανση με 30 ml διαλύματος Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950). Με το πέρας της καλλιεργητικής περιόδου, συλλέχθηκε το υπέργειο τμήμα των φυτών ώστε να προσδιοριστεί η υπέρχεια βιομάζα που παράχθηκε, ενώ δείγματα της χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των στοιχείων N, K, P και Na όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2.2.5

### 2.8.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

### 2.8.3.1 Αξιολόγηση της ικανότητας ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας

Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης στα "race tubes", τον ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης εμφάνισαν τα είδη *A. biennis* (15.7 mm/day) και *P. chrysosporium* (11,8 mm/day), ενώ πολύ μικρότερη ταχύτητα γραμμικής αύξησης παρατηρήθηκε για τα άλλα τρία στελέχη (0,77 έως 1,41 mm/day) (Γράφημα 2.8.1). Όσον αφορά τη μείωση των φαινολικών τα οποία θεωρούνται ο κύριος ρυπαντικός παράγοντας των ελαιουργικών αποβλήτων, το στέλεχος *A. biennis* LGAM 436 επέφερε την ταχύτερη μείωση (69% σε 5 ημέρες και 82% σε 45 ημέρες), ενώ η μεγαλύτερη συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα μείωση επετεύχθη από το *P. ostreatus* (85% σε διάστημα 65 ημερών). Παρομοίως, το χρώμα των υδατικών εκχυλισμάτων μειώθηκε περισσότερο στα υποστρώματα όπου αναπτύχθηκε ο μύκητας *A. biennis* (36% σε διάστημα 5 ημερών και 78% μετά από 45 ημέρες). Σημαντικό επίσης αποχρωματισμό επέφερε η ανάπτυξη των στελεχών *P. ostreatus* και *G. lucidum* (69 και 71% αντίστοιχα), όμως σε αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (65 ημέρες).





Γράφημα 2.8.1. Γραμμική ταχύτητα αύξησης (α) πέντε ειδών βασιδιομυκήτων αναπτυσσόμενων σε μείγμα αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων και κλαδεμάτων ελιάς (1:1 w/w), καθώς και (β) συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και (γ) του χρώματος των υδατικών εκχυλισμάτων που παραλήφθησαν ανά πέντε ημέρες κατά την περίοδο ανάπτυξης. Η επώαση διήρκησε 45 ημέρες στα *A. biennis* και *Ph. chrysosporium* και 65 ημέρες στα *C. cylindracea*, *G. lucidum* και *P. ostreatus*.

### 2.8.3.2 Διαχείριση μη αποστειρωμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας με τη χρήση επιλεγμένων βασιδιομυκήτων

Με βάση τα προηγούμενα σχετικά αποτελέσματα (ενότητα 2.8.3.1), επιλέχθηκαν τα στελέχη *A. biennis* LGAM 436, *P. chrysosporium* LGAM 320 και *P. ostreatus* LGAM 22, ώστε να μελετηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα η δυνατότητα αξιοποίησης τους στη διαχείριση αποβλήτων προερχόμενων από ελαιοτριβεία δύο φάσεων.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αρχικών και των βιοεπεξεργασμένων υποστρωμάτων μετά το πέρας της καλλιέργειας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.8.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στις τιμές του pH στα εκχυλίσματα των υποστρωμάτων μετά την πάροδο των 6 εβδομάδων, ενώ σημαντική ήταν και η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Παρόμοια αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας έχει παρατηρηθεί μετά την ανάπτυξη μυκήτων σε ΥΑΕ τόσο στην παρούσα εργασία (Κεφάλαιο 2.7) όσο και σε παλιότερες δοκιμές (Mekki et al., 2006). Η επιτυχής ανάπτυξη των μυκήτων σε υποστρώματα αποτελούμενα από οργανικά υλικά πλούσια σε λιγνίνη και φαινολικά συστατικά όπως τα παραπροϊόντα ελαιουργίας, προϋποθέτει την παραγωγή ενζύμων εξειδικευμένων στην αποδόμηση των συστατικών αυτών. Στα πλαίσια του παρόντος πειράματος μελετήθηκε η ενεργότητα των ενζύμων λακάση (Lac), υπεροξειδάση

εξαρτημένη του μαγγανίου (MnP) και υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (MnIP) τα όποια έχει αποδειχθεί ότι συμβάλουν σημαντικά στην αποδόμηση της λιγνίνης και των φαινολικών συστατικών (Hatakka, 1994). Το *P. ostreatus* παρουσίασε την υψηλότερη τιμή ενεργότητας της λακκάσης στο υπόστρωμα ΤΡΟΜW:OLPR 1:1 (μέχρι και  $64 \text{ U l}^{-1}$ ) εμφανίζοντας τις μέγιστες τιμές μετά το πέρας της δεύτερης εβδομάδας και ακολούθησε φθίνουσα πορεία κατά την πρόοδο της καλλιέργειας (Γράφημα 2.8.2).

**Πίνακας 2.8.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αρχικών και βιοεπεξεργασμένων (ή μη) υποστρωμάτων με τους μύκητες *A. biennis*, *P. chrysosporium* και *P. ostreatus*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση και οι εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ).**

Επέμβαση	ΤΡΟΜW:OLPR (w/w)	pH	Ηλεκτρική αγωγιμότητα ( $\text{ms cm}^{-1}$ )	Ολικά φαινολικά ( $\mu\text{g GAE/g d.w}$ )	Χρώμα (525 nm)
Αρχικό υπόστρωμα	1:1	$5,20 \pm 0,17^b$	$1,92 \pm 0,13^b$	$7303,04 \pm 1142,12^a$	$0,31 \pm 0,08^a$
Μη βιοεπεξεργασμένο	1:1	$6,06 \pm 0,06^a$	$3,15 \pm 0,35^a$	$325,05 \pm 86,67^b$	$0,21 \pm 0,02^a$
<i>A. biennis</i>	1:1	$5,68 \pm 0,24^{ab}$	$2,67 \pm 0,39^a$	$324,48 \pm 197,22^b$	$0,27 \pm 0,03^a$
<i>P. chrysosporium</i>	1:1	$6,60 \pm 0,51^a$	$2,62 \pm 0,85^{ab}$	$359,77 \pm 152,57^b$	$0,24 \pm 0,07^a$
<i>P. ostreatus</i>	1:1	$5,37 \pm 0,60^{ab}$	$2,32 \pm 0,55^{ab}$	$238,51 \pm 120,9^b$	$0,25 \pm 0,03^a$
Αρχικό υπόστρωμα	3:1	$5,25 \pm 0,19^b$	$2,42 \pm 0,31^b$	$5029,42 \pm 798,92^a$	$0,20 \pm 0,02^a$
Μη βιοεπεξεργασμένο	3:1	$6,13 \pm 0,06^a$	$3,19 \pm 0,17^a$	$736,61 \pm 206,42^{bc}$	$0,23 \pm 0,04^a$
<i>A. biennis</i>	3:1	$6,20 \pm 0,30^a$	$3,07 \pm 0,57^{ab}$	$243,02 \pm 214,46^c$	$0,2 \pm 0,02^a$
<i>P. chrysosporium</i>	3:1	$6,50 \pm 0,10^a$	$3,90 \pm 0,89^a$	$445,46 \pm 109,36^c$	$0,17 \pm 0,02^a$
<i>P. ostreatus</i>	3:1	$5,50 \pm 0,50^b$	$3,36 \pm 0,46^a$	$1052,72 \pm 130,38^b$	$0,27 \pm 0,02^a$

Αντίθετα, στο υπόστρωμα που είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα ΤΡΟΜW, ενώ η μέγιστη ενεργότητα δεν διέφερε σημαντικά από το προηγούμενο υπόστρωμα, οι τιμές παρουσίασαν συνεχή αύξηση μέχρι και την τέταρτη εβδομάδα της καλλιέργειας (Γράφημα 2.8.2). Στην περίπτωση του *A. biennis*, οι μέγιστες τιμές παρατηρήθηκαν την τρίτη εβδομάδα και στα δύο υποστρώματα, όμως αυτή που σημειώθηκε στο υπόστρωμα ΤΡΟΜW:OLPR 3:1 ήταν κατά 25% υψηλότερη. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι στην περίπτωση του μύκητα *P. chrysosporium* δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή λακκάσης όπως συνέβη και κατά την ανάπτυξη τους σε ΥΑΕ (Κεφάλαιο 2.7). Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, ο εν λόγω οργανισμός παράγει πολύ μικρότερες ποσότητες λακκάσης σε σχέση με άλλους μύκητες λευκής σήψης, ενώ ελάχιστη είναι η παραγωγή του όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικά διαλύματα με μοναδική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (Cameron et al., 2000, Sayadi and Ellouz, 1992). Αναφορικά με την MnP, η παραγωγή της από το *A. biennis* ξεκίνησε κατά την τρίτη εβδομάδα και συνεχίστηκε αυξανόμενη μέχρι το πέρας της καλλιέργειας (Γράφημα 2.8.2). Στο είδος *Ph. chrysosporium*, η παραγωγή της έλαβε τη μέγιστη τιμή επίσης την τρίτη

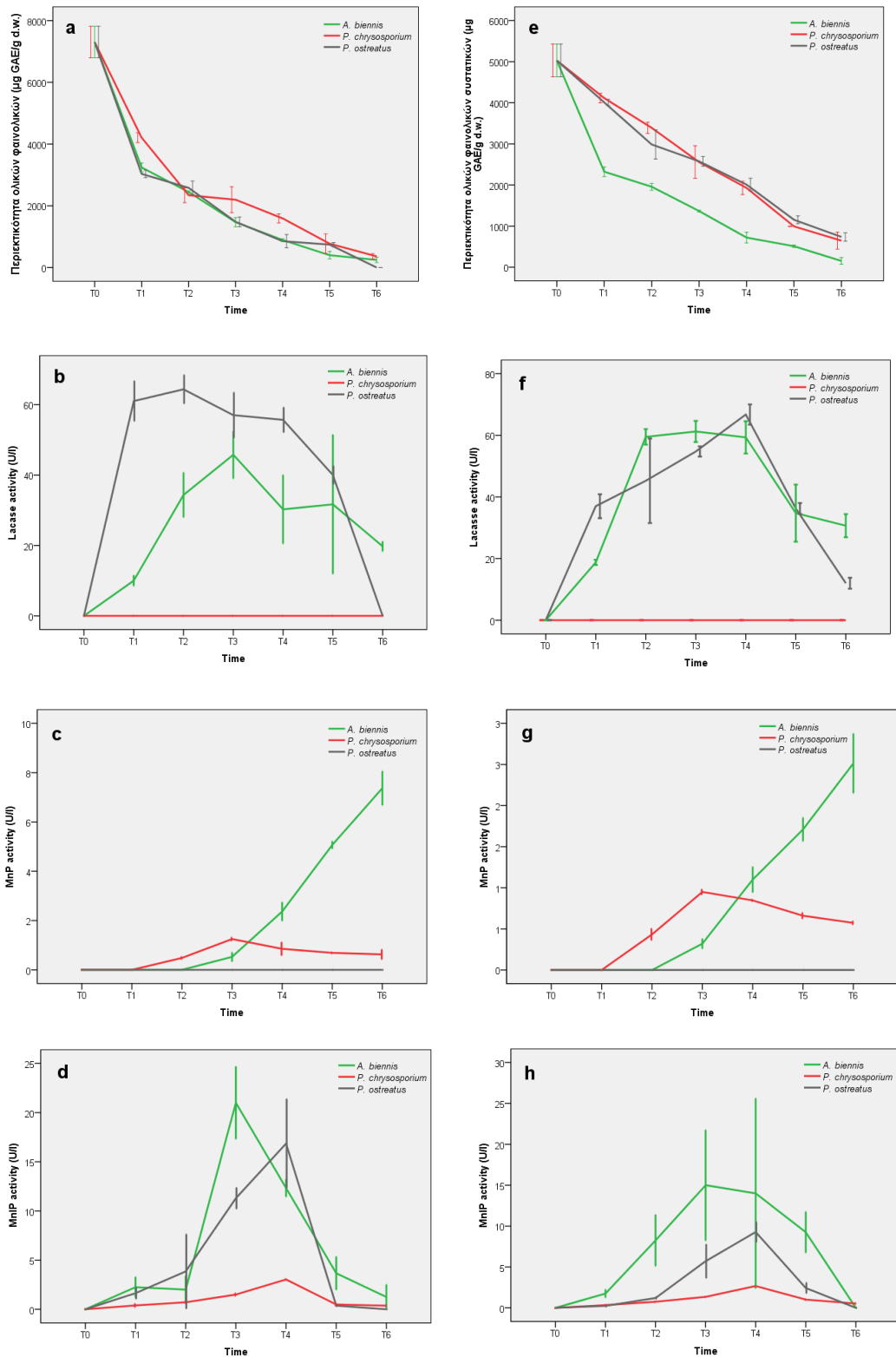
εβδομάδα ενώ δεν φαίνεται να σχηματίζεται -κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες- από το *P. ostreatus*. Τέλος, σχετικά υψηλές τιμές ενεργότητας της ΜnIP καταγράφηκαν στα *A. biennis* και *P. ostreatus*, ειδικά μεταξύ τρίτης και τέταρτης εβδομάδας επώασης, ενώ αντίθετα πολύ χαμηλότερες τιμές μετρήθηκαν στο *Ph. chrysosporium* (Γράφημα 2.8.2).

Όσον αφορά τα ολικά φαινολικά, σημειώθηκε μείωση τους από 85 έως και 100% στα δύο μείγματα που εξετάστηκαν. Στα υποστρώματα TPOMW:OLPR 1:1 ο υψηλότερος ρυθμός μείωσης καταγράφηκε την πρώτη εβδομάδα (42-56%) σε αντίθεση με το υπόστρωμα TPOMW:OLPR 3:1, για το οποίο παρατηρήθηκε ομαλή μείωση κατά τη διάρκεια της μυκηλιακής ανάπτυξης (Γράφημα 2.8.2). Μεταξύ των ειδών που εξετάστηκαν, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην μείωση των φαινολικών στο υπόστρωμα TPOMW:OLPR 1:1 (95 έως 100%), ενώ σημαντικά πιο αποδοτικός αποδομητής αποδείχθηκε ο *A. biennis* για το TPOMW:OLPR 3:1 (97 % έναντι 85 και 91% των άλλων δύο στελεχών).

### 2.8.3.3 Επίδραση της προσθήκης βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στη βλάστηση σπόρων μαρουλιού και τομάτας

Η προσθήκη μη βιοεπεξεργασμένου μείγματος παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας (TPOMW και OLPR) στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τη βλάστηση των σπόρων επέφερε σημαντική μείωση της φυτρωτικότητας συγκριτικά με τον μάρτυρα. Η μείωση αυτή ήταν ιδιαίτερα έντονη στους σπόρους του μαρουλιού (μέχρι και 100%), ενώ μικρότερη μείωση σημειώθηκε στους σπόρους τομάτας (από 25 έως 75%), αποδεικνύοντας ότι η τοξικότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του φυτού που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, το μαρούλι θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητο και συχνά χρησιμοποιείται για τη μελέτη της φυτοτοξικότητας διάφορων αποβλήτων. Σε παρόμοια εργασία οι Sampredo et al. (2007), χρησιμοποίησαν τον μύκητα *Fusarium oxysporum* για την επεξεργασία TPOMW και απέδειξαν ότι μειώνει σημαντικά την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Όταν όμως το βιοεπεξεργασμένο υλικό εφαρμόστηκε σε έδαφος για τη βλάστηση σπόρων τομάτας και μηδικής, εμφανίστηκε υψηλή φυτρωτικότητα, ενώ δεν συνέβη το ίδιο σε σπόρους μαρουλιού. Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε τύρφη και μόνο για τους σπόρους της τομάτας όπου η φυτρωτικότητα αυξήθηκε κατά 5-18%.





**Γράφημα 2.8.2.** Μείωση των ολικών φαινολικών (a, e) και ενεργότητα των (b, f) Lac (c, g) MnIP και (d, h) MnIP κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των ειδών *A. biennis*, *Ph. chrysosporium* και *P. ostreatus* σε υποστρώματα αποτελούμενα από απόβλητο ελαιотριβείου δύο φάσεων και υπολείμματα κλαδέματος ελιάς σε αναλογίες 1:1 w/w (αριστερή στήλη) και 3:1 w/w (δεξιά στήλη).

Αντίθετα με το ανεπεξέργαστο υλικό, η προσθήκη βιοεπεξεργασμένων μειγμάτων ΤΡΟΜΩ και ΟΛΡΡ οδήγησε σε αύξηση της φυτρωτικότητας ειδικά στους σπόρους της τομάτας (Πίνακας 2.8.1.) Μεταξύ των διαφορετικών τύπων υποστρώματων που χρησιμοποιήθηκαν η τύρφη φαίνεται να ωφελείται περισσότερο από την προσθήκη των βιοεπεξεργασμένων αποβλήτων, κάτι που πιθανόν οφείλεται στην προσρόφηση των φαινολικών ή άλλων τοξικών μορίων στην οργανική ουσία που περιέχει σε συνδυασμό με την υψηλή περιεκτικότητα του εν λόγω υλικού σε θρεπτικά στοιχεία σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο.

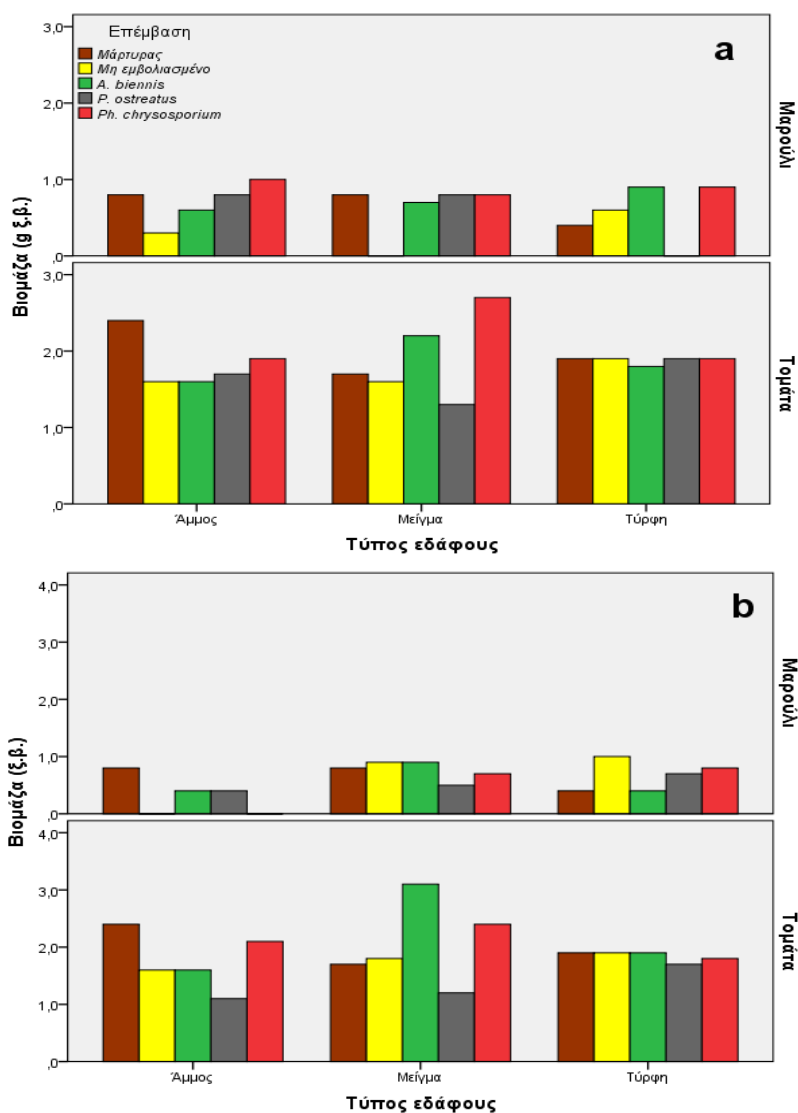
**Πίνακας 2.8.2 Ποσοστό φύτευσης σπόρων μαρουλιού και τομάτας σε τρεις τύπους υποστρώματος που περιείχαν 25% w/w βιοεπεξεργασμένο ή μη μείγμα κλαδεμάτων ελιάς και αποβλήτου ελαιοτριβείων δύο φάσεων (σε αναλογίες 1:1 ή 1:3 μεταξύ τους). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το κάθε υπόστρωμα χωρίς την προσθήκη αποβλήτου ελαιοτριβείων δύο φάσεων. Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν την διάρκεια (ημέρες) που απαιτήθηκε για τη βλάστηση των σπόρων σε κάθε επέμβαση.**

Φυτρωτικότητα % (ημέρες από τη σπορά) ΟΛΡΡ : ΤΡΟΜΩ 1:1						
Τύπος υποστρώματος	Είδος φυτού	Μάρτυρας	Μη βιοεπεξεργασμένο ΤΡΟΜΩ	<i>A. biennis</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. chrysosporium</i>
Μείγμα	Τομάτα	90 (6,0)	50 (7,8)	100 (6,4)	100 (7,4)	100 (7,1)
Άμμος	Τομάτα	90 (6,2)	25 (9,0)	50 (6,8)	100 (8,0)	75 (8,2)
Τύρφη	Τομάτα	70 (5,9)	75 (6,0)	87.5 (6,0)	100 (6,0)	100 (6,1)
Μείγμα	Μαρούλι	100(6,6)	0	62.5 (8,0)	62.5 (8,2)	50 (9,3)
Άμμος	Μαρούλι	90 (5)	12.5 (15)	62.5 (8,6)	75 (8,5)	50 (7,0)
Τύρφη	Μαρούλι	30 (6,7)	12.5 (7,0)	87.5 (8,3)	0	62.5 (9,2)
Φυτρωτικότητα % (ημέρες από τη σπορά) ΟΛΡΡ : ΤΡΟΜΩ 1:3						
Μείγμα	Τομάτα	90 (6,0)	75 (7,8)	37.5 (6,7)	75 (7,3)	75 (7,8)
Άμμος	Τομάτα	90 (6,2)	37.5 (11,0)	50 (7,5)	87.5 (8,1)	62.5 (8,8)
Τύρφη	Τομάτα	70 (5,9)	87.5 (7,1)	87.5 (6,1)	62.5 (6,4)	100 (6,3)
Μείγμα	Μαρούλι	100(6,6)	25 (7,5)	50 (8,0)	75 (9,8)	37.5 (9,7)
Άμμος	Μαρούλι	90 (5)	0	12.5 (9,0)	37.5 (9,3)	0
Τύρφη	Μαρούλι	30 (6,7)	12.5 (7)	25 (6,0)	37.5 (11,3)	25 (9,5)

Μεταξύ των τριών ειδών μυκήτων λευκής σήψης, το μεγαλύτερο ποσοστό φυτρωτικότητας παρατηρήθηκε στο βιοεπεξεργασμένο από τον *P. ostreatus* υπόστρωμα. Ειδικά στο μείγμα ΟΛΡΡ:ΤΡΟΜΩ 1:3 καταγράφηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά φυτρωτικότητας (37,7 έως 75% στο μαρούλι και 62,5 έως 87,5 στην τομάτα), παρόλο που σημείωσε τη μικρότερη μείωση των ολικών φαινολικών συγκριτικά με τα άλλα δύο στελέχη. Η παραπάνω παρατήρηση αποδεικνύει ότι η φυτοτοξικότητα δεν οφείλεται μόνο στα φαινολικά συστατικά αλλά και σε άλλες οργανικές ενώσεις. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται προϊόντα μεταβολισμού των μυκήτων όπως τα λιπαρά οξέα ή/και προϊόντα αποδόμησης των σύνθετων οργανικών μορίων (Saadi et al., 2007).

Όσον αφορά τη φυτική βιομάζα που παράχθηκε σε κάθε επέμβαση, φαίνεται ότι εξαρτάται τόσο από τον τύπο του εδάφους, όσο και από το στέλεχος του μύκητα που

χρησιμοποιήθηκε κατά την βιοεπεξεργασία του μείγματος παραπροϊόντων. Συγκεκριμένα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως βασικό υπόστρωμα η άμμος, όλες οι επεμβάσεις έδειξαν μειωμένη απόδοση σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα στα άλλα δύο υποστρώματα (τύρφη και μείγμα άμμου με βερμικουλίτη) η βιομάζα κυμάνθηκε σε παρόμοια ή και υψηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα (Γράφημα 2.8.3).



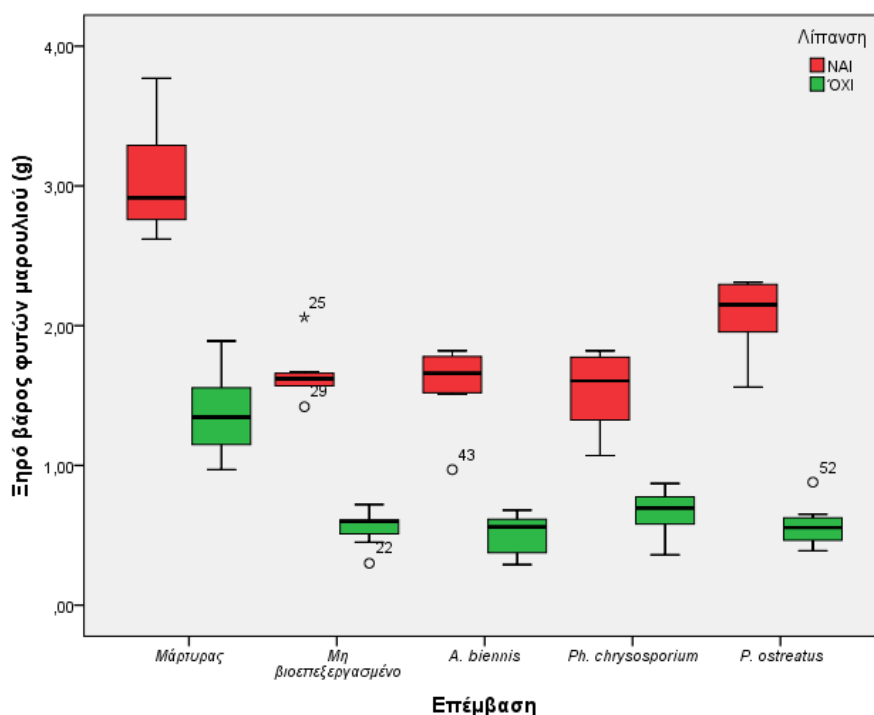
Γράφημα 2.8.3. Υπέργεια βιομάζα που παράχθηκε σε τρεις τύπους υποστρωμάτων που περιείχαν 25% (w/w) βιοεπεξεργασμένο ή μη μείγμα παραπροϊόντων ελαιουργίας-ελαιοκομίας [OLPR : TPOMW 1:1 (a) και OLPR : TPOMW 1:3 (b)], ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο υπόστρωμα χωρίς την προσθήκη μείγματος παραπροϊόντων.

Η συγκομποστοποίηση των παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας με άλλα αγροβιομηχανικά απόβλητα έχει προταθεί από αρκετούς ερευνητές. Από τα μέχρι στιγμής δεδομένα, φαίνεται ότι η περιεκτικότητα σε λιγνίνη του μείγματος αυξάνει τη μικροβιακή

δραστηριότητα και κατ' επέκταση μειώνεται το φαινολικό περιεχόμενο. Ωστόσο η βέλτιστη ποσότητα εφαρμογής στο έδαφος για τη φύτευση σπόρων ποικίλει ανάλογα με την προέλευση του αποβλήτου, το είδος των μυκήτων που χρησιμοποιούνται κατά την κομποστοποίηση, τη διάρκεια επώασης και το είδος των σπόρων που μελετάται (Saadi et al., 2007, Sampedro et al., 2004, 2005, Taccari et al., 2009).

#### 2.8.3.4 Διερεύνηση της καταλληλότητας εφαρμογής βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας στο έδαφος για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού

Το υλικό που προέκυψε από το παραπάνω πείραμα (Ενότητα 2.8.3.2) χρησιμοποιήθηκε εκτός από την δοκιμή βλάστησης των σπορών (ενότητα 2.8.3.3) και για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού. Σκοπός του παραπάνω πειράματος ήταν αφενός η διερεύνηση της καταλληλότητας των βιοεπεξεργασμένων παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας ως συστατικά υποστρωμάτων για την ανάπτυξη φυτών μαρουλιού και αφ' ετέρου ο προσδιορισμός της θρεπτικής κατάστασης τους και της ύπαρξης τυχόν τροφοπενιών ή τοξικότητας προκαλούμενα από στοιχεία ή ενώσεις που υπάρχουν στο υπόστρωμα ανάπτυξης.



Γράφημα 2.8.4. Φυτική βιομάζα (υπέργειο τμήμα, ξ.β.) με ή χωρίς την εφαρμογή λίπανσης που παρήχθη από φυτά μαρουλιού ανεπτυγμένα σε μείγμα χώματος και βιοεπεξεργασμένων ή μη παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας (4:1 w/w). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε έδαφος χωρίς την προσθήκη αποβλήτου.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις της υπέργειας βιομάζας, αυτή διέφερε σημαντικά μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων που περιείχαν παραπροϊόντα ελαιοκομίας-ελαιουργίας (Γράφημα 2.8.4). Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των τριών διαφορετικών μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην βιοεπεξεργασία των υλικών, αλλά και του μη επεξεργασμένου υλικού, δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Επιπλέον η εφαρμογή της λίπανσης είχε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών (Γράφημα 2.8.4 και Εικόνα 2.8.1). Μεταξύ των επεμβάσεων που δέχθηκαν λίπανση το βιοεπεξεργασμένο με *P. ostreatus* παραπροϊόν ήταν αυτό που απέδωσε καλύτερα σχηματίζοντας πιο εύρωστα φυτά (Εικόνα 2.8.1) συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Αντίστοιχα, μεγαλύτερα ποσοστά φυτρωτικότητας είχαν παρατηρηθεί στην περίπτωση που το συγκεκριμένο υλικό δοκιμάστηκε σε σπόρους μαρουλιού (Κεφάλαιο 2.8.3.3.). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το στέλεχος *P. ostreatus* LGM22 παρόλο που αναπτύσσεται με πολύ χαμηλότερο ρυθμό σε σχέση με τα άλλα δύο, μειώνει αποτελεσματικότερα την τοξικότητα του υποστρώματος. Επιπλέον η ιδιότητα του να παράγει εδώδιμη και υψηλής διατροφικής αξίας βιομάζα (όπως αποδείχθηκε στο Κεφάλαιο 2.1) το καθιστά ιδανικό για την αποτοξικοποίηση και τη δημιουργία προστιθέμενης αξίας σε παραπροϊόντα ελαιοκομίας-ελαιουργίας.



Εικόνα 2.8.1. Φυτά μαρουλιού ηλικίας οκτώ εβδομάδων ανεπτυγμένα σε υπόστρωμα αποτελούμενο από χώμα και βιοεπεξεργασμένο ή μη παραπροϊόν ελαιοκομίας-ελαιουργίας (4:1 w/w). Στο αριστερό τμήμα της εικόνας τοποθετήθηκαν τα φυτά που δεχόταν λίπανση με διάλυμα Hoagland κάθε 10 ημέρες.

Σύμφωνα με τις αναλύσεις των μακροστοιχείων στα φύλλα των φυτών μαρουλιού (Πίνακας 2.8.3) φαίνεται ότι το άζωτο -που αποτελεί συνήθως τον περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης των φυτών- εμφανίζει υψηλότερη συγκέντρωση στον μάρτυρα σε σχέση με όλες τις άλλες επεμβάσεις. Μεταξύ των δοκιμών που περιείχαν βιοεπεξεργασμένα παραπροϊόντα ελαιοκομίας-ελαιουργίας, αυτό που είχε την υψηλότερη συγκέντρωση αζώτου ήταν το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκε προηγουμένως το στέλεχος *P. ostreatus*. Με βάση τα παραπάνω, αλλά και τη σημαντική συσχέτιση μεταξύ παραγόμενης βιομάζας και συγκέντρωσης αζώτου στα φύλλα ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,05$ ), αποδεικνύεται ότι η τοξικότητα των παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας συνδέεται με την έλλειψη αζώτου στα φυτά. Αντίθετα με το άζωτο, πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις καλίου μετρήθηκαν στα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία των συγκεκριμένων υλικών συγκριτικά με τον μάρτυρα, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τον φωσφόρο και το νάτριο (Πίνακας 2.8.3).

**Πίνακας 2.8.3. Συγκέντρωση N, P, K και Na σε φύλλα μαρουλιού που αναπτύχθηκαν σε μείγματα χρώματος και βιοεπεξεργασμένων ή μη παραπροϊόντων ελαιοκομίας-ελαιουργίας (4:1 w/w). Στο ήμισυ των πειραματικών μονάδων εφαρμόστηκε παράλληλη λίπανση με διάλυμα Hoagland. Τον μάρτυρα αποτέλεσαν πειραματικές μονάδες οι οποίες περιείχαν μόνο χώμα. Οι τιμές εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση (n=4). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων κάθε επέμβασης (Duncan's *t*-test,  $p < 0,05$ ).**

Θρεπτικά στοιχεία (%)	Λίπανση	Μάρτυρας	Μη βιοεπεξεργασμένο παραπροϊόν			
			<i>A. biennis</i>	<i>Ph.chryso sporium</i>	<i>P.ostreatus</i>	
Ολικό N	NAI	1,73 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,19 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	1,20 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	1,46 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>
	OXI	0,92 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,70 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	0,71 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	0,71 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>
Ολικό K	NAI	1,35 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	2,49 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	2,11 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	2,05 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	2,42 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
	OXI	0,43 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	1,02 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	1,46 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	1,19 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	1,39 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
Ολικός P	NAI	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,32 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	OXI	0,22 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
Ολικό Na	NAI	0,10 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
	OXI	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>

Από τις μέχρι τώρα έρευνες είναι γνωστό ότι τα παραπροϊόντα ελαιουργίας είναι πλούσια σε κάλιο και οργανική ουσία (κυρίως λιγνίνη και κυτταρίνη) και φτωχά σε άζωτο, κάτι που επιβεβαιώνεται και από την παρούσα εργασία. Επιπλέον, και η μικρή συγκέντρωση αζώτου που περιέχεται, λόγω της χημικής της μορφής (είναι κυρίως οργανικό άζωτο), δεν είναι άμεσα διαθέσιμη στα φυτά. Για τον παραπάνω λόγο προτείνεται η προσθήκη πλούσιων σε άζωτο οργανικών πηγών κατά την κομποστοποίηση, όπως η κοπριά ζώων, τα στέμφυλα οينوποιίας και τα φύλλα ελιάς (Alburquerque et al. 2006, Baeta-Hall et al. 2005, Cayuela et

al. 2005, Cayuela et al., 2010, Walker et al., 2008). Με αυτόν τον τρόπο όχι μόνο αυξάνεται η ικανότητα ανταλλαγής ιόντων  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$ , αλλά βελτιώνεται και ο λόγος C/N, αυξάνονται οι υδατοδιαλυτές οργανικές ενώσεις και βελτιώνονται οι φυσικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος (ικανότητα συγκράτησης νερού, αερισμός κλπ.), (Cayuela et al., 2010).

Συμπερασματικά, οι μύκητες λευκής σήψης δύναται να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο στην αποτοξικοποίηση και αξιοποίηση των αποβλήτων ελαιοτριβείων δύο φάσεων. Οι διαδικασίες διαχείρισης των τελευταίων μπορούν περαιτέρω να βελτιωθούν με στόχο την αριστοποίηση των φυσικών χαρακτηριστικών και λιπαντικών ιδιοτήτων τους μέσω της ανάμιξης τους με κατάλληλα υλικά κατά τη φάση της αερόβιας ζύμωσης. Το τελικό προϊόν θα μπορούσε να εφαρμοστεί τόσο ως υπόστρωμα σποράς όσο και ανάπτυξης φυτών γεωργικού ενδιαφέροντος, μειώνοντας σημαντικά τη χρήση χημικών λιπασμάτων και συμβάλλοντας στην απορρόφηση και αξιοποίηση μέρους του τεράστιου όγκου των ελαιουργικών παραπροϊόντων.





---

# Κεφάλαιο 3

---

## **ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

Η χρήση μακρομυκήτων, οι οποίοι αναπτύσσονται στη φύση σαπροτροφικά, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προσφέρει λύσεις στη διαχείριση λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων και παραπροϊόντων. Επιπροσθέτως, η παραγωγή εδώδιμης ή και φαρμακευτικής βιομάζας σε υποστρώματα αποτελούμενα από αγροβιομηχανικά και δασικά υπολείμματα μέσω της καλλιέργειας βασιδιομυκήτων, συνδυάζεται με τη δημιουργία προϊόντων προστιθέμενης αξίας και την ταυτόχρονη μείωση των δύσκολα αποδομήσιμων συστατικών στα εξαντλημένα υποστρώματα της καλλιέργειας. Επιπλέον, η περιεκτικότητα των μανιταριών σε βιοδραστικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, ανοσορυθμιστικές και άλλες ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία ιδιότητες.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η αξιοποίηση υπολειμμάτων γεωργικής και δασικής προέλευσης για την παραγωγή εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών, καθώς και η διερεύνηση της επίδρασης του υποστρώματος στη σύσταση του τελικού προϊόντος. Μέσω της μελέτης της ενδοειδικής ποικιλότητας που εμφανίζει το είδος *Pleurotus ostreatus*, διαπιστώθηκε μεγάλο εύρος στις τιμές παραμέτρων που σχετίζονται με την αποδοτικότητα της καλλιεργητικής διαδικασίας αλλά και την περιεκτικότητα των μανιταριών σε βιοδραστικά συστατικά. Η υψηλή ετερογένεια που εντοπίστηκε μεταξύ των 16 στελεχών *P. ostreatus* που εξετάστηκαν επιβεβαιώνει τη σημασία της αξιολόγησης μεγάλου αριθμού στελεχών πριν την επιλογή των καταλληλότερων ή για την απευθείας χρήση τους είτε μέσω της δημιουργίας υβριδίων σε μονάδες καλλιέργειας μανιταριών εμπορικής κλίμακας. Επίσης αποδείχθηκε ότι η χρήση περιορισμένου αριθμού στελεχών σε σχετικές ερευνητικές εργασίες οδηγεί σε αποτελέσματα που σπάνια είναι ενδεικτικά του δυναμικού του είδους μανιταριού.

Η συγκριτική μελέτη της παραγωγής μανιταριών *P. ostreatus* και *Cyclocybe cylindracea* σε μεγάλο εύρος διαφορετικών λιγνοκυτταρινούχων παραπροϊόντων έδειξε ότι τα υποστρώματα που περιείχαν παραπροϊόντα οινοποιίας και ελαιοκομίας ήταν τα καλύτερα όσον αφορά τη βιολογική αποδοτικότητα και για τα δύο είδη βασιδιομυκήτων, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη βασική σύσταση των μανιταριών που αναπτύχθηκαν στα επιμέρους υλικά. Επιπλέον η μελέτη των ιχνοστοιχείων και των σπάνιων γαιών στα μανιτάρια και τα υποστρώματα από τα οποία προήλθαν, έδειξε ότι η απορρόφησή τους εξαρτάται τόσο από τις ιδιότητες του κάθε μετάλλου όσο και από το είδος του μύκητα.

Στη συνέχεια, η παρούσα μελέτη εστίασε στη διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης των δύο επιλεχθέντων βασικών υποστρωμάτων (δηλ. των υπολειμμάτων

οινοποιίας και αποβλήτων-παραπροϊόντων ελαιουργίας και ελαιοκομίας) στην καλλιέργεια οκτώ ειδών μανιταριών από τα γένη *Pleurotus*, *Cyclocybe*, *Hericium* και *Ganoderma*. Σε όλες τις περιπτώσεις αποδείχθηκε ότι τα συγκεκριμένα υλικά (στις κατάλληλες δοσολογίες) όχι μόνο βελτιώνουν την απόδοση σε παραγόμενα μανιτάρια, αλλά επίσης αυξάνουν σημαντικά τη συγκέντρωση σημαντικών για την ανθρώπινη υγεία βιοδραστικών συστατικών, π.χ. αντιοξειδωτικά, εργοστερόλη και β-γλουκάνες. Τα ευρήματα αυτά είναι ενδεικτικά των δυνατοτήτων εκμετάλλευσης που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα γεωργικά απόβλητα-παραπροϊόντα, ενώ ανοίγουν το δρόμο τόσο για την καλλιέργεια και άλλων ειδών μανιταριών με μεγάλη εμπορική αξία όσο και της ανάλυσης επιπλέον ενώσεων που δεν συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα εργασία (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες). Αξίζει επίσης να διερευνηθούν οι αλλαγές που ενδεχομένως προκαλούνται στις λειτουργικές/φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών από τις μεταβολές της συγκέντρωσης διαφόρων βιοδραστικών συστατικών, όπως και η δυνατότητα περαιτέρω αύξησης της περιεκτικότητας τους στα μανιτάρια μέσω στοχευμένων παρεμβάσεων στη σύσταση των υποστρωμάτων καλλιέργειας (π.χ. με προσθήκη σεληνίου ή σκουαλενίου).

Στη δεύτερη ενότητα των εργασιών της παρούσας διατριβής εξετάστηκε μεγάλο πλήθος διαφορετικών ειδών βασιδιομυκήτων όσον αφορά στην αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και τα αποδοτικότερα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν στοχευμένα ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός αποτοξικοποίησης-αποδόμησης του ρυπαντικού φορτίου των ΥΑΕ όπως και ο ρόλος των λιγνινολυτικών ενζύμων που παράγουν. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά τόσο παρουσία των επιλεγμένων μυκήτων όσο και με τη χρήση του μέσου καλλιέργειας (που περιείχε τα εξωκυτταρικά παραγόμενα ένζυμα) στο οποίο αναπτύχθηκε -υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες- στέλεχος του μύκητα *Abortiporus biennis*. Τέλος, οι προκαταρκτικές δοκιμές αξιοποίησης βιοεπεξεργασμένου (από επιλεγμένα στελέχη βασιδιομυκήτων) ημίρρευστου αποβλήτου ελαιοτριβείου δύο φάσεων σε καλλιέργεια κηπευτικών, έδειξαν ότι το τελικό προϊόν θα μπορούσε να εφαρμοστεί τόσο ως υπόστρωμα σποράς όσο και ανάπτυξης φυτών γεωργικού ενδιαφέροντος μειώνοντας τη χρήση χημικών λιπασμάτων και συμβάλλοντας στην ολοκληρωμένη διαχείριση των ελαιουργικών παραπροϊόντων.



---

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Adamovic, M., Grubic, G., Milenkovic, I., Jovanovic, R., Protic, R., Sretenovic, L., et al. (1998). The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 71, 357–362.
2. Adav, S. S., Ravindran, A. and Sze, S. K. (2012). Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. *Journal of Proteomics*, 75(5), 1493-1504.
3. Adenipekun, C. and Dada, O. (2013) Biodegradation of three agricultural wastes by a white-rot fungus, *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quélet. *Journal of Nature and Science*, 11,19–25.
4. Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., ... 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(16), 3897-3904.
5. Aggoun, M., Arhab, R., Cornu, A., Portelli, J., Barkat, M. and Graulet, B. (2016). Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food Chemistry*, 209, 72–80.
6. Aguiar, C.L. (2001). Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulíticos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 3, 117–21.
7. Aime, M. C., Matheny, P. B., Henk, D. A., Frieders, E. M., Nilsson, R. H., Piepenbring, M., ... and Bauer, R. (2006). An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*, 98(6), 896-905.
8. Aktas, E. S., Imre, S. and Ersoy, L. (2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 35(9), 2336-2340.
9. Al-Alawi, M. T. M. and Mandiwana, K. L. (2007). The use of Aleppo pine needles as a bio-monitor of heavy metals in the atmosphere. *Journal of Hazardous Materials*, 148(1-2), 43-46.
10. Albarrán, A., Celis, R., Hermosin, M. C., Lopez-Pineiro, A. and Cornejo, J. (2004). Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere*, 54(6), 717-724.
11. Albuquerque, J. A., González, J., Garcia, D. and Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195-200.
12. Albuquerque, J. A., González, J., García, D. and Cegarra, J. (2006). Effects of bulking agent on the composting of “alperujo”, the solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Process Biochemistry*, 41(1), 127-132.
13. Alcaide, E. M. and Nefzaoui, A. (1996). Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 227-235.
14. Alcaide, E. M., Ruiz, D. Y., Moumen, A. and Garcia, A. M. (2003). Ruminal degradability and in vitro intestinal digestibility of sunflower meal and in vitro digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal: comparison between goats and sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 110(1-4), 3-15.
15. Alcazar-Fuoli, L. and Mellado, E. (2012). Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3: 439, doi: 10.3389/fmicb.2012.00439.
16. Aloupi, M., Koutrotsios, G., Koulousaris, M. and Kalogeropoulos, N. (2012). Trace metal contents in wild edible mushrooms growing on serpentine and volcanic soils on the island of Lesbos, Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 184-194.
17. Alslaibi, T. M., Abustan, I., Ahmad, M. A. and Foul, A. A. (2013). Cadmium removal from aqueous solution using microwaved olive stone activated carbon. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3), 589-599.
18. Altieri, R., Esposito, A., Parati, F., Lobianco, A. and Pepi, M. (2009). Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 993–997.
19. Amirta, R., Herawati, E., Suwinarti, W. and Watanabe, T. (2016). Two-steps utilization of shorea wood waste biomass for the production of oyster mushroom and biogas—a zero waste approach. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 202-208.

20. Anwar, Z., Gulfraz, M. and Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173.
21. AOAC (1995). Official methods of analysis (16th ed.). Arlington VA, USA.
22. Aranda, E., Kinne, M., Kluge, M., Ullrich, R. and Hofrichter, M. (2009). Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 1057.
23. Arapoglou, D., Israilides, C. J., Bocari, M., Scanlon, B. and Smith, A. (2002). A novel approach to grape waste treatment. In *Proceedings of the International Conference. Protection and Restoration of the Environment VI* (p. 469). Skiathos.
24. Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C. and Oliveira, M. B. P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 200-211.
25. Arjona, R. and Ollero, P. (2005). Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *Journal of Food Engineering*, 68(2), 239-247.
26. Arjona, R., Garcia, A. and Ollero, P. (1999). The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering*, 41(3-4), 229-234.
27. Aruguete, D.M., Aldstadt, J.H. and Mueller, G.M. (1998). Accumulation of several heavy metals and lanthanides in mushrooms (Agaricales) from the Chicago region. *Science of the Total Environment*, 224, 43-56.
28. Asses, N., Farhat, A., Cherif, S., Hamdi, M. and Bouallagui, H. (2018). Comparative study of sewage sludge co-composting with olive mill wastes or green residues: Process monitoring and agriculture value of the resulting composts. *Process Safety and Environmental Protection*, 114, 25-35.
29. Astals, S., Nolla-Ardèvol, V. and Mata-Alvarez, J. (2012). Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: Biogas and digestate. *Bioresource Technology*, 110, 63-70.
30. Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G. and Odier, E. (1988). Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 393-398.
31. Athanasoulia, E., Melidis, P. and Aivasidis, A. (2012). Anaerobic waste activated sludge co-digestion with olive mill wastewater. *Water Science and Technology*, 65(12), 2251-2257.
32. Aurrekoetxea, I., Ruiz-Sanz, J. I., del Agua, A. R., Navarro, R., Hernández, M. L., Matorras, R., ... and Ruiz-Larrea, M. B. (2010). Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 94(4), 1279-1286.
33. Avni, S., Ezove, N., Hanani, H., Yadid, I., Karpovsky, M., Hayby, H., ... and Danay, O. (2017). Olive mill waste enhances  $\alpha$ -glucan content in the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1564.
34. Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F. and Ozer, A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34(3), 209-247.
35. Azizi, M., Tavana, M., Farsi, M. and Oroojalian, F. (2012). Yield performance of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst.(higher basidiomycetes), using different waste materials as substrates. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(5), 521-527.
36. Babu, B. V. (2008). Biomass pyrolysis: a state-of-the-art review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(5), 393-414.
37. Badu, M., Twumasi, S. K. and Boadi, N. O. (2011). Effects of lignocellulosic in wood used as substrate on the quality and yield of mushrooms. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 780-784.
38. Baeta-Hall, L., Sàágua, M. C., Bartolomeu, M. L., Anselmo, A. M. and Rosa, M. F. (2005). Bio-degradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Bioresource Technology*, 96(1), 69-78.
39. Bailey, M. J., Biely, P. and Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270.
40. Bak, J. S., Kim, M. D., Choi, I. G. and Kim, K. H. (2010). Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. *New Biotechnology*, 27(4), 424-434.

41. Balcázar-López, E., Méndez-Lorenzo, L. H., Batista-García, R. A., Esquivel-Naranjo, U., Ayala, M., Kumar, V. V., ... and Folch-Mallol, J. L. (2016). Xenobiotic compounds degradation by heterologous expression of a *Trametes sanguineus* laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLoS one*, 11(2), e0147997.
42. Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial technology*, 32(1), 78-91.
43. Baldrian, P. (2006). Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242.
44. Baldrian, P. and Gabriel, J. (2003). Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 235-240.
45. Baldrian, P. and Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501-521.
46. Baldrian, P., Valášková, V., Merhautová, V. and Gabriel, J. (2005). Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 670-676.
47. Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M. and Ferreira, I. C. F. R. (2008). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3856–3862.
48. Bautista, L. F., Morales, G. and Sanz, R. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on amino-functionalized SBA-15. *Chemosphere*, 136, 273-280.
49. Bayrak, E. (2013). *Utilization of wine waste for fermentative processes* (Master's thesis, İzmir Institute of Technology).
50. Begerow, D., Stoll, M. and Bauer, R. (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia*, 98(6), 906-916.
51. Bekiaris, G., Bruun, S., Peltre, C., Houot, S. and Jensen, L. S. (2015). FTIR–PAS: A powerful tool for characterising the chemical composition and predicting the labile C fraction of various organic waste products. *Waste management*, 39, 45-56.
52. Bekiaris, G., Lindedam, J., Peltre, C., Decker, S. R., Turner, G. B., Magid, J. and Bruun, S. (2015). Rapid estimation of sugar release from winter wheat straw during bioethanol production using FTIR-photoacoustic spectroscopy. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 85.
53. Bekiaris, G., Peltre, C., Jensen, L. S., and Bruun, S. (2016). Using FTIR-photoacoustic spectroscopy for phosphorus speciation analysis of biochars. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 168, 29-36.
54. Belaqqiz, M., El-Abbassi, A., Lakhali, E. K., Agrafioti, E. and Galanakis, C. M. (2016). Agronomic application of olive mill wastewater: effects on maize production and soil properties. *Journal of Environmental management*, 171, 158-165.
55. Belinky, P. A., Flikshtein, N., Lechenko, S., Gepstein, S. and Dosoretz, C. G. (2003). Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6500-6506.
56. Benimeli, C. S., Castro, G. R., Chaile, A. P. and Amoroso, M. J. (2007). Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(2), 148-155.
57. Bennett, J.W., Wunch, K.G. and Faison, B.D. Use of fungi in biodegradation. In: Hurst CJ, editor. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC: AMS press; 2002. p. 960–71.
58. Benzie, I. F., and Wachtel-Galor, S. (Eds.). (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC Press.
59. Beres, C., Simas-Tosin, F. F., Cabezudo, I., Freitas, S. P., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C. and Cabral, L. M. (2016). Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. *Food Chemistry*, 201, 145-152.
60. Bermek, H., Li, K. and Eriksson, K. E. L. (2002). Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology*, 85(3), 249-252.
61. Bернаś, E., Jaworska, G. and Lisiewska, Z. (2006). Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 5(1), 5-20.
62. Bertin, L., Colao, M. C., Ruzzi, M. and Fava, F. (2004). Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS microbiology ecology*, 48(3), 413-423.



63. Bertran, E., Sort, X., Soliva, M. and Trillas, I. (2004). Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource technology*, 95(2), 203-208.
64. Bibak, A., Stümp, S., Knudsen, L. and Gundersen, V. (1999). Concentrations of 63 elements in cabbage and sprouts in Denmark. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30, 2409-2418.
65. Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. and Iqbal, H. M. (2017). Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. *Science of The Total Environment*, 576, 646-659.
66. Blanchette, R. A. (1984). Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3), 647-653.
67. Blázquez, P., Caminal, G., Sarra, M., Vicent, M. T. and Gabarrell, X. (2002). Olive Oil Mill Waste Waters Decoloration and Detoxification in a Bioreactor by the White Rot Fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Biotechnology progress*, 18(3), 660-662.
68. Blasi, C.D., Tanzi, V. and Lanzette, M. (1997). A study on the production of agricultural residues in Italy. *Biomass and Bioenergy*, 12, 321–333.
69. Blázquez, G., Calero, M., Hernáinz, F., Tenorio, G. and Martín-Lara, M. A. (2010). Equilibrium biosorption of lead (II) from aqueous solutions by solid waste from olive-oil production. *Chemical Engineering Journal*, 160(2), 615-622.
70. Bonanomi, G., Giorgi, V., Del Sorbo, G., Neri, D. and Scala, F., (2006). Olive mill residues affect saprophytic growth and disease incidence of foliar and soilborne plant fungal pathogens. *Agricultural, Ecosystems and Environment*, 115, 194–200.
71. Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H. M. and Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated on different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, 88, 425–428.
72. Borja, R., Rincón, B., Raposo, F., Alba, J. and Martín, A. (2003). Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 139-145.
73. Borovička, J., Kubrová, J., Rohovec, J., Řanda, Z. and Dunn, C.E. (2011). Uranium, thorium and rare earth elements in macrofungi: what are the genuine concentrations? *Biometals*. 24, 837-845. doi: 10.1007/s10534-011-9435-4.
74. Boudet, A. M. (2000). Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 81-96.
75. Bourbonnais, R. and Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267(1), 99-102.
76. Bouzid, O., Navarro, D., Roche, M., Asther, M., Haon, M., Delattre, M., ... and Lesage-Meessen, L. (2005). Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Process Biochemistry*, 40(5), 1855-1862.
77. Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S. and Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1-17.
78. Buswell, J. A., Cai, Y. and Chang, S. T. (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128(1), 81-87.
79. Cabuk, A., Unal, A. T. and Kolankaya, N. (2006). Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, 28(16), 1313-1317.
80. Cai, Y., Gong, Y., Liu, W., Hu, Y., Chen, L., Yan, L., ... and Bian, Y. (2017). Comparative secretomic analysis of lignocellulose degradation by *Lentinula edodes* grown on microcrystalline cellulose, lignosulfonate and glucose. *Journal of Proteomics*, 163, 92-101.
81. Callac, P., Theochari, I. and Kerrigan, R.W. (2002). The germplasm of *Agaricus bisporus*: main results after ten years of collection in France, in Greece, and in North America. *Acta Horticulturae*, 579,49–55.
82. Camarero, S., Bocchini, P., Galletti, G. C., Martinez, M. J. and Martinez, A. T. (2001). Compositional changes of wheat lignin by a fungal peroxidase analyzed by pyrolysis-GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58, 413-423.
83. Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Sarkar, S., Martínez, M. J. and Martínez, A. T. (2000). The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), 37-43.

84. Caputo, A. C., Scacchia, F. and Pelagagge, P. M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, 23(2), 197-214.
85. Carabajal, M., Levin, L., Albertó, E. and Lechner, B. (2012). Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 66,71–76.
86. Cariello, M.E., Castañeda, L., Riobo, I. and González, J. (2007). Endogenous microorganisms inoculant to speed up the composting process of urban swage sludge. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 7,26–37.
87. Carneiro, L. J., Costa, M. S. D. M., Costa, L. A. D. M., Martins, M. F. and Rozatti, M. A. (2013). Nutrient loss in composting of agroindustrial residues. *Engenharia Agrícola*, 33(4), 796-807.
88. Carrasco-González, J.A., Serna-Saldívar, S.O. and Gutiérrez-Urbe, J.A. (2017). Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 69–81.
89. Casa, R., D’Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G. and Cascio, B. L. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8), 959-966.
90. Casa, R., D’Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G. and Cascio, B. L. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8), 959-966.
91. Cassano, A., Conidi, C., Giorno, L. and Drioli, E. (2013). Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 248, 185-193.
92. Cayuela, M. L., Bernal, M. P. and Roig, A. (2004). Composting olive mill waste and sheep manure for orchard use. *Compost Science and Utilization*, 12(2), 130-136.
93. Cayuela, M. L., Sánchez-Monedero, M. A. and Roig, A. (2010). Two-phase olive mill waste composting: enhancement of the composting rate and compost quality by grape stalks addition. *Biodegradation*, 21(3), 465-473.
94. Cayuela, M. L., Sánchez-Monedero, M. A. and Roig, A. (2010). Two-phase olive mill waste composting: enhancement of the composting rate and compost quality by grape stalks addition. *Biodegradation*, 21(3), 465-473.
95. Cayuela, M. L., Sanchez-Monedero, M. A., Molina, J. and Roig, A. (2005). Compost production from olive oil processing. *Biocycle*, 46(2), 64-65.
96. Cayuela, M.L. (2004). Produccion Industrial de compost ecologico a partir de residuos de almazara. Ph.D. thesis, University of Murcia, Spain.
97. Cegarra, J., Amor, J.B., Gonzalvez, J., Bernal, M.P. and Roig, A., (2000). Characteristics of a new solid olive-mill-by-product (“alperujo”) and its suitability for composting. In: Warman, P.R., Taylor, B.R. (Eds.), Proceedings of the International Composting Symposium ICS99, 1. CBA Press Inc., pp. 124–140.
98. Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P. and Garcia, D. (1996). Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 193-203.
99. Cermola, F., DellaGreca, M., Iesce, M. R., Montella, S., Pollio, A. and Temussi, F. (2004). A mild photochemical approach to the degradation of phenols from olive oil mill wastewater. *Chemosphere*, 55(7), 1035-1041.
100. Chahal D.S. (1991). Pretreatment of lignocellulose. In: Chahal DS, editor. Food, Feed and Fuel from Biomass, Oxford and IBH, New Delhi, p. 59–83.
101. Chandra, R., Takeuchi, H. and Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(3), 1462-1476.
102. Chen, C. L., Wu, J. H., Tseng, I. C., Liang, T. M. and Liu, W. T. (2009). Characterization of active microbes in a full-scale anaerobic fluidized bed reactor treating phenolic wastewater. *Microbes and Environments*, 24(2), 144-153.
103. Chen, H. (2014). Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose* (pp. 25-71). Springer, Dordrecht.
104. Cheung, P. C. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2(3-4), 162-166.

105. Chou W.T., Sheih I.C. and Fang T.J. (2013). The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *Journal of Food Science*, 78 (7), 1041-1048.
106. Christ, K. L. and Burritt, R. L. (2013). Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 232-242.
107. Chrysargyris, A., Antoniou, O., Tzionis, A., Prasad, M. and Tzortzakis, N. (2018). Alternative soilless media using olive-mill and paper waste for growing ornamental plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.
108. Čilerdžić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Stanojković, T. and Glamočlija, J. (2014). Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 312-319.
109. Ciolacu, D., Ciolacu, F. and Popa, V. I. (2011). Amorphous cellulose—structure and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(1), 13.
110. Clemente, R., Paredes, C. and Bernal, M. P. (2007). A field experiment investigating the effects of olive husk and cow manure on heavy metal availability in a contaminated calcareous soil from Murcia (Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118(1-4), 319-326.
111. Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 12, 10815-10837.
112. Cocchi, L., Vescovi, L., Petrini, L. E. and Petrini, O. (2006). Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry*, 98(2), 277-284.
113. COFEMERMIR. Análisis Sectorial. Cadena Productiva de Frijol; 2006 ([www.cofemermir.gob.mx/uploadtests/15463.59.59.1.CADENA%20PRODUCTIVA%20DE%20FRIJOL%2027-05-2008.docx](http://www.cofemermir.gob.mx/uploadtests/15463.59.59.1.CADENA%20PRODUCTIVA%20DE%20FRIJOL%2027-05-2008.docx)).
114. Conidi, C., Mazzei, R., Cassano, A. and Giorno, L. (2014). Integrated membrane system for the production of phytotherapics from olive mill wastewaters. *Journal of Membrane Science*, 454, 322-329.
115. Corrêa, R. C. G., da Silva, B. P., Castoldi, R., Kato, C. G., de Sá-Nakanishi, A. B., Peralta, R. A., ... and Peralta, R. M. (2016). Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a source of easily hydrolyzable lignocellulose. *Folia Microbiologica*, 61(5), 439-448.
116. Cotton, S. A. 2006. Lanthanide and actinide chemistry, John Wiley and Sons, West Sussex
117. Couto, S. R. and Sanromán, M. A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 211-219.
118. Crognale, S., Federici, F., and Petruccioli, M. (2003).  $\beta$ -Glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters. *Biotechnology Letters*, 25(23), 2013-2015.
119. Curvetto, N. R., Figlas, D., Devalis, R. and Delmastro, S. (2002). Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH<sub>4</sub> and/or Mn(II). *Bioresource Technology*, 84, 171-176.
120. da Silva, M. C., Naozuka, J., da Luz, J. M. R., de Assunção, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C., ... and Kasuya, M. C. (2012). Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chemistry*, 131(2), 558-563.
121. D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, F., and Fenice, M. (2004). *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microbiology*, 155(7), 596-603.
122. de Assunção, L. S., da Luz, J. M. R., da Silva, M. D. C. S., Vieira, P. A. F., Bazzolli, D. M. S., Vanetti, M. C. D. and Kasuya, M. C. M. (2012). Enrichment of mushrooms: an interesting strategy for the acquisition of lithium. *Food Chemistry*, 134(2), 1123-1127.
123. Deepalakshmi, K. and Mirunalini, S. (2011). Therapeutic properties and current medical usage of medicinal mushroom: *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(8), 1922.
124. Dehorter, B. and Blondeau, R. (1992). Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 94(3), 209-215.
125. Delfin, A.I. and Duran de bazúa, C. (2003) Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. *Revista Internacional de Contaminación*, 19,37-45.
126. Deng, Q., Penner, M. H. and Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720.

127. Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F. and Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552.
128. Dorado, J., Field, J., Almendros, G. and Sierra-Alvarez, R. (2001). Nitrogen-removal with protease as a method to improve the selective delignification of hemp stemwood by the white-rot fungus *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 205-211.
129. Drivelos, S.A., Danezis, G.P., Haroutounian, S.A. and Georgiou, C.A. (2016). Rare earth elements minimal harvest year variation facilitates robust geographical origin discrimination: The case of PDO "Fava Santorinis". *Food Chemistry*, 213, 238-245.
130. Drivelos, S.A., Higgins, K., Kalivas, J.H., Haroutounian, S.A. and Georgiou, C.A., 2014. Data fusion for food authentication. Combining rare earth elements and trace metals to discriminate "fava Santorinis" from other yellow split peas using chemometric tools. *Food Chemistry*. 165, 316-322.
131. Droussi, Z., D'orazio, V., Provenzano, M. R., Hafidi, M. and Ouattmane, A. (2009). Study of the biodegradation and transformation of olive-mill residues during composting using FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1281-1285.
132. Dumonceaux, T., Bartholomew, K., Valeanu, L., Charles, T. and Archibald, F. (2001). Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8-9), 478-489.
133. Dundar, A., Acay, H. and Yildiz, A. (2009). Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *African Journal of Biotechnology*, 8(4).
134. Dundar, A., Acay, H. and Yildiz, A. (2009). Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *African Journal of Biotechnology*, 8, 662-666.
135. Dwyer, K., Hosseinian, F. and Rod, M. (2014). The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2), 91.
136. Dzung, N. A., Dzung, T. T. and Khanh, V. T. P. (2013). Evaluation of coffee husk compost for improving soil fertility and sustainable coffee production in rural central highland of Vietnam. *Resources and Environment*, 3(4), 77-82.
137. Edens, W. A., Goins, T. Q., Dooley, D. and Henson, J. M. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3071-3074.
138. Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K. E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151-1158.
139. Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K. E. L. (1996). Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase: role of laccase in lignin biodegradation.
140. El Hajjouji, H., El Fels, L., Pinelli, E., Barje, F., El Asli, A., Merlina, G., and Hafidi, M. (2014). Evaluation of an aerobic treatment for olive mill wastewater detoxification. *Environmental Technology*, 35(24), 3052-3059.
141. El-Abbassi, A., Saadaoui, N., Kiai, H., Raiti, J. and Hafidi, A. (2017). Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Science of the Total Environment*, 576, 10-21.
142. Elisashvili, V., Kachlishvili, E. and Asatiani, M. D. (2015). Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (higher basidiomycetes) productivity and lignocellulolytic enzyme profiles during wheat straw and tree leaf bioconversion. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(1).
143. Elisashvili, V., Kachlishvili, E. and Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1531-1538.
144. Erkel, E. I. (2009). The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7, 841-844.
145. Ezeji, T.C., Qureshi, N., Karcher, P. and Blaschek, H.P. (2006). Butanol production from corn. In: Minter Shelly, editor. *Alcoholic fuels*. Boca Raton: Taylor and Francis Group. p. 99-122.

146. Fagan, C.C. (2014). Infrared Spectroscopy. In: O'Donnell CP, Fagan C, Cullen PJ, editors. *Process Analytical Technology for the Food Industry*. New York, NY: Springer New York. p. 73-101.
147. Falandysz, J., Sapkota, A., Mędyk, M. and Feng, X. (2016). Rare earth elements in parasol mushroom *Macrolepiota procera*. *Food Chemistry*, 221, 24-28.
148. FAO. Nueva estrategia para la yuca. Departamento de Agricultura y protección del consumidor; 2005 ([www.fao.org/ag/esp/revista/0006sp1.htm](http://www.fao.org/ag/esp/revista/0006sp1.htm)).
149. FAO-docrep. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006 ([www.fao.org/docrep/009/j7927s/j7927s02.htm](http://www.fao.org/docrep/009/j7927s/j7927s02.htm) - 36k).
150. FAO-esc. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008. Comercio y Mercados ([www.fao.org/es/ESC/es/15/320/highlight\\_326.html](http://www.fao.org/es/ESC/es/15/320/highlight_326.html)).
151. FAOSTAT. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
152. Felizon, B., Fernandez-Bolanos, J., Heredia, A., Guillen, R., (2000). Steamexplosion pre-treatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 15-22.
153. Fernandes, Â., Barros, L., Martins, A., Herbert, P. and Ferreira, I.C. (2015). Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. *Food Chemistry*, 169, 396-400.
154. Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R. and Jiménez, A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid- solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(23), 6804-6811.
155. Fernández-Hernández, A., Roig, A., Serramiá, N., Civantos, C. G. O. and Sánchez-Monedero, M. A. (2014). Application of compost of two-phase olive mill waste on olive grove: effects on soil, olive fruit and olive oil quality. *Waste Management*, 34(7), 1139-1147.
156. Fernández-Hernández, A., Roig, A., Serramiá, N., Civantos, C. G. O. and Sánchez-Monedero, M. A. (2014). Application of compost of two-phase olive mill waste on olive grove: effects on soil, olive fruit and olive oil quality. *Waste Management*, 34(7), 1139-1147.
157. Fezzani, B. and Cheikh, R. B. (2010). Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature. *Bioresource Technology*, 101(6), 1628-1634.
158. Filippi, C., Bedini, S., Levi-Minzi, R., Cardelli, R. and Saviozzi, A. (2002). Cocomposting of olive oil mill by-products: chemical and microbiological evaluations. *Compost Science and Utilization*, 10(1), 63-71.
159. 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(19), 4735-4744.
160. Foust, T.D., Ibsen, K.N., Dayton, D.C., Hess, J.R. and Kenney, K.E. (2008) The biorefinery. In: Himmel ME (ed) *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Blackwell, Chichester, pp 7-37.
161. FRA (Puill LG). La soja deja sin pan a los campesinos pobres. (2006). ([www.tlaxcala.es/pp.asp?reference=1053andlg=es](http://www.tlaxcala.es/pp.asp?reference=1053andlg=es) - 25k)
162. Freeman, B. M., Lee, T. H. and Turkington, C. R. (1979). Interaction of irrigation and pruning level on growth and yield of Shiraz vines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(3), 218-223.
163. Fryssouli, V., Polemis, E., Typas M.A. and Zervakis G.I. (2017). Phylogenetic study of European species of the genus *Ganoderma* (Basidiomycota) through the use of a multigene analysis combined with morphological characters. In *Proceedings of the 9th International Medicinal Mushrooms Conference*, pp. 22-23. Edited by M.L. Gargano and G. Venturella. Palermo, Italy.
164. Fujian, X., Hongzhang, C. and Zuohu, L. (2001). Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, 80(2), 149-151.
165. Gaitán-Hernández R. and Salmenes, D. (2008) Obtaining and characterizing *Pleurotus ostreatus* strains for commercial cultivation under warm environmental conditions. *Scientia Horticulturae*, 118, 106-110.
166. Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2), 68-87.

167. Galanakis, C. M. (2016). Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management. Academic Press.
168. Galbe, M., Lidén, G. and Zacchi, G. (2005) Production of ethanol from biomass—research in Sweden. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, 905–19.
169. Gambogi, J. (2011). Rare earths. US Geological Survey minerals yearbook—2011. 60–60.12.
170. Gámiz, B., Pignatello, J. J., Cox, L., Hermosín, M. C. and Celis, R. (2016). Environmental fate of the fungicide metalaxyl in soil amended with composted olive-mill waste and its biochar: an enantioselective study. *Science of the Total Environment*, 541, 776-783.
171. Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W. M. and Liang, H. (2010). A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 70-77.
172. Gao, S., Lai, C. K. and Cheung, P. C. K. (2009). Nondigestible carbohydrates isolated from medicinal mushroom sclerotia as novel prebiotics. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(1).
173. García-Gómez, A., Roig, A. and Bernal, M. P. (2003). Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 86(1), 59-64.
174. García-Lomillo, J. and González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 3-22.
175. García-Maraver, A., Salvachúa, D., Martínez, M. J., Diaz, L. F. and Zamorano, M. (2013). Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste Management*, 33(11), 2245-2249.
176. Gargano, M. L., van Griensven, L. J. L. D., Isikhuehmen, O. S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S. P. and Zervakis, G. I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems*, 151, 548–565.
177. Gärtner, R., Gasnier, B. C., Dietrich, J. W., Krebs, B. and Angstwurm, M. W. (2002). Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(4), 1687-1691.
178. Gąsecka, M., Magdziak, Z., Siwulski, M. and Mleczek, M. (2017). Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *European Food Research and Technology*, doi:10.1007/s00217-017-2952-9.
179. Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Verma, M. and Surampalli, R. Y. (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 388-394.
180. Geng, X. and Li, K. (2002). Degradation of non-phenolic lignin by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 342-346.
181. Geurts, L., Neyrinck, A.M. and Delzenne, N.M. (2014). Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: Novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes*, 5, 3-17.
182. Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
183. Gigliotti, G., Proietti, P., Said-Pullicino, D., Nasini, L., Pezzolla, D., Rosati, L. and Porceddu, P. R. (2012). Co-composting of olive husks with high moisture contents: organic matter dynamics and compost quality. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 67, 8-14.
184. Gold, M., Youngs, H. and Gelpke, M. (2000). Manganese peroxidase. In: Sigel A, Sigel H (eds) Metal ions in biological systems, vol 37. Institute of Inorganic Chemistry, Basel, pp 559–580.
185. Goldfarb, J. L., Buessing, L., Gunn, E., Lever, M., Billias, A., Casoliba, E., ... and Adani, F. (2016). Novel integrated biorefinery for olive mill waste management: utilization of secondary waste for water treatment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(1), 876-884.
186. Gonçalves, M. R., Costa, J. C., Marques, I. P. and Alves, M. M. (2012). Strategies for lipids and phenolics degradation in the anaerobic treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 46(6), 1684-1692.
187. Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J. and Tsao, G. T. (1999). Ethanol production from renewable resources. In *Recent progress in bioconversion of lignocellulosics* (pp. 207-241). Springer, Berlin, Heidelberg.

188. González, R., Ballester, I., Lopez-Posadas, R., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O. and Sánchez de Medina, F. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 331–362.
189. González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S. and Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 234-238.
190. Gould, T. D., O'donnell, K. C., Dow, E. R., Du, J., Chen, G. and Manji, H. K. (2008). Involvement of AMPA receptors in the antidepressant-like effects of lithium in the mouse tail suspension test and forced swim test. *Neuropharmacology*, 54(3), 577-587.
191. Govindaraju, K. (1994). Compilation of working values and sample description for 383 geostandards. *Geostandards Newsletter*, 18, 1-158.
192. Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R. and Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1-2), 1-22.
193. Grinhut, T., Salame, T. M., Chen, Y. and Hadar, Y. (2011). Involvement of ligninolytic enzymes and Fenton-like reaction in humic acid degradation by *Trametes* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 1131-1140.
194. Grognalet, S., Federici, F. and Petruccioli, M. (2003).  $\beta$ -glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters. *Biotechnology Letters*, 25(23), 2013-2015.
195. Guan, B., Latif, P. A. and Yap, T. (2013). Physical preparation of activated carbon from sugarcane bagasse and corn husk and its physical and chemical characteristics. *International Journal of Engineering Research and Science and Technology*, 2, 1-14.
196. Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345–391.
197. Günç Ergönül, P., Akata, I., Kalyoncu, F. and Ergönül, B. (2013). Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*. doi:10.1155/2013/163964.
198. Haddadin, M. S., Abdulrahim, S. M., Al-Khawaldeh, G. Y. and Robinson, R. K. (1999). Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology*, 74(7), 613-618.
199. Hafidi, M., Amir, S. and Revel, J. C. (2005). Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR. *Process Biochemistry*, 40(8), 2615-2622.
200. Hammel, K.E. (1997). Fungal degradation of lignin. In: Cadisch G, Giller KE, editors. *Plant litter quality and decomposition*. CAB-International. p. 33–46
201. Hammel, K. E. and Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 349-355.
202. Hammel, K. E., Mozuch, M. D., Jensen Jr, K. A. and Kersten, P. J. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recycling during oxidation of the arylglycerol. Beta.-aryl ether lignin structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase. *Biochemistry*, 33(45), 13349-13354.
203. Hamza, M., Khoufi, S. and Sayadi, S. (2012). Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 131(4), 1430-1436.
204. Hasan, H.A.H. (2000). Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 607–12.
205. Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbuechel A, editors. *Biopolymers. Vol. 1—Lignin, humic substances and coal*. Weinheim, Germany. Wiley-VCH, p. 129–80.
206. Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3), 125-135.
207. Hatakka, A. I. (1983). Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 350-357.
208. Hatakka, A. and Hammel, K.E. (2011) Fungal biodegradation of lignocelluloses. In: Hofrichter M (ed) *The Mycota: industrial applications*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 319–340.
209. Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422-1432.

210. Heinfling, A. M. M. J. M. A. T. B. M. S. U., Martinez, M. J., Martinez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 2788-2793.
211. Henriksson, G., Salumets, A., Divne, C. and Pettersson, G. (1997). Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase 1. *Biochemical Journal*, 324(3), 833-838.
212. Hills, D. J. and Roberts, D. W. (1981). Anaerobic digestion of dairy manure and field crop residues. *Agricultural Wastes*, 3(3), 179-189.
213. Hmid, A., Al Chami, Z., Sillen, W., De Vocht, A. and Vangronsveld, J. (2015). Olive mill waste biochar: a promising soil amendment for metal immobilization in contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1444-1456.
214. Hoa, H. T., Wang, C. L. and Wang, C. H. (2015). The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(4), 423-434.
215. Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edition).
216. Hofrichter, M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 454-466.
217. Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 175-186.
218. Homma, H., Shinoyama, H., Nobuta, Y., Terashima, Y., Amachi, S. and Fujii, T. (2007). Lignin-degrading activity of edible mushroom *Strobilurus ohshimae* that forms fruiting bodies on buried sugi (*Cryptomeria japonica*) twigs. *Journal of Wood Science*, 53(1), 80-84.
219. Horizontea, I. (2008). El cultivo de girasol necesita recuperar competitividad. *Magazine de las Ciencias Agrarias*, (Horizontea.com/s/h/?113andcategoria=ACTUALIDAD - 13k).
220. Houtman, C. J., Maligaspe, E., Hunt, C. G., Fernández-Fueyo, E., Martínez, A. T. and Hammel, K. E. (2018). Fungal lignin peroxidase does not produce the veratryl alcohol cation radical as a diffusible ligninolytic oxidant. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-RA117.
221. Howard, R. L., Abotsi, E. L. J. R., Van Rensburg, E. J. and Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602-619.
222. Huang, D. L., Zeng, G. M., Feng, C. L., Hu, S., Zhao, M. H., Lai, C., ... and Liu, H. L. (2010). Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress. *Chemosphere*, 81(9), 1091-1097.
223. Hurwitz, B. E., Klaus, J. R., Llabre, M. M., Gonzalez, A., Lawrence, P. J., Maher, K. J., ... and Schneiderman, N. (2007). Suppression of human immunodeficiency virus type 1 viral load with selenium supplementation: a randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*, 167(2), 148-154.
224. Hytiris, N., Kapellakis, I. E. and Tsagarakis, K. P. (2004). The potential use of olive mill sludge in solidification process. *Resources, Conservation and Recycling*, 40(2), 129-139.
225. Ingale, A. and Ramteke, A. (2010). Studies on cultivation and biological efficiency of mushrooms grown on different agro-residues. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 6, 25-28.
226. Ioannidou, O. and Zabaniotou, A. (2007). Agricultural residues as precursors for activated carbon production—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(9), 1966-2005.
227. Isikhuemhen, O. S. and Mikiashvili, N. A. (2009). Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1353-1362.
228. Isikhuemhen, O. S., Mikiashvili, N. A. and Kelkar, V. (2009). Application of solid waste from anaerobic digestion of poultry litter in *Agrocybe aegerita* cultivation: Mushroom production, lignocellulolytic enzymes activity and substrate utilization. *Biodegradation*, 20, 351-361.
229. Islam, T., Yu, X. and Xu, B. (2016). Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 423-431.



230. Ismail, A. F., Moawed, F. S. and Mohamed, M. A. (2015). Protective mechanism of grape seed oil on carbon tetrachloride-induced brain damage in  $\gamma$ -irradiated rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, 317-323.
231. Israilides, C. J., Smith, A., Harthill, J. E., Barnett, C., Bambalov, G. and Scanlon, B. (1998). Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(5), 613-617.
232. Israilides, C., Scanlon, B., Smith, A., Harding, S. E. and Jumel, K. (1994). Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 25(3), 203-209.
233. Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M. N., Ludquist, K. and Taherzadeh, M. J. (2011). Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources*, 6(4), 5224-5259.
234. Jarzynska, G. and Falandysz J. (2011). Selenium and 17 other largely essential and toxic metals in muscle and organ meats of Red Deer (*Cervus elaphus*)—consequences to human health. *Environment International*, 37(5), 882–888.
235. Jasinghe, V.J. and Perera, C.O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D<sub>2</sub> by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92, 541–546.
236. Jeffries, T. W., Choi, S. and Kirk, T. K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 290-296.
237. Ji, H., Wang, Q., Wang, H., Chen, W., Zhu, C., Hou, H. and Zhang, Z. (2001) A fundamental research of mushroom cultivation using maize straw. *Edible Fungi China*, 20(6),10–17.
238. Jiang, T.D. (2001). Lignin. Beijing: Chemical Industry Press.
239. Jing, D. (2010). Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. *Bioresource Technology*, 101(19), 7592-7597.
240. Jong-Wonyon, J. W. C., Lee, Y. S. and Song, C. H. (2001). A preliminary study on the hypoglycemic effect of the exo-polymers produced by five different medicinal mushrooms. *Journal of Microbial Biotechnology*, 11(1), 167-171.
241. José, A., Romero, I., Jiménez, J. and Castro, E. (2012). Fired clay masonry units production incorporating two-phase olive mill waste (alperujo). *Ceramics International*, 38(6), 5027-5037.
242. Jurado, F., Cano, A. and Carpio, J. (2003). Modelling of combined cycle power plants using biomass. *Renewable Energy*, 28(5), 743-753.
243. Kaal, E. E., de Jong, E. D. and Field, J. A. (1993). Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4031-4036.
244. Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N. and Elisashvili, V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 391-397.
245. Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N. and Elisashvili, V. (2005). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 391-397.
246. Kalac, P. and Svoboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69, 273–281.
247. Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V. and Schmidt, H., (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187,1–17.
248. Kalmis, E., Azbar, N., Yildiz, H. and Kalyoncu, F. (2008). Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresource Technology*, 99, 164–169.
249. Kalogeropoulos, N., Yanni, A.E., Koutrotsios, G. and Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesvos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378–385.
250. Kamali, M. and Khodaparast, Z. (2015). Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 326-342.
251. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. and Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4360-4367.

252. Kamra, A. N. I. T. A. and Bhatt, A. B. (2013). First attempt of an organic cultivation of red *Ganoderma lucidum* under subtropical habitat and its economics. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 94-98.
253. Karpouzas, D. G., Ntougias, S., Iskidou, E., Rousidou, C., Papadopoulou, K. K., Zervakis, G. I. and Ehaliotis, C. (2010). Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 101-111.
254. Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V. and Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982.
255. Keon, J. P. and Waksman, G. (1990). Common amino acid domain among endopolygalacturonases of ascomycete fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2522-2528.
256. Kerrigan, R.W. (1995) Global genetic resources for *Agaricus* breeding and cultivation. *Canadian Journal of Botany*, 73, S973–S979.
257. Kersten, P. and Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(2), 77-87.
258. Khan, M. A., Khan, L. A., Hossain, M. S., Tania, M. and Uddin, M. N. (2009). Investigation on the nutritional composition of the common edible and medicinal mushrooms cultivated in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Mushroom*, 3(1), 21-28.
259. Khoufi, S., Hamza, M. and Sayadi, S. (2011). Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresource Technology*, 102(19), 9050-9058.
260. Khoufi, S., Louhichi, A. and Sayadi, S. (2015). Optimization of anaerobic co-digestion of olive mill wastewater and liquid poultry manure in batch condition and semi-continuous jet-loop reactor. *Bioresource Technology*, 182, 67-74.
261. Kimura, Y., Asada, Y., Oka, T. and Kuwahara, M. (1991). Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(4), 510-514.
262. Kirbag, S. and Akyuz, M. (2008). Effect of various agro-residues on growing periods, yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 6, 402-405.
263. Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. and Stalpers, J. A. (2008). Dictionary of the Fungi. (10<sup>th</sup> ed). Wallingford, UK.
264. Kirk, T. K. (2018). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications: Volume I. CRC press.
265. Kirk, T. K. and Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. Wiley, New York, 273-307.
266. Kirk, T. K. and Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 465-501.
267. Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P. and Sannia, G. (2001). Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 221-226.
268. Kliewer, W. M. (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(2), 96-103.
269. Ko, E. M., Leem, Y. E. and Choi, H. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 98-102.
270. Konuk, M., Afyon, A. and Yagiz, D. (2007). Minor element and heavy metal contents of wild growing and edible mushrooms from western Black Sea region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(11A), 1359.
271. Kord, B., Mataji, A. and Babaie, S. (2010). Pine (*Pinus Eldarica* Medw.) needles as indicator for heavy metals pollution. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7(1), 79-84.
272. Krokida, M.K., Maroulis, Z.B. and Kremalis, C. (2002). Process design of rotatory dryers for olive cake. *Drying Technology*, 20 (4), 771–787.

273. Kurt, S. and Buyukalaca, S. (2010). Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 101, 3164–3169.
274. Laconi, S., Molle, G., Cabiddu, A. and Pompei, R. (2007). Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass. *Biodegradation*, 18(5), 559-566.
275. Largeveau, M.L., Callac, P., Navarro-Rodriguez, A.M. and Savoie, J.M. (2011). Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 °C). *Fungal Biology*, 115, 1186–1195.
276. Lau, D. W. and King, A. J. (2003). Pre-and post-mortem use of grape seed extract in dark poultry meat to inhibit development of thiobarbituric acid reactive substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1602-1607.
277. Laufenberg, G., Kunz, B. and Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept;(B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87(2), 167-198.
278. Lechner, B.E. and Albertó, E. (2011). Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28, 148–154.
279. Lee, C. Y., Park, J. E., Kim, B. B., Kim, S. M. and Ro, H. S. (2009). Determination of mineral components in the cultivation substrates of edible mushrooms and their uptake into fruiting bodies. *Mycobiology*, 37(2), 109-113.
280. Lee, J. W., Gwak, K. S., Park, J. Y., Park, M. J., Choi, D. H., Kwon, M. and Choi, I. G. (2007). Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *The Journal of Microbiology*, 45(6), 485-491.
281. Lees, N. D., Skaggs, B., Kirsch, D. R. and Bard, M. (1995). Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* - A review. *Lipids*, 30(3), 221-226.
282. Lehndorff, E. and Schwark, L. (2008). Accumulation histories of major and trace elements on pine needles in the Cologne Conurbation as function of air quality. *Atmospheric Environment*, 42(5), 833-845.
283. Leifa, F., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2000). Production of mushrooms on Brazilian coffee industry residues. In *Coffee Biotechnology and Quality* (pp. 427-436). Springer, Dordrecht.
284. Levin, L., Forchiassin, F. and Ramos, A. M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, 94(3), 377-383.
285. Li, S., Dong, C., Wen, H. and Liu, X. (2016). Development of Ling-zhi industry in China – emanated from the artificial cultivation in the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (IMCAS). *Mycology*, 7, 74–80.
286. Li, X., Chen, Z., Chen, Z. and Zhang, Y. (2013). A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China. *Chemosphere*, 93, 1240–1246.
287. Li, X., Pang, Y. and Zhang, R. (2001). Compositional changes of cottonseed hull substrate during *P. ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. *Bioresource Technology*, 80, 157–161.
288. Li, Y. S. and Liu, C. C. (2004). Adsorption of Cr (III) from wastewater by wine processing waste sludge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(1), 95-101.
289. Liang, T., Zhang, S., Wang, L., Kung, H.-T., Wang, Y., Hu, A. and Ding, S. 2005. Environmental biogeochemical behaviors of rare earth elements in soil–plant systems. *Environmental Geochemistry and Health*. 27, 301-311.
290. Liang, Y., Guo, L.X. and Sun, H. (2014). In vivo antitumor activity of the active protein components from *Agrocybe aegerita* on tumor-bearing mouse model. *Modern Food Science and Technology*, 30, 1-5.
291. Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K. T., Hatakka, A. and Hofrichter, M. (2006). Mineralization of 14 C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5), 573-579.
292. Liland, K. H. and Mevik, B. H. (2015). baseline: Baseline correction of spectra. R package version 1.2-1.

293. Lin, S. Y., Chien, S. C., Wang, S. Y. and Mau, J. L. (2016). Nonvolatile taste components and antioxidant properties of fruiting body and mycelium with high ergothioneine content from the culinary-medicinal golden oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(8).
294. Ling, Z. X., Chen, A. F and Lin, Z. B. (1997). *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 219-226.
295. Llarena-Hernández, R.C., Largeteau, M.L., Farnet, A.M., Foulongne-Oriol, M., Ferrer, N., Regnault-Roger and C., Savoie, J.M. (2013). Potential of European wild strains of *Agaricus subrufescens* for productivity and quality on wheat straw based compost. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1243–1253.
296. Lo, Y. C., Chien, S. C., Mishchuk, D. O., Slusky, C. M. and Mau, J. L. (2016). Quantification of water-soluble metabolites in medicinal mushrooms using proton NMR spectroscopy. *International journal of Medicinal Mushrooms*, 18(5).
297. Lopez, M. J., Elorrieta, M. A., Vargas-Garcia, M. C., Suarez-Estrella, F. and Moreno, J. (2002). The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 81(2), 123-129.
298. Lopez, M. J., Moreno, J. and Ramos-Cormenzana, A. (2001). *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Water Research*, 35(7), 1828-1830.
299. López-Cano, I., Roig, A., Cayuela, M. L., Albuquerque, J. A. and Sánchez-Monedero, M. A. (2016). Biochar improves N cycling during composting of olive mill wastes and sheep manure. *Waste Management*, 49, 553-559.
300. López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Nunes, J. R., Peña, D. and Cabrera, D. (2011). Long-term impacts of de-oiled two-phase olive mill waste on soil chemical properties, enzyme activities and productivity in an olive grove. *Soil and Tillage Research*, 114(2), 175-182.
301. Ma, Y., He, H., Wu, J., Wang, C., Chao, K. and Huang, Q. (2018). Assessment of polysaccharides from mycelia of genus *Ganoderma* by mid-infrared and near-infrared spectroscopy. *Scientific Reports*, 8(1), 10.
302. Malavazi, I., Goldman, G. H. and Brown, N. A. (2014). The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. *Briefings in Functional Genomics*, 13, 456–470.
303. Manios, T. (2004). The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete. *Environment International*, 29(8), 1079-1089.
304. Mansur, M., Suárez, T. and González, A. E. (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 771-774.
305. Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A. and Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84, 201–206.
306. MAPA (2012). Anuario de estadística de 2002. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain.
307. Maragkaki, A. E., Vasileiadis, I., Fountoulakis, M., Kyriakou, A., Lasaridi, K. and Manios, T. (2018). Improving biogas production from anaerobic co-digestion of sewage sludge with a thermal dried mixture of food waste, cheese whey and olive mill wastewater. *Waste Management*, 71, 644-651.
308. Marques de Souza, C. G. and Peralta, R. M. (2003). Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 43(4), 278-286.
309. Marques, I. P. (2001). Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent reuse in irrigation. *Desalination*, 137(1-3), 233-239.
310. Márquez-Araque, A. T., Mendoza Martínez, G. D., González Muñoz, S. S., Buntinx Dios, S. E. and Loera Corral, O. (2007). Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96. 4 en fermentación sólida. *Interciencia*, 32(11), 780-785.

311. Martín, C., López, Y., Plasencia, Y. and Hernández, E. (2006). Characterisation of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 20(4), 443-447.
312. Martín, J., Sampedro, I., García-Romera, I., García-Garrido, J. M. and Ocampo, J. A. (2002). Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1769-1775.
313. Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C. P., ... and Hammel, K. E. (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1954-1959.
314. Masghouni, M. and Hassairi, M. (2000). Energy applications of olive-oil industry by-products:— I. The exhaust foot cake. *Biomass and Bioenergy*, 18(3), 257-262.
315. Matos, A. J. F. S., Bezerra, R. M. F. and Dias, A. A. (2007). Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 270-275.
316. Mattila, P., Könkö, K., Euroola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M. and Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2343–2348.
317. Mau, J. L. and Tseng, Y. H. (1998). Non-volatile taste components of three strains of *Agrocybe cylindracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2071–2074 .
318. McMillan, J.D. (2011). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel ME, Baker J.O.
319. Mendonça, R. T., Jara, J. F., González, V., Elissetche, J. P. and Freer, J. (2008). Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1323.
320. Menon, V. and Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550.
321. Mikan, V.J.F. and Castellanos, S.D.E. (2004). Screening for isolation and characterisation of microorganisms and enzymes with useful potential for degradation of cellulose and hemicellulose. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6, 58–67.
322. Mikiashvili, N., Wasser, S., Nevo, E. and Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 999–1002.
323. Millanes, A. M., Diederich, P., Ekman, S. and Wedin, M. (2011). Phylogeny and character evolution in the jelly fungi (Tremellomycetes, Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(1), 12-28.
324. Min, K. L., Kim, Y. H., Kim, Y. W., Jung, H. S. and Hah, Y. C. (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392(2), 279-286.
325. Paliwal, R., Rawat, A. P., Rawat, M. and Rai, J. P. N. (2012). Bioligninolysis: recent updates for biotechnological solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(7), 1865-1889.
326. Minussi, R. C., Pastore, G. M. and Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 13(6-7), 205-216.
327. Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M. and Durán, N. (2007). Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(3-4), 102-107.
328. Mishra, K. K., Pal, R. S., Arunkumar, R., Chandrashekara, C., Jain, S. K. and Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food Chemistry*, 138, 1557–1563.
329. Mistry, H. D., Pipkin, F. B., Redman, C. W. and Poston, L. (2012). Selenium in reproductive health. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(1), 21-30.
330. Mleczek M., Rzymiski P., Budka A., Siwulski M., Jasińska A., Kalač P., Poniedziałek B., Gąsecka M. and Niedzielski, P. (2018). Elemental characteristics of mushroom species cultivated in China and Poland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 168-178 .

331. Mleczek, M., Niedzielski, P., Kalač, P., Siwulski, M., Rzymiski, P. and Gąsecka, M. (2016). Levels of platinum group elements and rare-earth elements in wild mushroom species growing in Poland. *Food Additives and Contaminants: Part A.*, 33, 86-94.
332. Modi, H. A., Shah, P., Shukla, M. D. and Lahiri, S. K. (2014). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* collected from dang district of Gujarat, India. *Natural products: An Indian Journal*, 10(3), 75-83.
333. Moldes, D., Gallego, P. P., Couto, S. R. and Sanromán, A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 25(6), 491-495.
334. Montané, D., Salvado, J., Torras, C. and Farriol, X. (2002). High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass and Bioenergy*, 22(4), 295-304.
335. Moredo, N., Lorenzo, M., Domínguez, A., Moldes, D., Cameselle, C. and Sanroman, A. (2003). Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(7), 665-669.
336. Moreno, E., Perez, J., Ramos-Cormenzana, A. and Martinez, J. (1987). Antimicrobial effect of wastewaters from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios*, 51, 169-174.
337. Morillo, J. A., Aguilera, M., Antizar-Ladislao, B., Fuentes, S., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N. J. and Monteoliva-Sánchez, M. (2008). Molecular microbial and chemical investigation of the bioremediation of two-phase olive mill waste using laboratory-scale bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 309-317.
338. Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A. and Russell, N. J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 25.
339. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673-686.
340. Müller, H. W. and Trösch, W. (1986). Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 180-185.
341. Mumtaz, T., Yahaya, N. A., Abd-Aziz, S., Yee, P. L., Shirai, Y. and Hassan, M. A. (2010). Turning waste to wealth-biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent—a Malaysian perspective. *Journal of Cleaner Production*, 18(14), 1393-1402.
342. Muñoz, P., Morales, M. P., Mendivil, M. A., Juárez, M. C. and Muñoz, L. (2014). Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building construction. *Construction and Building Materials*, 71, 181-187.
343. Muthu, N. and Shanmugasundaram, K. (2016). Proximate and mineral compositions of edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1), 116.
344. Nakagawa, H. (2003). Producing biomethanol and reducing CO<sub>2</sub> emissions from straw and husk by-products of rice. In *Rice science: innovations and impact for livelihood. Proceedings of the International Rice Research Conference, Beijing, China, 16-19 September 2002* (pp. 759-767). International Rice Research Institute (IRRI).
345. Nasini, L., De Luca, G., Ricci, A., Ortolani, F., Caselli, A., Massaccesi, L., ... and Proietti, P. (2016). Gas emissions during olive mill waste composting under static pile conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 107, 70-76.
346. nee'Nigam, P. S., Gupta, N. and Anthwal, A. (2009). Pre-treatment of agro-industrial residues. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 13-33). Springer, Dordrecht.
347. Negro, C., Tommasi, L. and Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41-44.
348. Negro, M. J. and Solano, M. L. (1996). Laboratory composting assays of the solid residue resulting from the flocculation of oil mill wastewater with different lignocellulosic residues. *Compost Science and Utilization*, 4(4), 62-71.
349. Ngai, P. H. K., Zhao, Z. and Ng, T. B. (2005) Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26: 191-196.

350. Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., ... and Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241-248.
351. Nguyen, T. A., Fu, C. C. and Juang, R. S. (2016). Effective removal of sulfur dyes from water by biosorption and subsequent immobilized laccase degradation on crosslinked chitosan beads. *Chemical Engineering Journal*, 304, 313-324.
352. Nhi, N. N. Y. and Hung, P. V. (2012). Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam. *International Food Research Journal*, 19(2), 611-615.
353. Niedzielski, P., Mleczek, M., Budka, A., Rzymiski, P., Siwulski, M., Jasińska, A., Gasecka, M. and Budzyńska, S, A. (2017). Screening study of elemental composition in 12 marketable mushroom species accessible in Poland. *European Food Research and Technology* 243(10): 1759-1771.
354. Nikkarinen, M. and Mertanen, E. (2004). Impact of geological origin on trace element composition of edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(3-4), 301-310.
355. Ntaikou, I., Kourmentza, C., Koutrouli, E. C., Stamatelatou, K., Zampraka, A., Kornaros, M. and Lyberatos, G. (2009). Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production. *Bioresource Technology*, 100(15), 3724-3730.
356. Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautová, V. and Zervakis, G. I. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere*, 88(5), 620-626.
357. Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Merhautová, V. and Zervakis, G. I. (2015). Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi—Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresource Technology*, 189, 121-130.
358. Ntougias, S., Bourtzis, K. and Tsiamis, G. (2013). The microbiology of olive mill wastes. BioMed Research International, 2013.
359. Ntougias, S., Gaitis, F., Katsaris, P., Skoulika, S., Iliopoulos, N. and Zervakis, G.I. (2013). The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties - Evaluation of *Pleurotus* strains as bioindicators of the effluent's toxicity. *Chemosphere*, 92, 399-405.
360. Nunes, C. S. and Kunamneni, A. (2018). Laccases—properties and applications. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 133-161).
361. Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. and Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.
362. Obodai, M., Kine, J. C. O. and Vowotor, K. A. (2003). Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 146-149.
363. Ochando-Pulido, J. M., Rodriguez-Vives, S., Hodaifa, G. and Martinez-Ferez, A. (2012). Impacts of operating conditions on reverse osmosis performance of pretreated olive mill wastewater. *Water Research*, 46(15), 4621-4632.
364. Oğuzhan, P. and Yangilar, F. (2013). Pullulan: Production and usage in food industry. *African Journal of Food Science and Technology*, 4(3), 57-63.
365. Okamoto, K., Narayama, S., Katsuo, A., Shigematsu, I. and Yanase, H. (2002). Biosynthesis of p-anisaldehyde by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 207-210.
366. Oliveira, R. N., Mancini, M. C., Oliveira, F. C. S. D., Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. D. S. M. and McGuinness, G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria* (Rio de Janeiro), 21(3), 767-779.
367. Olivieri, G., Marzocchella, A., Salatino, P., Giardina, P., Cennamo, G. and Sannia, G. (2006). Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Engineering Journal*, 31(3), 180-187.
368. Ordóñez, R., González, P., Giráldez, J. V. and García-Ortiz, A. (1999). Efecto de la enmienda con alperujo sobre los principales nutrientes de un suelo agrícola. Estudios de la zona no saturada. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter and C. Tascón (eds.) ICIA, 123-126.

369. Otjen, L., Blanchette, R., Effland, M. and Leatham, G. (1987). Assessment of 30 white rot basidiomycetes for selective lignin degradation. *Holzforschung*, 41 (6), 343-349.
370. Overend, R.P. editors. Enzymatic conversion of biomass for fuels. Washington D.C.: American Chemical Society, 1994. p. 292–324.
371. Pagnanelli, F., Toro, L. and Vegliò, F. (2002). Olive mill solid residues as heavy metal sorbent material: a preliminary study. *Waste Management*, 22(8), 901-907.
372. Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., Guillamón, E. and Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128, 674–678.
373. Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. and Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920-924.
374. Pandey, K. K. and Pitman, A. J. (2003). FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(3), 151-160.
375. Pantano, D., Luccarini, I., Nardiello, P., Servili, M., Stefani, M. and Casamenti, F. (2017). Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill waste water ameliorate cognitive deficits and neuropathology. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 54-62.
376. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 99(7), 2419-2428.
377. Papaspyridi, L.-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E. and Christakopoulos, P. (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal*, 50, 131–138.
378. Paredes, M. J., Moreno, E., Ramos-Cormenzana, A. and Martinez, J. (1987). Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, 16(7), 1557-1564.
379. Park, Y., Kang, S., Lee, J., Hong, S. L. and Kim, S. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(6), 761-766.
380. Patel, H., Gupte, A. and Gupte, S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*, 4(1), 268-284.
381. Peksen, A. and Yakupoglu, G. (2009). Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 611-618.
382. Perez, J., De La Rubia, T., Hamman, O. B. and Martinez, J. (1998). *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2726-2729.
383. Pérez-Magariño, S. and González-San José, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96(2), 197-208.
384. Périé, F. H. and Gold, M. H. (1991). Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2240-2245.
385. Philip, T. and Kuykendall, J. R. (1973). Changes in titratable acidity, Brix, pH, potassium content, malate and tartrate during berry development of Thompson seedless grapes. *Journal of Food Science*, 38(5), 874-876.
386. Philippoussis, A. N. (2009). Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 163-196). Springer, Dordrecht.
387. Philippoussis, A., Zervakis, G. I. and Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 191–200.
388. Philippoussis, A., Zervakis, G.I., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K. and Ehaliotis, C. (2004). Use of spent mushroom compost as substrate for plant growth and against plant infections



- caused by *Phytophthora* spp. In Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi, pp. 579-584 (eds. Romaine, Keil, Rinker and Roysel). Penn State University, USA.
389. Philippoussis, A.N., Diamantopoulou, P.A. and Zervakis, G.I. (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*, 19,551–557.
390. Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Horst, R.L., Minor, B., Simon, B.R., Feeney, M.J., Byrdwell, W.C. and Haytowitz, D.B. (2011). Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59,7841–7853.
391. Piperidou, C. I., Chaidou, C. I., Stalikas, C. D., Soulti, K., Pilidis, G. A. and Balis, C. (2000). Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1941-1948.
392. Plácido, J. and Capareda, S. (2015). Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 23.
393. Podgornik, H., Stegu, M., Zibert, E. and Perdih, A. (2001). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* - an artefact caused by Mn (III)? *Letters in Applied Microbiology*, 32(6), 407-411.
394. Polyakov, K. M., Fedorova, T. V., Stepanova, E. V., Cherkashin, E. A., Kurzeev, S. A., Strokopytov, B. V., ... and Koroleva, O. V. (2009). Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 65(6), 611-617.
395. Portal Agrario. Cultivos de Importancia Nacional, (2005) ([www.minag.gob.pe/agricola/azucar\\_produccion.shtml](http://www.minag.gob.pe/agricola/azucar_produccion.shtml)), ([www.minag.gob.pe/agricola/maiz\\_produccion.shtml](http://www.minag.gob.pe/agricola/maiz_produccion.shtml)), ([www.portalagrario.gob.pe/agricola/arroz\\_produccion.shtm](http://www.portalagrario.gob.pe/agricola/arroz_produccion.shtm)).
396. Poutanen, K. and Puls, J. (1988). Characteristics of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(4-5), 425-432.
397. Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H. C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1), 1-39.
398. Prieur, B., Meub, M., Wittemann, M., Klein, R., Bellayer, S., Fontaine, G. and Bourbigot, S. (2017). Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. *RSC Advances*, 7(27), 16866-16877.
399. Quintero, D.J.C., Gumersindo, F.E.J.O.O.C. and Lemar, R.J.M. (2006) Production of ligninolytic enzymes from basidiomycete fungi on lignocellulosic materials. *Rev Facult Quim Farmaceut* 2006, 13, 61–7.
400. Rabinovich, M.L., Melnik, M.S. and Bolobova, A.V. (2002b) The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry-Moscow*, 68, 850–71.
401. Rahmanian, N., Jafari, S. M. and Galanakis, C. M. (2014). Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(1), 1-18.
402. Ramos, S. J., Dinali, G. S., Oliveira, C., Martins, G. C., Moreira, C. G., Siqueira, J. O. and Guilherme, L. R. (2016). Rare earth elements in the soil environment. *Current Pollution Reports*, 2(1), 28-50.
403. Rani, P., Kalyani and N., Prathiba, K. (2008). Evaluation of lignocellulosic waste for production of edible mushroom. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 151–59.
404. Rani, P., Lal, M. R., Maheshwari, U. and Krishnan, S. (2015). Antioxidant potential of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) cultivated on *Artocarpus heterophyllus* sawdust substrate in India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(12), 1171-7.
405. Rayman M. P., "Selenium and human health," *The Lancet*, vol. 379, no. 9822, pp. 1256–1268, 2012.
406. Reis, F. S., Barros, L., Martins, A. and Ferreira, I. C. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 191-197.
407. Reverberi, M., Di Mario, F. and Tomati, U. (2004)  $\beta$ -glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 217–225.

408. Řezáčová, V., Hršelová, H., Gryndlerová, H., Mikšík, I. and Gryndler, M. (2006). Modifications of degradation-resistant soil organic matter by soil saprobic microfungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(8), 2292-2299.
409. Richard, T., Trautmann, N., Krasny, M., Fredenburg, S. and Stuart, C. (1996). The science and engineering of composting. *Cornell Waste Management Institute*.
410. Ride, J. P. and Drysdale, R. B. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology*, 2, 7-15
411. Rinaldi, M., Rana, G. and Introna, M. (2003). Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crops Research*, 84(3), 319-326.
412. Rivela, I., Couto, S. R. and Sanromán, A. (2000). Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor. *Biotechnology Letters*, 22(18), 1443-1447.
413. Rizki, M. and Tamai, Y. (2011). Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1695–1702.
414. Rizzi, A., Zucchi, M., Borin, S., Marzorati, M., Sorlini, C. and Daffonchio, D. (2006). Response of methanogen populations to organic load increase during anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(9), 1556-1562.
415. Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. del M. and D. J. Royse. (2009). Improvement of yield of *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* by substrate supplementation and use of a casing overlay. *Bioresource Technology*, 100, 5270–5276.
416. Rodríguez, A., Falcon, M. A., Carnicero, A., Perestelo, F., De la Fuente, G., and Trojanowski, J. (1996). Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3), 399-403.
417. Roig, A., Cayuela, M. L. and Sánchez-Monedero, M. A. (2004). The use of elemental sulphur as organic alternative to control pH during composting of olive mill wastes. *Chemosphere*, 57(9), 1099-1105.
418. Romero, C., Medina, E., Mateo, M. A. and Brenes, M. (2018). New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 225–230.
419. Romero, E., Speranza, M., García-Guinea, J., Martínez, Á. T. and Martínez, M. J. (2007). An anamorph of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* capable of colonizing and degrading compact disc components. *FEMS Microbiology Letters*, 275(1), 122-129.
420. Royse, D. J. (2014, November). A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* and *Flammulina*. In *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)* (Vol. 1, pp. 1-6).
421. Ruiz-Deñás, F. J. and Martínez, Á. T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 164-177.
422. Ruiz-Rodríguez, A., Soler-Rivas, C., Polonia, I. and Wichers, H. J. (2010). Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64, 638–645.
423. Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P. and Mäkelä, M. R. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(4), 614-649.
424. Rzymiski, P., Mleczeck, M., Siwulski, M., Jasińska, A., Budka, A., Niedzielski, P., Kalač, P., Gąsecka, M. and Budzyńska, S. (2017). Multielemental analysis of fruit bodies of three cultivated commercial *Agaricus* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 170-178.
425. Saadi, I., Laor, Y., Raviv, M. and Medina, S. (2007). Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere*, 66(1), 75-83.
426. Sack, U., Hofrichter, M. and Fritsche, W. (1997). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 227-234.
427. SAGPyA-FAO (Yalungo Y). Dirección de Economía Agraria. (2004) (<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/granos/cebada.php>).

- 428.SAGPyA-mecom. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Pesca y Alimentos. Dirección de mercados agroalimentarios, Sorgo. (2005) ([http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/diario/djve\\_anterior.php](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/diario/djve_anterior.php)).
- 429.Saini, J. K., Saini, R. and Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotechnology*, 5(4), 337-353.
- 430.Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., Domínguez, J. M. and Belo, I. (2014). Screening of winery and olive mill wastes for lignocellulolytic enzyme production from *Aspergillus* species by solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(3), 201-209.
- 431.Salmones, D., Mata, G. and Waliszewski, K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: Biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, 96, 537–544.
- 432.Salvachúa, D., Martínez, A. T., Tien, M., López-Lucendo, M. F., García, F., de los Ríos, V., ... and Prieto, A. (2013). Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 115.
- 433.Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J. A., Stazi, S. R. and García-Romera, I. (2005). Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere*, 60(10), 1393-1400.
- 434.Sampedro, I., Marinari, S., D'Annibale, A., Grego, S., Ocampo, J. A. and García-Romera, I. (2007). Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60(2), 116-125.
- 435.Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J.A., Brenes, M. and García-Romera, I., (2004). Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4487–4492.
- 436.Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-García, M. J. and Esqueda, M. (2002). Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2537-2542.
- 437.Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194.
- 438.Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1321-1337.
- 439.Santos, F. T., Goufo, P., Santos, C., Botelho, D., Fonseca, J., Queirós, A., ... and Trindade, H. (2016). Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media for lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C. *Food Chemistry*, 209, 293-301.
- 440.Sapozhnikova, Y., Byrdwell, W.C., Lobato, A. and Romig, B. (2014). Effects of UV-B radiation levels on concentrations of phytosterols, ergothioneine, and polyphenolic compounds in mushroom powders used as dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3034–3042.
- 441.Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Biasci, A. and Riffaldi, R. (2001). Suitability of moist olive pomace as soil amendment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128(1-2), 13-22.
- 442.Savitzky, A. and Golay, M. J. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627-1639.
- 443.Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S–217S.
- 444.Scotti, C. T., Vergoignan, C., Feron, G. and Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 1-5.
- 445.Serafin Muñoz, A. H., Kubachka, K., Wrobel, K., Gutierrez Corona, J. F., Yathavakilla, S. K., Caruso, J. A. and Wrobel, K. (2006). Se-enriched mycelia of *Pleurotus ostreatus*: distribution of selenium in cell walls and cell membranes/cytosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3440-3444.
- 446.Shah, V., Dobiášová, P., Baldrian, P., Nerud, F., Kumar, A. and Seal, S. (2010). Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3), 1141-1145.
- 447.Shamaki, B. U., Sandabe, U. K., Fanna, I. A., Adamu, O. O., Geidam, Y. A., Umar, I. I. and Adamu, M. S. (2012). Proximate composition, phytochemical and elemental analysis of some organic

- solvent extract of the wild mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Sciences Research*, 2(4), 24-35.
448. Sharma, R. K. and Arora, D. S. (2010). Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresource Technology*, 101(23), 9248-9253.
449. Sharma, R. K. and Arora, D. S. (2015). Fungal degradation of lignocellulosic residues: an aspect of improved nutritive quality. *Critical reviews in microbiology*, 41(1), 52-60.
450. Shary, S., Ralph, S. A. and Hammel, K. E. (2007). New insights into the ligninolytic capability of a wood decay ascomycete. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6691-6694.
451. Shi, J., Chinn, M. S. and Sharma-Shivappa, R. R. (2008). Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 99(14), 6556-6564.
452. Shinagawa, F. B., Santana, F. C. D., Torres, L. R. O. and Mancini-Filho, J. (2015). Grape seed oil: a potential functional food?. *Food Science and Technology*, 35(3), 399-406.
453. Shon, Y.H. and Nam, K.S. (2001). Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 103-109.
454. Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 33(6), 469-474.
455. Siciliano, A., Stillitano, M. A. and De Rosa, S. (2016). Biogas production from wet olive mill wastes pretreated with hydrogen peroxide in alkaline conditions. *Renewable Energy*, 85, 903-916.
456. Sills, D. L. and Gossett, J. M. (2012). Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. *Biotechnology and bioengineering*, 109(2), 353-362.
457. Singh, A. and Sharma, S. (2002). Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresource Technology*, 85, 107-111.
458. Singh, G., Kaur, K., Puri, S. and Sharma, P. (2015). Critical factors affecting laccase-mediated biobleaching of pulp in paper industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 155-164.
459. Singhal, A. and Thakur, I. S. (2009). Decolourization and detoxification of pulp and paper mill effluent by *Emericella nidulans* var. *nidulans*. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 619-625.
460. Singhal, V. and Rathore, V. S. (2001). Effects of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 235-240.
461. Siracusa, G., La Rosa, A. D., Siracusa, V. and Trovato, M. (2001). Eco-compatible use of olive husk as filler in thermoplastic composites. *Journal of Polymers and the Environment*, 9(4), 157-161.
462. Slomczynski, D., Nakas, J. and Tanenbaum, S. W. (1995). Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 907-912.
463. Smidt, E., Eckhardt, K. U., Lechner, P., Schulten, H. R. and Leinweber, P. (2005). Characterization of different decomposition stages of biowaste using FT-IR spectroscopy and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Biodegradation*, 16(1), 67-79.
464. Smirnov, S. A., Koroleva, O. V., GavriloVA, V. P., Belova, A. B. and Klyachko, N. L. (2001). Laccases from basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochemistry (Moscow)*, 66(7), 774-779.
465. Smits, G. J., Van der Ende, H. and Klis, F. M. (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147, 781-794.
466. Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E. and Vukojević, J. (2006a). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 65-73.
467. Stajić, M., Persky, L., Hadar, Y., Friesem, D., Duletić-Laušević, S., Wasser, S. P. and Nevo, E. (2006b). Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128(1), 87-96.
468. Steffen, K. T., Cajthaml, T., Šnajdr, J. and Baldrian, P. (2007). Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. *Research in Microbiology*, 158(5), 447-455.

469. Stevens, A. and Ramirez-Lopez, L. (2013) An introduction to the prospectr package. R package Vignette.
470. Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
471. Svoboda, L., Zimmermannová, K. and Kalač, P. (2000). Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *Science of the Total Environment*, 246(1), 61-67.
472. Snytytsya, A., Míčková, K., Snytytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., ... and Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548-556.
473. Taccari, M., Stringini, M., Comitini, F. and Ciani, M. (2009). Effect of *Phanerochaete chrysosporium* inoculation during maturation of co-composted agricultural wastes mixed with olive mill wastewater. *Waste Management*, 29(5), 1615-1621.
474. Taniguchi, M., Takahashi, D., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Kouya, T. and Tanaka, T. (2010). Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(4), 449-452.
475. Taylor, B. R., Parkinson, D. and Parsons, W. F. (1989). Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology*, 70(1), 97-104.
476. Teichmann, A., Dutta, P.C., Staffas, A. and Jägerstad, M. (2007). Sterol and vitamin D<sub>2</sub> concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: effects of UV irradiation. *LWT Food Science and Technology*, 40, 815–822.
477. Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A. and Garcia-Viguera C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Science*, 15, 15638–15678.
478. Tekin, A. R. and Dalgıç, A. C. (2000). Biogas production from olive pomace. *Resources, Conservation and Recycling*, 30(4), 301-313.
479. Temp, U., Eggert, C. and Eriksson, K. E. L. (1998). A small-scale method for screening of lignin-degrading microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1548-1549.
480. Terashita, T., Murao, R., Yoshikawa, K. and Shishiyama, J. (1998). Changes in carbohydrase activities during vegetative growth and development of fruit-bodies of *Hypsizygus marmoreus* grown in sawdust-based culture. *Journal of Wood Science*, 44(3), 234.
481. Thompson, R. B. and Nogales, R. (1999). Nitrogen and carbon mineralization in soil of vermicomposted and unprocessed dry olive cake ("Orujo Seco") produced from two-stage centrifugation for olive oil extraction. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 34(5), 917-928.
482. Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19-26.
483. Tien, M. and Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221(4611), 661-663.
484. Tien, M. and Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(8), 2280-2284.
485. Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. (2011). Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(4), 531-540.
486. Tomati, U., Galli, E., Fiorelli, F. and Pasetti, L. (1996). Fertilizers from composting of olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 155-162.
487. Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L. and Volterra, E. (1995). Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste Management and Research*, 13(6), 509-518.
488. Tong, P., Hong, Y., Xiao, Y., Zhang, M., Tu, X. and Cui, T. (2007). High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. *Biotechnology Letters*, 29(2), 295-301.
489. Torres, J. L. and Bobet, R. (2001). New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. antioxidant aminoethylthio- flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4627-4634.
490. Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L. and Mau, J.-L. (2008). Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chemistry*, 107, 977–983.

491. Tsonis, S. P., Tsola, V. P. and Grigoropoulos, S. G. (1989). Systematic characterization and chemical treatment of olive oil mill wastewater. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 20(1), 437-457.
492. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M., (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72, 169–183.
493. Turano, E., Curcio, S., De Paola, M. G., Calabrò, V. and Iorio, G. (2002). An integrated centrifugation–ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 209(2), 519-531.
494. Turker, O., Kumanlioglu, K., Karapolat, I. and Dogan, I. (2006). Selenium treatment in autoimmune thyroiditis: 9-month follow-up with variable doses. *Journal of Endocrinology*, 190(1), 151-156.
495. Tyler, G. and Olsson, T. 2001. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant and Soil*, 230, 307-321.
496. Tyler, G. and Olsson, T. 2005. Rare earth elements in forest-floor herbs as related to soil conditions and mineral nutrition. *Biological Trace Element Research*, 106, 177-191.
497. Tyler, G. 2004. Rare earth elements in soil and plant systems-A review. *Plant and Soil*, 267, 191-206.
498. Uhart, M. and Albertó, E. (2007). Morphologic characterization of *Agrocybe cylindracea* (Basidiomycetes, Agaricales) from America, Europe and Asia. *Revista Mexicana de Micología*, 24, 9-18.
499. UN Foundation Report. Sustainable bioenergy development in UEMOA member countries by Kimble, M., Padeloup, M.V. and Spencer, C. (2008). Chapter 5. ([www.globalproblems-globalsolutions-files.org/gpgs\\_files/pdf/UNF\\_Bioenergy/UNF\\_Bioenergy\\_5.pdf](http://www.globalproblems-globalsolutions-files.org/gpgs_files/pdf/UNF_Bioenergy/UNF_Bioenergy_5.pdf)).
500. Valmaseda, M., Almendros, G. and Martinez, A. T. (1991). Chemical transformation of wheat straw constituents after solid-state fermentation with selected lignocellulose-degrading fungi. *Biomass and Bioenergy*, 1(5), 261-266.
501. Velázquez-Cedeño, M. A., Mata, G. and Savoie, J. M. (2002). Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 201-207.
502. Vetter, J. (1994). Mineral elements in the important cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Food Chemistry*, 50(3), 277-279.
503. Vieira, P. A. F., Gontijo, D. C., Vieira, B. C., Fontes, E. A., de Assunção, L. S., Leite, J. P. V., ... and Kasuya, M. C. M. (2013). Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 421-425.
504. Villaescusa, I., Fiol, N., Martínez, M., Miralles, N., Poch, J. and Serarols, J. (2004). Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water Research*, 38(4), 992-1002.
505. Villagran, F. and Renan, J. (1991). Simulación y modelo matemático de la designificación selectiva de la madera por hongos blancos en ambiente natural. Temuco Universidad de la Frontera.
506. Vitolo, S., Petarca, L. and Bresci, B. (1999). Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource Technology*, 67(2), 129-137.
507. Vlyssides, A. G., Loizides, M. and Karlis, P. K. (2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, 12(6), 603-611.
508. Vlyssides, A. G., Loizidou, M., Gimouhopoulos, K., and Zorpas, A. (1998). Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7(5), 308-313.
509. Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Adam, V. and Kopel, P. (2016). Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules*, 21(11), 1553.
510. Wagner, R., Mitchell, D. A., Lanzi Sasaki, G., Lopes de Almeida Amazonas, M. A. and Berovič, M. (2003). Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. *Food Technology and Biotechnology*, 41(4), 371-382.

511. Walker, D. J. and Bernal, M. P. (2008). The effects of olive mill waste compost and poultry manure on the availability and plant uptake of nutrients in a highly saline soil. *Bioresource Technology*, 99(2), 396-403.
512. Wang, D., Sakoda, A. and Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, 78, 293–300.
513. Wang, N., Shen, F., Tan, Q., Chen, M. and Pan, Y. (2000). Detecting in 9 extracellular enzyme activities of *Agrocybe aegerita* strains. *Mycosystema*, 19(4), 540-546.
514. Ward, M. and nee'Nigam, P. S. (2009). Anaerobic treatment of solid agro-industrial residues. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 417-430). Springer, Dordrecht.
515. Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1989). Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, 28(14), 6017-6023.
516. Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688-23695.
517. Wei, J.H. and Song, Y.R. (2001). Recent advances in study of lignin biosynthesis and manipulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 43(8), 771–9.
518. Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 174-209.
519. Wu, T. and Xu, B. Antidiabetic and antioxidant activities of eight medicinal mushroom species from China. (2015). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17, 129-140.
520. Xia, Z., Jiang, J., He, C., Liu, M. and Liu, D. (2003). Preliminary researches on high-yield cultivation techniques of *Ganoderma*. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 6, 56–58.
521. Xu, C., Ma, F. and Zhang, X. (2009). Lignocellulose degradation and enzyme production by *Irpex lacteus* CD2 during solid-state fermentation of corn stover. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(5), 372-375.
522. Xu, C., Ma, F., Zhang, X. and Chen, S. (2010). Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 58(20), 10893-10898.
523. Yamanaka, R., Soares, C. F., Matheus, D. R. and Machado, K. M. (2008). Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 78-84.
524. Yamin, S., Shuhaimi, M., Arbakariya, A., Fatimah, A.B., Khalilah, A.K., Anas, O. and Yazid, A. M., (2012), Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the growth of *Bifidobacterium* spp. as assessed using Real-time PCR. *International Food Research Journal*, 19, 1199-1205.
525. Yang SH. Plant fiber chemistry. Beijing: China Light Industry Press. 2008.
526. Yang, N. Liang, Y., Xiang, Y., Zhang, Y., Sun, H., Wang, D.C. (2005). Crystallization and preliminary crystallographic studies of an antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Protein and Peptide Letters*, 12, 705-707.
527. Yang, N., Li, D.F., Feng, L., Sun, H. and Wang, D.C. (2009). Structural basis for the tumor cell apoptosis-inducing activity of an antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Molecular Biology*, 387, 694-705.
528. Yang, X., Zeng, Y., Ma, F., Zhang, X. and Yu, H. (2010). Effect of biopretreatment on thermogravimetric and chemical characteristics of corn stover by different white-rot fungi. *Bioresource technology*, 101(14), 5475-5479.
529. Yang, Y., Wei, F., Zhuo, R., Fan, F., Liu, H., Zhang, C., ... and Zhang, X. (2013). Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One*, 8(11), e79307.
530. Yildiz, O., Can, Z., Laghari, A.Q., Şahin, H. and Malkoç, M. (2015). Wild edible mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 148–154.
531. Yin, Z.F. and Fan, R.W. (1999). The research progress of plant cell wall. *Bulletin of Botanical Research*, 19(4), 407–414.
532. Yoon, J. J., Cha, C. J., Kim, Y. S., Son, D. W. and Kim, Y. K. (2007). The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5), 800-805.

533. Yoshida, H. (1883). LXIII.—chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. *Journal of the Chemical Society Transactions*, 43, 472-486.
534. Yousuf, A., Sannino, F., Addorisio, V. and Pirozzi, D. (2010). Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8630-8635.
535. Yu, H., Du, W., Zhang, J., Ma, F., Zhang, X. and Zhong, W. (2010a). Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan. *Bioresource Technology*, 101(17), 6728-6734.
536. Yu, H., Guo, G., Zhang, X., Yan, K. and Xu, C. (2009). The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. *Bioresource Technology*, 100(21), 5170-5175.
537. Yu, H., Zhang, X., Song, L., Ke, J., Xu, C., Du, W. and Zhang, J. (2010b). Evaluation of white-rot fungi-assisted alkaline/oxidative pretreatment of corn straw undergoing enzymatic hydrolysis by cellulase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 660-664.
538. Yu, S. Y., Zhu, Y. J. and Li, W. G. (1997). Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biological Trace Element Research*, 56(1), 117-124.
539. Zdražil, F. and Brunnert, H. (1981). Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(3), 183-188.
540. Zdražil, F. and Puniya, A. K. (1994). Influence of carbon dioxide on lignin degradation and digestibility of lignocellulosics treated with *Pleurotus sajor-caju*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 33(3), 237-244.
541. Zdražil, F. and Puniya, A. K. (1995). Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 54(1), 85-87.
542. Zdražil, F., Galletti, G. C., Piccaglia, R., Chiavari, G. and Francioso, O. (1991). Influence of oxygen and carbon dioxide on cell wall degradation by white-rot fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 32(1-3), 137-142.
543. Zagklis, D. P., Vavouraki, A. I., Kornaros, M. E. and Paraskeva, C. A. (2015). Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 69-76.
544. Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B., Divne, C., Nicholls, P. and Haltrich, D. (2006). Cellobiose dehydrogenase—a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. *Current Protein and Peptide Science*, 7(3), 255–280.
545. Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., ... and Yu, Z. (2010). Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, 101(1), 222-227.
546. Zeng, J., Singh, D. and Chen, S. (2011). Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. *Bioresource technology*, 102(3), 3206-3214.
547. Zeng, Q., Zhou, F., Lei, L., Chen, J., Lu, J., Zhou, J., ... and Huang, L. (2017). *Ganoderma lucidum* polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging. *Molecular Medicine Reports*, 15(1), 111-116.
548. Zengin, G., Sarikurku, C., Gunes, E., Uysal, A., Ceylan, R., Uysal, S., ... and Aktumsek, A. (2015). Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC–DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food and Function*, 6(8), 2794-2802.
549. Zerva, A., Manos, N., Vouyiouka, S., Christakopoulos, P. and Topakas, E. (2016). Bioconversion of biomass-derived phenols catalyzed by *Myceliophthora thermophila* laccase. *Molecules*, 21(5), 550.
550. Zerva, A., Zervakis, G. I., Christakopoulos, P. and Topakas, E. (2017). Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management*, 203, 791-798.
551. Zervakis, G. and Balis, C. (1996). A pluralistic approach on the study of *Pleurotus* species, with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research* 100, 717-731.



552. Zervakis, G. I., Bekiaris, G., Tarantilis, P. A. and Pappas, C. S. (2012). Rapid strain classification and taxa delimitation within the edible mushroom genus *Pleurotus* through the use of diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. *Fungal Biology*, 116(6), 715-728.
553. Zervakis, G. I. and Koutrotsios, G. Solid state fermentation of plant residues and agro-industrial wastes for the production of medicinal mushrooms. In *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development*; Agrawal, D. C., Tsay, H.-S., Shyur, L.-F., Wu, Y.-C. and Wang, S.-Y., Eds.; Springer Nature: Singapore, 2017, pp 365–396.
554. Zervakis, G. I., Koutrotsios, G. and Katsaris, P. (2013). Composted versus raw olive mill waste as substrates for the production of medicinal mushrooms – An assessment of selected cultivation and quality parameters. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/546830>.
555. Zervakis, G. I., Ntougias, S., Gargano, M. L., Besi, M. I., Polemis, E., Typas, M. A. and Venturella, G. (2014). A reappraisal of the *Pleurotus eryngii* complex–New species and taxonomic combinations based on the application of a polyphasic approach, and an identification key to *Pleurotus* taxa associated with Apiaceae plants. *Fungal Biology*, 118(9-10), 814-834.
556. Zervakis, G., Yiatras, P., and Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 237-243.
557. Zervakis and G. Venturella, G. Mushroom breeding and cultivation favors ex situ conservation of Mediterranean *Pleurotus* taxa. In *Managing Plant Genetic Diversity*; Engels, J. M. M., Ramanantha Rao, V., Brown, A. H. D. and Jackson, M. T., Eds.; IPGRI, CABI Publishing: 2002; pp 351–358.
558. Zhan HY. Fiber chemistry and physics. Beijing: Science Press; 2005.
559. Zhang, J., Chang, L., Jin, H., Xia, Y., Wang, L., He, W., ... and Chen, H. (2016). Benzopyrene promotes lung cancer A549 cell migration and invasion through up-regulating cytokine IL8 and chemokines CCL2 and CCL3 expression. *Experimental Biology and Medicine*, 241(14), 1516-1523.
560. Zhang, P., Hu, H.R. and Shi, S.L. (2006). Application of hemicellulose. *Tianjin Pap Mak.*, 2, 16-8.
561. Zhang, R., Li, X. and Fadel, J. G. (2002). Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource Technology*, 82, 277–284.
562. Zhang, X., Xu, C. and Wang, H. (2007). Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(2), 149-151.
563. Zhang, Y., Mills, G.L. and Nair, M.G. (2003). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*, 10, 386–390.
564. Zhou, X.W., Su, K.Q. and Zhang, Y.M. (2012). Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 941–963.
565. Zhu, F., Qu, L., Fan, W., Qiao, M., Hao, H. and Wang, X. (2011). Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. *Environmental monitoring and assessment*, 179(1-4), 191-199.
566. Zied, D.C., Maciel, W.P., Marques, S.C., da Silveira e Santos, D.M., Rinker, D.L. and Dias, E.S. (2016). Selection of strains for shiitake production in axenic substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32,168-179.
567. Zimbardi, F., Viggiano, D., Nanna, F., Demichele, M., Cuna, D. and Cardinale, G. (1999). Steam explosion of straw in batch and continuous systems. In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 117-125). Humana Press, Totowa, NJ.
568. Zugenmaier, P. (2001). Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1341–417.
569. Zych, D. (2008). The viability of corn cobs as a bioenergy feedstock. *A report of the West Central Research and Outreach Center, University of Minnesota*.



## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΠΡΟΚΥΨΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή έχουν προκύψει μέχρι τη στιγμή της συγγραφής της έξι (6) δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με συντελεστή απήχησης (SCI), ένα κεφάλαιο σε διεθνή έκδοση βιβλίου (Springer), επτά (7) εργασίες σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια και δέκα (10) σε εθνικά επιστημονικά συνέδρια. Αναλυτικά οι εν λόγω δημοσιεύσεις παρουσιάζονται παρακάτω διαχωρισμένες ανά Κεφάλαιο αναλόγως του περιεχομένου τους.

### Κεφάλαιο 2.1.

**Κουτρώτσιος Γ.,** Σταθόπουλος Π., Καλογερόπουλος Ν., Καλιώρα Α., Μαστρογιάννης, Α., Λαχουβάρης, Ε. & Ζερβάκης Γ.Ι. (2015). Ενδοειδική ποικιλομορφία των καλλιεργητικών παραμέτρων και επιλεγμένων βιοδραστικών συστατικών μανιταριών του βασιδιομύκητα *Pleurotus ostreatus*. Πρακτικά 6ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας 'Μικροβιόκοσμος', σελ. 182-183 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία 'Μικροβιόκοσμος', Αθήνα.

**Koutrotsios, G.,** Kalogeropoulos, N., Stathopoulos, P., Kaliora, A. & Zervakis, G.I. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 98. doi:10.1007/s11274-017-2262-1.

### Κεφάλαιο 2.2.

**Koutrotsios, G.,** Mountzouris, K.C., Chatzipavlidis, I. & Zervakis, G.I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi - Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. *Food Chemistry* 161, 127–135.

**Κουτρώτσιος, Γ.,** Δανέζης, Γ., Γεωργίου, Κ. & Ζερβάκης, Γ.Ι. (2017). Προσδιορισμός σπάνιων γαιών και ακτινίδων σε υποστρώματα καλλιέργειας των ειδών *Cyclocybe cylindracea* και

*Pleurotus ostreatus* και στα παραγόμενα μανιτάρια – Διερεύνηση της επίδρασης τους σε επιλεγμένες καλλιεργητικές και ποιοτικές παραμέτρους. *Πρακτικά 7ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας 'Μικροβιόκοσμος'*, σελ. 35-36 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία 'Μικροβιόκοσμος', Αθήνα.

**Koutrotsios, G.**, Danezis, G., Georgiou, C. & Zervakis, G.I. (2018). Rare earth elements concentration in mushroom cultivation substrates affects the production process and fruit-bodies content of *Pleurotus ostreatus* and *Cyclocybe cylindracea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi:10.1002/jsfa.9085

### Κεφάλαιο 2.3.

**Κουτρώτσιος, Γ.**, Σταθόπουλος, Π., Καλιώρα, Α., Ζερβάκης, Γ.Ι. & Καλογερόπουλος, Ν. (2015). Φαινολικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτική δράση μανιταριών *Pleurotus* που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα. *Πρακτικά Συνεδρίου «Ημέρες Χημείας Τροφίμων»*. ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα (26-27 Νοεμβρίου 2015).

**Koutrotsios, G.**, Mountzouris, K. & Zervakis, G.I. (2016). Assessment of production and mushroom quality parameters for exotic mushrooms cultivated on olive residues and wastes. In *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*, Vol. 19, Article 167, p. 531 (eds. J.J.P. Baars & A.S.M. Sonnenberg). ISMS. Amsterdam, The Netherlands.

**Koutrotsios, G.**, Kalogeropoulos, N., Kaliora, A., Kaplani, A. & Zervakis, G.I. (2017). Enhancement of bioactive compounds in *Pleurotus* mushrooms produced on substrates containing olive or wineries by-products – The noteworthy cases of *P. eryngii* and *P. nebrodensis*. In *Proceedings of the 9th International Medicinal Mushrooms Conference*, pp. 62. Edited by M.L. Gargano & G. Venturella. Palermo, Italy.

**Κουτρώτσιος, Γ.**, Καλογερόπουλος, Ν., Καλιώρα, Α., Σταθόπουλος, Π. & Ζερβάκης, Γ.Ι. (2017). Επίδραση υποστρωμάτων αποτελούμενων από παραπροϊόντα ελαιουργίας και οινοποιίας σε καλλιεργητικές παραμέτρους και σε βιοδραστικά συστατικά μανιταριών του είδους *Pleurotus citrinopileatus*. *Πρακτικά 7ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας 'Μικροβιόκοσμος'*, σελ. 37-38 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία 'Μικροβιόκοσμος', Αθήνα.

**Koutrotsios, G.**, Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. & Zervakis, G.I. (2018) Toward an increased functionality in oyster (*Pleurotus*) mushrooms produced on grape marc or olive mill wastes

serving as sources of bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 5971–5983.

#### Κεφάλαιο 2.4

**Koutrotsios, G.**, Mountzouris K.C. & Zervakis G.I. (2012). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea* on various lignocellulosic by-products. In *Proceedings of the IAMAW 1st International Workshop “Valorization of Mediterranean Biowastes and Effluents”*, pp. 30-31 (abstract). IAMAW, Santarem, Portugal.

**Κουτρώτσιος, Γ.**, Μουντζούρης Κ. & Ζερβάκης Γ.Ι. (2015). Αξιοποίηση ελαιοκομικών παραπροϊόντων για την παραγωγή εδώδιμης βιομάζας του βασιδιομύκητα *Agrocybe cylindracea*. *Πρακτικά 6ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας ‘Μικροβιόκοσμος’*, σελ. 180-181 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία ‘Μικροβιόκοσμος’, Αθήνα.

#### Κεφάλαιο 2.5.

**Koutrotsios, G.**, Larou, E., Mountzouris, K. & Zervakis, G.I. (2016). Detoxification of olive mill wastewater and bioconversion of olive crop residues into high-value added biomass by the choice edible mushroom *Hericium erinaceus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180, 195–209.

#### Κεφάλαιο 2.6.

Πατσού Μ., Μήτσου Ε., Κώτσου Μ., **Κουτρώτσιος Γ.**, Ζερβάκης Γ.Ι. & Κυριακού Α. (2015). Ανάπτυξη επιλεγμένων προβιοτικών στελεχών σε υποστρώματα με βάση καρποφορίες μακρομυκήτων. *Πρακτικά 6ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας ‘Μικροβιόκοσμος’*, σελ. 269-270 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία ‘Μικροβιόκοσμος’, Αθήνα.

Τσάπατου Α., Μήτσου Ε.Κ., Πατσού Μ., **Κουτρώτσιος Γ.**, Ζερβάκης Γ.Ι. & Κυριακού Α. (2015). In vitro ζύμωση μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου. *Πρακτικά 6ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας ‘Μικροβιόκοσμος’*, σελ. 344-345 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία ‘Μικροβιόκοσμος’, Αθήνα.

Tsapatou, A., Mitsou, E.K., Patsou, M., **Koutrotsios, G.**, Zervakis, G.I. & Kyriacou, A. (2015). Potential prebiotic effect of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* mushrooms on human gut microbiota. In *Proceedings of the 4th Gut Microbiota for Health World Summit*, p. 11 (abstract). ESNM, Barcelona.

Μήτσου, Ε.Κ., Κώτσου, Μ., Τσάπατου, Α., Πατσού, Μ., **Κουτρώτσιος, Γ.**, Ζερβάκης, Γ.Ι., Μουντζούρης, Κ. & Κυριακού, Α. (2017). Μελέτη της πιθανής πρεβιοτικής δράσης μανιταριών και μυκηλίου των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* στον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου. *Πρακτικά 7ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας 'Μικροβιόκοσμος'*, σελ. 111-112 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία 'Μικροβιόκοσμος', Αθήνα.

#### Κεφάλαιο 2.7.

**Κουτρώτσιος, Γ.**, Ατσά, Ζ., Πολέμης, Η. & Ζερβάκης, Γ.Ι. (2014). Ξυλοσηπτικοί βασιδιομυκήτες από επιλεγμένα δασικά ενδιαιτήματα και αξιοποίηση τους στην αποδόμηση υγρών αποβλήτων ελαιολιτριβείων. *Πρακτικά 7ου Πανελληνίου Συνεδρίου Οικολογίας*, σελ. 107 (περίληψη). Ελληνική Οικολογική Εταιρεία, Μυτιλήνη.

**Koutrotsios, G.** & Zervakis, G.I. (2014). Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi. *BioMed Research International*, Article ID 482937, 14 pp., doi: 10.1155/2014/482937.

**Koutrotsios, G.** & Zervakis, G.I. (2015). Degradation process of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Abortiporus biennis*. In *Proceedings of the 6th European Bioremediation Conference*, pp. 350. Edited by Kalogerakis, N., Fava, F. & Manousaki, E. Chania, Greece.

#### Κεφάλαιο 2.8.

**Koutrotsios, G.**, Rondo, S., Ehaliotis, C. & Zervakis, G.I. (2018). Solid state fermentation of olive mill wastes and cultivation residues by selected white-rot fungi, and evaluation of the final product as substrate for plant growth. In *Proceedings of the 7th European Bioremediation Conference and 11th International Society for Environmental Biotechnology Conference*, p. 469. Edited by Kalogerakis, N., Fava, F. Olguin, E.J. & Manousaki, E. Technical University of Crete, Chania, Greece.

Κεφάλαια 2.1 - 2.6.

**Κουτρώσιος, Γ.**, Μουντζούρης Κ., Χατζηπαυλίδης Ι. & Ζερβάκης Γ.Ι. (2012). Παραγωγή εδώδιμων μανιταριών από λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα - Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας και των τελικών προϊόντων. *Πρακτικά 5ου Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστημονικής Εταιρείας 'Μικροβιόκοσμος'*, σελ. 154-155 (περίληψη). Επιστημονική Εταιρεία 'Μικροβιόκοσμος', Αθήνα.

**Koutrotsios, G.**, Mountzouris, K. & Zervakis, G.I. (2014). Fungal bioconversions of various lignocellulosic by-products to edible biomass. *New Biotechnology* Vol. 31S, S212 (abstract). 16th European Congress on Biotechnology, European Federation of Biotechnology, Edinburgh. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.05.996>].

Zervakis, G.I. & **Koutrotsios, G.** (2017). Solid state fermentation of plant residues and agro-industrial wastes for the production of medicinal mushrooms. In *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development*, pp. 365-396. Edited by D.C. Agrawal, H.-S. Tsay, L.-F. Shyur, Y.-C. Wu & S.-Y. Wang. Springer Nature Singapore; doi: 10.1007/978-981-10-5978-0.





---

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

---

Πίνακας Π1. Συγκεντρώσεις σπάνιων γαιών ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) των επτά υπό μελέτη υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μανιταριών *Cyclocybe cylindracea* και *Pleurotus ostreatus* (AN: κελύφη αμυγδάλου και καρυδιού 1:1  $\beta/\beta$ , CC: σπάδικες καλαμποκιού, GM: στέμφυλα οινοποιίας και υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος 1:1  $\beta/\beta$ , OL: παραπροϊόντα ελαιοκομίας (φύλλα ελιάς και απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων 1:1  $\beta/\beta$ ), OS: πυρηνόξυλο, PN: πευκοβελόνες και PL: φύλλα φοίνικα), Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $n = 4$ ). Οι εκθέτες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan's  $t$ -test,  $p < 0,05$ ) για τις συγκρίσεις των μέσων όρων μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

REEs	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
Ce	86 $\pm$ 25 <sup>de</sup>	360 $\pm$ 25 <sup>cd</sup>	601 $\pm$ 58 <sup>bc</sup>	251 $\pm$ 31 <sup>de</sup>	69.0 $\pm$ 2.8 <sup>e</sup>	735 $\pm$ 92 <sup>b</sup>	3668 $\pm$ 248 <sup>a</sup>
Dy	3.52 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	18.80 $\pm$ 2.58 <sup>cde</sup>	36.9 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	20.7 $\pm$ 1.4 <sup>bcd</sup>	4.32 $\pm$ 0.37 <sup>de</sup>	34 $\pm$ 11 <sup>bc</sup>	232 $\pm$ 16 <sup>a</sup>
Er	1.89 $\pm$ 0.22 <sup>d</sup>	9.7 $\pm$ 1.5 <sup>cd</sup>	18.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	7.5 $\pm$ 2.3 <sup>d</sup>	2.30 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	17.4 $\pm$ 5.4 <sup>bc</sup>	116.6 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>
Eu	1.59 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	6.99 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	13.6 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	7.2 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	1.63 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	13.7 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	78.1 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>
Gd	4.59 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	25.72 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	50.8 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>	27.1 $\pm$ 4.4 <sup>c</sup>	5.28 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	57.2 $\pm$ 10.3 <sup>b</sup>	341.0 $\pm$ 24.0 <sup>a</sup>
Ho	0.56 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	3.54 $\pm$ 0.33 <sup>cd</sup>	6.62 $\pm$ 0.59 <sup>bc</sup>	3.21 $\pm$ 0.54 <sup>cd</sup>	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	7.3 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	41.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
La	38.5 $\pm$ 1.4 <sup>c</sup>	156.1 $\pm$ 5.4 <sup>c</sup>	320.6 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	132.7 $\pm$ 5.7 <sup>c</sup>	34.6 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	411 $\pm$ 19 <sup>b</sup>	1908 $\pm$ 120 <sup>a</sup>
Lu	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.26 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.46 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	12.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
Nd	17.8 $\pm$ 9.8 <sup>c</sup>	129.2 $\pm$ 8.4 <sup>c</sup>	310 $\pm$ 45 <sup>b</sup>	91 $\pm$ 39 <sup>c</sup>	27.90 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>	278 $\pm$ 69 <sup>b</sup>	1730 $\pm$ 114 <sup>a</sup>
Pr	6.87 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	31.32 $\pm$ 0.71 <sup>cd</sup>	60.0 $\pm$ 6.0 <sup>bc</sup>	36.6 $\pm$ 7.1 <sup>c</sup>	7.43 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>	74 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	432 $\pm$ 28 <sup>a</sup>
Sc	20.9 $\pm$ 4.9 <sup>d</sup>	37 $\pm$ 10 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 3.2 <sup>c</sup>	35.8 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	20.30 $\pm$ 0.69 <sup>d</sup>	166 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	131.13 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>
Sm	5.55 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	26.9 $\pm$ 1.2 <sup>cd</sup>	51.1 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>	28.8 $\pm$ 5.4 <sup>c</sup>	6.26 $\pm$ 0.26 <sup>d</sup>	56.3 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>	345 $\pm$ 23 <sup>a</sup>
Tb	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	3.17 $\pm$ 0.28 <sup>bc</sup>	6.24 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	3.41 $\pm$ 0.45 <sup>bc</sup>	0.33 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	4.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	44.0 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>
Th	5.7 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	29.47 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	89.0 $\pm$ 8.6 <sup>b</sup>	28.1 $\pm$ 9.4 <sup>c</sup>	7.6 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	97.1 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	456 $\pm$ 30 <sup>a</sup>
Tm	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	1.27 $\pm$ 0.19 <sup>cd</sup>	2.25 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>	0.99 $\pm$ 0.26 <sup>d</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	2.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	15.2 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
U	2.25 $\pm$ 0.35 <sup>d</sup>	11.09 $\pm$ 0.16 <sup>cd</sup>	26.1 $\pm$ 8.8 <sup>b</sup>	11.5 $\pm$ 2.1 <sup>bcd</sup>	5.7 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	24.79 $\pm$ 0.51 <sup>bc</sup>	97 $\pm$ 12 <sup>a</sup>
Y	18.8 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	104 $\pm$ 12 <sup>c</sup>	212 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	98 $\pm$ 17 <sup>c</sup>	24.3 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>	217 $\pm$ 50 <sup>b</sup>	1249 $\pm$ 98 <sup>a</sup>
Yb	1.65 $\pm$ 0.26 <sup>d</sup>	8.51 $\pm$ 0.93 <sup>c</sup>	15.97 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	6.5 $\pm$ 1.9 <sup>cd</sup>	1.89 $\pm$ 0.27 <sup>d</sup>	17.6 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	93.6 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>

Πίνακας Π2. Ξηρό βάρος (g) υποστρωμάτων ανάπτυξης δύο στελεχών του μύκητα *C. cylindracea* αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR), όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις που έγιναν σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές της καλλιέργειας (0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες)

	Αρχικό (g)	30		60		90		120	
Υπόστρωμα		LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281
WS	310,3±14,7	289,0±8,2	267,0±8,2	268,0±16,3	247,0±16,3	247,8±18,8	215,0±18,8	182,0±18,0	182,7±18,0
WS:TPOMW 7:1	399,6±22,0	274,0±18,0	276,0±18,0	236,0±19,6	253,0±19,6	204,0±11,4	229,7±11,4	172,9±29,4	130,0±29,4
WS:TPOMW 3:1	299,5±5,7	264,0±13,9	279,0±13,9	234,0±29,4	258,0±29,4	193,0±42,5	237,2±42,5	157,3±34,3	212,3±34,3
WS:TPOMW 1:1	330,0±13,9	314,0±28,6	305,0±28,6	288,7±18,0	278,7±18,0	274,0±60,4	254,9±60,4	252,0±68,6	221,0±68,6
OL	389,9±33,5	367,0±20,4	354,0±20,4	335,0±44,9	319,0±44,9	299,0±47,4	284,2±47,4	178,8±56,3	250,0±56,3
OL:TPOMW 7:1	389,9±23,7	377,0±17,1	363,0±17,1	359,0±49,8	337,0±49,8	341,1±56,3	310,9±56,3	327,2±38,4	287,0±38,4
OL:TPOMW 3:1	429,3±46,5	400,0±24,5	399,0±24,5	364,0±27,8	366,0±27,8	338,0±51,4	334,0±51,4	300,7±47,4	302,5±47,4
OL:TPOMW 1:1	420,6±31,0	390,0±33,5	401,7±51,1	347,3±10,8	340,3±10,8	332,0±42,5	312,2±42,5	298,1±56,3	287,7±56,3
WS:OLPR 3:1	290,9±13,9	274,0±18,0	269,0±18,0	246,0±9,0	246,0±9,0	231,0±33,5	223,9±33,5	200,0±29,4	202,0±29,4
WS:OLPR 1:1	400,4±23,7	379,3±45,7	377,3±45,7	368,0±42,5	350,0±42,5	349,0±38,4	326,0±38,4	338,9±42,5	303,6±42,5
WS:OLPR 1:3	430,3±25,3	400,0±50,6	398,0±50,6	378,0±14,7	378,0±14,7	338,0±47,4	340,0±47,4	315,0±33,5	311,6±33,5

**Πίνακας Π3. Περιεκτικότητα ημικυτταρινών (g) σε υποστρώματα ανάπτυξης δύο στελεχών του μύκητα *C. cylindracea* αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιολιτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR), όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις που έγιναν σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές της καλλιέργειας (0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες)**

	Αρχικό (g)	30		60		90		120	
Υπόστρωμα		LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281
WS	107,0	73,7±6,5	69,1±6,5	62,0±5,7	61,9±5,7	45,9±4,9	52,0±4,9	43,0±7,8	44,9±7,8
WS:TPOMW 7:1	97,2	66,5±3,3	72,0±3,3	53,5±4,1	53,0±4,1	39,8±6,5	48,0±6,5	38,7±4,7	30,8±4,7
WS:TPOMW 3:1	94,6	62,4±6,4	67,6±6,4	49,2±3,3	61,3±3,3	40,0±3,8	49,7±3,8	33,0±3,8	46,5±3,8
WS:TPOMW 1:1	89,9	66,5±2,4	61,9±2,4	58,5±8,0	52,2±8,0	54,0±17,1	45,3±17,1	48,6±7,6	43,0±7,6
OL	60,2	47,0±6,5	40,0±6,5	38,9±2,6	35,2±2,6	30,3±2,9	32,0±2,9	25,8±4,7	27,5±4,7
OL:TPOMW 7:1	59,9	43,7±4,3	42,7±4,3	36,2±5,4	38,0±5,4	33,7±2,9	34,6±2,9	26,7±3,8	28,0±3,8
OL:TPOMW 3:1	72,1	47,9±7,3	45,0±7,3	34,8±3,7	39,1±3,7	33,6±5,4	36,2±5,4	32,3±5,1	27,7±5,1
OL:TPOMW 1:1	70,5	61,2±8,2	59,2±8,2	46,6±1,9	43,8±1,9	45,3±7,1	40,0±7,1	35,7±3,5	38,1±3,5
WS:OLPR 3:1	108,8	69,0±9,0	49,9±9,0	60,0±4,7	49,0±4,7	51,2±9,0	48,8±9,0	48,0±5,5	47,0±5,5
WS:OLPR 1:1	105,9	78,0±9,8	77,6±9,8	69,6±8,2	66,4±8,2	66,0±8,0	65,0±8,1	63,8±9,0	57,9±9,0
WS:OLPR 1:3	100,4	74,8±8,2	69,2±8,2	63,2±6,5	68,5±6,5	59,6±8,2	54,6±8,2	50,0±14,7	52,5±14,7

**Πίνακας Π4. Περιεκτικότητα κυτταρίνης (g) σε υποστρώματα ανάπτυξης δύο στελεχών του μύκητα *C. cylindracea* αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR), όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις που έγιναν σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές της καλλιέργειας (0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες)**

Υπόστρωμα	Αρχικό	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281
WS	100,4	86,2±8,2	82,2±8,2	65,8±5,4	66,7±5,4	53,6±4,9	51,4±4,9	51,0±9,8	47,6±9,8
WS:TPOMW 7:1	97,1	74,3±7,3	81,9±7,3	61,0±6,0	61,3±6,0	44,2±4,1	54,5±4,1	42,8±7,3	34,0±7,3
WS:TPOMW 3:1	86,5	68,7±6,3	75,1±6,3	56,3±0,9	72,5±0,9	44,0±5,1	59,5±5,1	39,2±6,5	55,9±6,5
WS:TPOMW 1:1	81,5	76,3±4,1	71,7±4,1	75,3±2,9	64,8±2,9	75,1±9,0	64,2±9,0	64,9±11,4	62,0±11,4
OL	42,9	40,0±6,5	37,1±6,5	26,0±2,1	36,0±2,1	34,5±4,9	34,0±4,9	26,1±4,9	32,8±4,9
OL:TPOMW 7:1	46,5	44,0±9,0	37,1±9,0	42,0±4,6	41,0±4,6	38,2±7,1	37,0±7,1	37,6±11,4	35,0±11,4
OL:TPOMW 3:1	52,9	52,0±9,8	52,0±9,8	50,0±3,8	50,7±3,8	49,4±9,8	47,0±9,8	41,2±16,3	33,4±16,3
OL:TPOMW 1:1	62,9	61,0±13,9	59,2±13,9	58,1±6,5	58,2±6,5	54,0±5,3	56,0±5,3	49,2±7,3	51,4±7,3
WS:OLPR 3:1	87,1	61,3±7,3	59,7±7,3	57,0±4,9	53,4±4,9	54,3±3,3	50,7±3,3	38,0±8,2	40,0±8,2
WS:OLPR 1:1	106,4	97,0±17,1	96,0±17,1	89,2±9,0	86,5±9,0	68,6±7,3	80,3±7,3	58,0±13,1	68,4±13,1
WS:OLPR 1:3	116,6	111,0±16,3	77,4±16,3	96,5±15,5	74,0±15,5	76,0±13,1	68,6±13,1	70,0±16,3	60,7±16,3

Πίνακας Π5. Περιεκτικότητα λιγνίνης (g) σε υποστρώματα ανάπτυξης δύο στελεχών του μύκητα *C. cylindracea* αποτελούμενα από μείγματα σε διάφορες αναλογίες των παρακάτω υλικών: άχυρο (WS), απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW), φύλλα ελιάς (OL) και κλαδέματα ελιάς (OLPR), όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις που έγιναν σε πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές της καλλιέργειας (0, 30, 60, 90 και 120 ημέρες).

Υπόστρωμα	Αρχικό	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281	LGAM446	LGAM281
WS	15,5±2,0	15,0±1,6	15,0±1,6	14,6±1,6	14,6±1,6	14,1±1,6	13,8±1,6	13,2±1,6	9,2±1,6
WS:TPOMW 7:1	18,7±2,5	15,1±3,3	17,5±3,3	14,1±1,7	15,8±1,7	13,9±2,6	12,0±2,6	11,7±2,4	9,5±2,4
WS:TPOMW 3:1	31,8±4,4	20,8±5,9	20,5±5,9	18,8±2,4	20,0±2,4	14,2±2,1	19,1±2,1	10,0±3,3	17,1±3,3
WS:TPOMW 1:1	37,2±3,3	27,6±2,6	24,4±2,6	27,4±4,7	25,1±4,7	27,0±4,1	24,0±4,1	26,2±6,5	22,0±6,5
OL	51,4±4,9	50,0±3,3	49,8±3,3	48,3±3,0	47,5±3,0	47,6±4,9	49,2±4,9	36,1±3,0	47,0±3,0
OL:TPOMW 7:1	53,0±2,4	52,8±7,2	51,0±7,2	50,0±4,2	42,9±4,2	49,8±8,2	42,0±8,2	46,5±9,8	41,0±9,8
OL:TPOMW 3:1	54,3±3,3	50,0±3,4	52,0±3,4	47,7±3,3	48,5±3,3	47,0±14,1	47,0±11,4	44,9±6,5	41,8±6,5
OL:TPOMW 1:1	60,0±4,9	58,0±7,3	58,0±7,3	55,3±7,8	57,0±7,8	52,2±14,7	56,5±14,7	46,7±9,0	53,0±9,0
WS:OLPR 3:1	18,8±2,9	17,9±2,6	14,7±2,6	16,8±2,0	14,4±2,0	16,0±4,9	14,0±4,9	11,3±2,4	11,3±2,4
WS:OLPR 1:1	37,6±5,5	32,0±5,4	33,4±5,4	30,0±3,8	31,1±3,8	28,6±6,5	31,0±6,5	22,0±4,9	27,0±4,9
WS:OLPR 1:3	44,5±6,6	43,9±8,1	39,2±8,1	41,1±4,7	37,0±4,7	37,6±7,3	36,0±7,3	31,2±3,3	30,0±3,3

Πίνακας Π6. Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus acidophilus*, κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48) ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση των βακτηριακών πληθυσμών ( $\log_{10}$ CFU/ml) και τα πεζά γράμματα στους εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test) μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 24 ωρών και το σύμβολο (\*) στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24 και 48 ωρών.

Είδος	Υπόστρωμα	T0	T24	T48
Μάρτυρας		5,74 $\pm$ 0,03 <sup>++</sup> *	7,32 $\pm$ 0,02 <sup>a*</sup>	6,55 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
Μάρτυρας χωρίς γλυκόζη		5,89 $\pm$ 0,01 <sup>++</sup> *	7,24 $\pm$ 0,14 <sup>a*</sup>	4,45 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	BS	5,79 $\pm$ 0,01 <sup>++</sup> *	7,88 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	7,19 $\pm$ 0,25 <sup>ab</sup>
	BS:TPOMW 1:1	5,88 $\pm$ 0,03 <sup>++</sup> *	7,51 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	7,53 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>
	BS:OLPR 1:1	5,91 $\pm$ 0,03 <sup>++</sup> *	7,47 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	7,63 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WS	5,85 $\pm$ 0,04 <sup>++</sup> *	6,91 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	8,26 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
	WS:TPOMW 1:1	5,78 $\pm$ 0,03 <sup>++</sup> *	7,66 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	8,10 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	WS:OLPR 1:1	5,82 $\pm$ 0,02 <sup>++</sup> *	7,93 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	7,97 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>

Πίνακας Π7. Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Lactobacillus gasseri*, κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48) ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση των βακτηριακών πληθυσμών ( $\log_{10}$ CFU/ml) και τα πεζά γράμματα στους εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test) μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 24 ωρών και το σύμβολο (\*) στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24 και 48 ωρών.

Είδος	Υπόστρωμα	T0	T24	T48
Μάρτυρας		6,71 $\pm$ 0,06 <sup>a++</sup> *	8,51 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	8,75 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>
Μάρτυρας χωρίς γλυκόζη		6,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	6,37 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	6,38 $\pm$ 0,30 <sup>c</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	BS	6,74 $\pm$ 0,02 <sup>a++</sup> *	8,65 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	8,34 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>
	BS:TPOMW 1:1	6,78 $\pm$ 0,03 <sup>a++</sup> *	8,81 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	8,89 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>
	BS:OLPR 1:1	6,63 $\pm$ 0,07 <sup>a++</sup> *	9,14 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	8,74 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WS	6,74 $\pm$ 0,02 <sup>a++</sup> *	9,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	9,14 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	WS:TPOMW 1:1	6,69 $\pm$ 0,05 <sup>a++</sup> *	8,81 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	8,84 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
	WS:OLPR 1:1	6,72 $\pm$ 0,07 <sup>a++</sup> *	9,00 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	9,01 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>

Πίνακας Π8. Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Bifidobacterium bifidum*, κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48) ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση των βακτηριακών πληθυσμών ( $\log_{10}$ CFU/ml) και τα πεζά γράμματα στους εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test) μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 24 ωρών και το σύμβολο (\*) στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24 και 48 ωρών.

Είδος	Υπόστρωμα	T0	T24	T48
Μάρτυρας		6,67 $\pm$ 0,02 <sup>a+*</sup>	8,40 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>	7,94 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
Μάρτυρας χωρίς γλυκόζη		6,35 $\pm$ 0,03 <sup>a+</sup>	7,68 $\pm$ 0,11 <sup>bc*</sup>	6,46 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	BS	6,73 $\pm$ 0,02 <sup>a+</sup>	7,03 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	6,97 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
	BS:TPOMW 1:1	6,71 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	-	-
	BS:OLPR 1:1	6,79 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	6,96 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WS	6,89 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	6,91 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	6,38 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
	WS:TPOMW 1:1	6,61 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	6,10 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	-
	WS:OLPR 1:1	6,67 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	5,95 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	5,15 $\pm$ 0,45 <sup>c</sup>

Πίνακας Π9. Πληθυσμοί του προβιοτικού βακτηρίου *Bifidobacterium longum*, κατά τον εμβολιασμό (T0), και μετά από 24 και 48) ώρες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υλικά με μοναδική πηγή άνθρακα το λυοφιλιωμένο υλικό που προέκυψε από μανιτάρια των ειδών *G. lucidum* και *P. ostreatus*. Τα μανιτάρια προήλθαν από καλλιέργεια σε συμβατικά υποστρώματα (BS και WS) και σε μείγματα με απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων (TPOMW) και κλαδέματα ελιάς (OLPR). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  τυπική απόκλιση των βακτηριακών πληθυσμών ( $\log_{10}$ CFU/ml) και τα πεζά γράμματα στους εκθέτες τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (Duncan *t*-test) μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 0 και 24 ωρών και το σύμβολο (\*) στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24 και 48 ωρών.

Είδος	Υπόστρωμα	T0	T24	T48
Μάρτυρας		6,67 $\pm$ 0,02 <sup>a+*</sup>	8,40 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	7,94 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
Μάρτυρας χωρίς γλυκόζη		6,35 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	7,68 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	6,46 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	BS	6,34 $\pm$ 0,10 <sup>a+</sup>	7,81 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	6,82 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>
	BS:TPOMW 1:1	6,45 $\pm$ 0,16 <sup>+</sup>	7,81 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	7,27 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
	BS:OLPR 1:1	6,48 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	8,26 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	8,74 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WS	6,69 $\pm$ 0,14 <sup>a+*</sup>	7,45 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	7,20 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
	WS:TPOMW 1:1	6,70 $\pm$ 0,15 <sup>a+*</sup>	7,40 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	7,24 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
	WS:OLPR 1:1	6,44 $\pm$ 0,12 <sup>a*</sup>	7,36 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	7,07 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>





