



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Επίδραση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου στην Φυσιολογική Συμπεριφορά
Στελεχών Εδώδιμων Μυκήτων σε Υγρές Ζυμώσεις»

Σταματιάδης Σ. Σπυρίδων

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

ΑΘΗΝΑ 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Επίδραση Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείου στην Φυσιολογική Συμπεριφορά Στελεχών Εδώδιμων Μυκήτων σε Υγρές Ζυμώσεις»

«Effect of olive mill wastewater-based media on the physiological behavior of edible fungi strains in liquid cultures»

Σταματιάδης Σ. Σπυρίδων

Επιβλέπων Καθηγητής:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Εξεταστική Επιτροπή:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής ΓΠΑ

Διαμαντοπούλου Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του υγρού αποβλήτου ελαιουργίας (ΥΑΕ), το οποίο αποτελεί κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής ελαιόλαδου, στην κυτταρική αύξηση και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες) των μακρομυκήτων *Agrocybe aegerita*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju* και *Flammulina velutipes*, όπως και η ικανότητα των μελετώμενων στελεχών να αποτοξίνωση (αποφαινόλωση και αποχρωματισμός) το περιεχόμενο ΥΑΕ στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας. Αρχικά εξετάστηκε η ταχύτητα γραμμικής αύξησης Κg (mm/ημέρα) των στελεχών *A. aegerita* (AMRL 101, AMRL 104), *L. edodes* (AMRL 125, AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) σε στερεό συνθετικό υπόστρωμα σε τρυβλία Petri στο οποίο έγινε προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις από 0% μέχρι 50%, με σκοπό να επιλεχθούν τα ταχύτερα στελέχη και οι βέλτιστες συγκεντρώσεις ΥΑΕ. Ταχύτερα ήταν τα στελέχη *P. sajor-caju* και *F. velutipes* με τιμές Κg που κυμαίνονταν μεταξύ 4,05-6,45 mm/ημέρα και 3,52-6,60 mm/ημέρα αντίστοιχα και πιο αργά τα στελέχη του μύκητα *A. aegerita* (AMRL 101 και AMRL 104) με τιμές Κg που κυμαίνονταν μεταξύ 2.05-3.32 mm/ημέρα και 2.27-3.57 mm/ημέρα αντίστοιχα. Ακόμα, οι συγκεντρώσεις 15 και 35% ΥΑΕ ευνόησαν την κυτταρική αύξηση, καθώς όλα τα στελέχη εμφάνισαν υψηλές τιμές ταχύτητας γραμμικής αύξησης στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε κινητική μελέτη επιλεγμένων στελεχών *L. edodes*, *P. sapidus*, *P. sajor-caju* και *F. velutipes*, σε υγρές καλλιέργειας κλειστού τύπου, σε συνθετικό υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (30 g/L) και με συγκεντρώσεις ΥΑΕ 0%, 15% και 35%, σε μη ανακινούμενες συνθήκες και σε θερμοκρασία 26±1 °C, όπου μετρήθηκε η παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, η κατανάλωση υποστρώματος καθώς και ο βαθμός αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ. Σε ό,τι αφορά την παραγωγή βιομάζας, όλα τα στελέχη εμφάνισαν υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας, σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα (μάρτυρας, υποστρώματα με 15% και 35% ΥΑΕ), παρόλη την μεγάλη τοξικότητα του περιεχόμενου ΥΑΕ το υπόστρωμα της καλλιέργειας. Επίσης όλα τα μελετώμενα στελέχη εμφάνισαν υψηλή παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών, τόσο ως ποσότητες σε g/L, όσο και ως ποσοστά % επί ξηρού βάρους βιομάζας. Συγκεκριμένα το στέλεχος *L. edodes* εμφάνισε την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας στο θρεπτικό υπόστρωμα με 35% ΥΑΕ, η οποία έφτασε τα 16,79 g/L, την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους 1,18 g/L εμφάνισε στο θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, ενώ την μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών 5,46 g/L εμφάνισε στο θρεπτικό υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ. Στις ζυμώσεις του στελέχους *P. sapidus*, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας 15,19 g/L παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα με 35% ΥΑΕ, ενώ τη μεγαλύτερη παραγωγή λίπους 0,57 g/L εμφάνισε στο θρεπτικό υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ, στο ίδιο υπόστρωμα επίσης εμφάνισε και την μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών 4,00 g/L. Το στέλεχος *P. sajor-caju* παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας 9,59 g/L στο θρεπτικό υπόστρωμα με 35% ΥΑΕ, στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα παρατηρήθηκε επίσης η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους 0,65 g/L καθώς και η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών 3,43 g/L. Για το στέλεχος *F. velutipes* η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας 16,14 g/L παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα με 35% ΥΑΕ, ενώ η μέγιστη παραγωγή λίπους 1,23 g/L και ενδοπολυσακχαριτών 3,22 g/L παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ. Επίσης οι μεγαλύτερες τιμές % κ.β. λιπιδίων (επί ξηρού) παρατηρήθηκαν για όλα τα στελέχη, *L. edodes* (13,35%), *P. sapidus* (9,70%), *P. sajor-caju* (14,61%) και *F. velutipes* (16,68%), στο θρεπτικό υπόστρωμα που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και για το % κ.β. ενδοπολυσακχαριτών (επί ξηρού), με τα στελέχη *L. edodes*, *P. sapidus* και *F. velutipes* να εμφανίζουν μέγιστες τιμές 39,45%, 38,10% και 44,13% κ.β. αντίστοιχα, στο θρεπτικό υπόστρωμα που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ και μόνο το στέλεχος *P. sajor-caju* εμφάνισε τη μέγιστη του τιμή 42,21% κ.β. στο θρεπτικό υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ. Τέλος, όσον αφορά στο βαθμό αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ, όλα τα μελετώμενα στελέχη, εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αποφαινόλωσης, τα οποία κυμαίνονταν μεταξύ 63,3% και 83,3% για το θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ και μεταξύ 76,3% και 89,1% για το θρεπτικό μέσο

με 35% ΥΑΕ. Επίσης, όλα τα στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ στα θρεπτικά υποστρώματα της καλλιέργειας, με τιμές οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 38,96% και 87,01% στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ και μεταξύ 37,71% και 76,98 στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *L. edodes* ήταν εκείνο που πέτυχε την μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων, με τιμές μείωσης 83,3% και 89,1%, στα θρεπτικά υποστρώματα με 15% και 35% ΥΑΕ αντίστοιχα, επίσης το ίδιο στέλεχος εμφάνισε και το μέγιστο ποσοστό αποχρωματισμού (87,01%) στο θρεπτικό υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ, ενώ στο θρεπτικό υπόστρωμα με 35% ΥΑΕ τον μέγιστο αποχρωματισμό (76,98%) εμφάνισε το στέλεχος *F. velutipes*. Ακόμη τις χαμηλότερες τιμές αποφαινόλωσης εμφάνισε το στέλεχος *P. sajor-caju* με ποσοστά 80% και 82% στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ αντίστοιχα, καθώς επίσης το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε και τις χαμηλότερες τιμές αποχρωματισμού με ποσοστά 38,96 και 37,71 στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% αντίστοιχα. Συμπερασματικά, οι μελετώμενοι μακρομύκητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία στον βιολογική επεξεργασία των ΥΑΕ με ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλης διατροφικής αξίας προϊόντων (βιομάζα, πολυσακχαρίτες, λιπίδια).

Λέξεις κλειδιά: *Agrocybe aegerita*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Flamulina velutipes*, υγρά απόβλητα ελαιουργείου, μικροβιακό λίπος, ενδοπολυσακχαρίτες.

ABSTRACT

The purpose of the present research, is to study the effect of olive mill wastewater (OMW), which is an elemental by-product of the olive oil industry, on the cell growth and production of secondary metabolites (microbial fat and intracellular polysaccharides), of the macrofungies: *Agrocybe aegerita*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju* and *Flammulina velutipes*, as well as the ability of the examined strains to detoxify (phenolic content reduction and decolorization) the olive mill waste water contained in the nutrient substrate of the culture. Firstly, in order to measure the linear velocity of the mycelium growth, Kr (mm/day), the following strains: *A. aegerita* (AMRL 101, AMRL 104), *L. edodes* (AMRL 125, AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) and *F. velutipes* (AMRL 271), were cultured in a synthetic solid-state substrate, in Petri dishes, in which we added OMW in concentrations from 0% to 50%. Our intention was to select the fastest strains and the optimal concentrations of OMW. The strains *P. sajor-caju* and *F. velutipes* were proved to be the fastest ones, with Kr values ranging from 4.05 to 6.45 mm/day and from 3.52 to 6.60 mm/day respectively and strains of the fungus *A. aegerita* (AMRL 101 and AMRL 104) were established as the slowest ones with Kr values ranging from 2.05 to 3.32 mm/day, and from 2.27 to 3.57 mm/day respectively. Furthermore the concentration of 15% and 35% OMW enhanced the cellural growth, as all the examined strains presented high linear velocity values on these concentrations. The research was followed by an examination of the kinetics of the selected strains *L. edodes*, *P. sapidus*, *P. sajor-caju* and *F. velutipes*, in closed, liquid state fermentation culture, in a synthetic substrate with glucose (30 g/L) being the main carbon source, and with OMW concentrations of 0%, 15% and 35%, in non-shaking flask cultures and at a temperature of 26±1 °C, where we were able to examine the production of biomass, of lipids and of intrapolsaccharides (IPS), as well as the consumption of substrate, the degree of phenolic content reduction and decolorization of the OMW content. In terms of biomass production, all the examined strains presented high biomass concentration, in all the different substrates (martyre, substrates with 15% and 35% OMW), despite the high toxicity of the OMW contained in the culture substrate. Furthermore, all the examined strains presented high production of intracellular lipids and intrapolsaccharides, both as quantities in g/L, as well as concentration % of dry biomass weight. Specifically, the highest biomass was collected from the strain *L. edodes* in the nutritive substrate with 35% OMW concentration, reaching 16.79 g/L, the highest lipid production 1.18 g/L, was presented in the substrate without OMW, while the highest production of interpolysaccharides 5.46 g/L was presented in the substrate containing 15% OMW. At the fermentations of the strain *P. sapidus*, the maximum biomass production of 15.19 g/L was observed on the nutrient substrate with 35% OMW concentration, while the higher fat production of 0.57 g/L was revealed on the nutrient substrate with 15% OMW concentration, on the same substrate we also detected the maximum production 4.00 g/L of intrapolsaccharides. The strain *P. sajor-caju*, produced the highest amount of biomass at 9.59 g/L on the nutrient substrate with 35% OMW concentration, on the same nutrient substrate, there was also the highest fat production of 0.65 g/L and the highest production 3.43 g/L of interpolysaccharides. Regarding the *F. velutipes* strain, the largest biomass production of 16.14 g/L, was observed on the nutritive substrate with 35% of OMW concentration, while the maximum fat production of 1.23 g/L and intrapolsaccharides of 3.22 g/L, was observed on the nutritive substrate with 15% OMW concentration. Moreover, the highest values % w/w of lipids (on dry weight basis) were obtained for all strains, *L. edodes* (13.35 %), *P. sapidus* (9.70 %), *P. sajor-caju* (14.61 %) και *F. velutipes* (16.68 %), on the non-OMW supplemented substrate. Similar observations as the above were made regarding the % w/w of the intrapolsaccharides (on dry weight basis), concerning the strains *L. edodes*, *P. sapidus* and *F. velutipes*, which exhibit maximum values of 39.45%, 38.10% and 44.13%, respectively, on the non-OMW supplemented substrate. The *P. sajor-caju* strain, was the only one with maximum value of 42.21% on the nutritive substrate with 15% of OMW concentration. Lastly, in regard to the phenolic content reduction and the discoloration of the content of OMW on the nutritive substrate, all the

examined strains, presented high phenol reduction values, ranging between 63.3% and 83.3% for the substrate containing 15% OMW and between 76.3% and 89.1% for the substrate containing 35% OMW. Furthermore, all the strains presented also high decolorization values of the OMW contained in the nutrient substrate of the culture, with values ranging between 38.96% and 87.01% for the substrate containing 15% OMW and between 37.71% and 76.98% for the substrate containing 35% OMW. Specifically, the strain *L. edodes* was the one that achieved the greatest reduction in the concentration of phenolic compounds, with 83.3% and 89.1% reduction on the nutritive substrates with 15% and 35% of OMW concentration, respectively. The particular strain also exhibited the highest rate of discoloration (87.01%) on the nutritive substrate with 15% OMW concentration, while on the one with 35% OMW concentration the maximum discoloration (76.98%) was illustrated by the strain *F. velutipes*. Furthermore, the lowest phenol reduction was presented by the strain *P. sajor-caju* with values 80% and 82% for the substrates containing 15% and 35% OMW respectively, the same strain presented also the lowest decolorization of the OMW, with values 38.96% and 37.71% for the substrates containing 15% and 35% OMW respectively. In conclusion, the examined strains can be used with great success as a mean of biological treatment of OMW with simultaneous production of high nutrition value products (biomass, polysaccharides, lipids).

Keywords: *Agrocybe aegerita*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Flamulina velutipes*, olive mill wastewater, microbial fat, intracellular polysaccharides.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έλαβε χώρα κατά κύριο λόγο στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων /ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε ορισμένους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην επιτυχή διεξαγωγή της.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την Αναπλ. Ερευνήτρια Διαμαντοπούλου Παναγιώτα για την αποτελεσματική συνεργασία και καθοδήγηση της, χωρίς την οποία η εκπόνηση της παρούσας μελέτης δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή Παπανικολάου Σεραφείμ για τις παρατηρήσεις και τα σχόλια κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή του κειμένου της παρούσας πτυχιακής. Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθ. Ν. Στοφόρο για τις επισημάνσεις του στην παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συμφοιτητές μου για την υποστήριξη τους καθώς και για όλες τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί αυτά τα δυο χρόνια.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και την Μαριάννα Γιαννουσάκη που μου προσέφεραν απλόχερα την βοήθεια και την συμπαράστασή τους καθ'όλη την διάρκεια της διεξαγωγής της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Σταματιάδης Σπυρίδων

Αθήνα, 2019

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Μακρομύκητες.....	8
1.1.1 Ορισμός και Μορφολογία.....	8
1.1.2 Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων.....	10
1.1.3 Διατροφικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών.....	12
1.1.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών.....	14
1.2 Μελετώμενα Είδη Μακρομυκήτων.....	16
1.2.1 Ο μύκητας <i>Agrocybe aegerita</i>	16
1.2.2 Ο μύκητας <i>Flammulina velutipes</i>	18
1.2.3 Είδη του γένους <i>Pleurotus</i> spp.....	21
1.2.4 Ο μύκητας <i>Lentinula edodes</i>	25
1.3 Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και χρήσιμων μεταβολιτών μακρομυκήτων σε υγρές ζυμώσεις.....	29
1.4 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών μακρομυκήτων.....	32
1.5 Παραγωγή λιπιδίων μακρομυκήτων.....	40
1.5.1 Είδη και χημική σύσταση λιπιδίων μακρομυκήτων.....	41
1.5.2 Βιοσύνθεση μικροβιακών λιπιδίων.....	44
1.6 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (YAE/Olive-mill wastewater – OMWW).....	48
1.6.1 Μέθοδοι παραγωγής ελαιολάδου.....	48
1.6.2 Απόβλητα διεργασιών παραλαβής ελαιολάδου.....	50
1.6.3 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (YAE).....	51
1.6.4 Μέθοδοι επεξεργασίας YAE.....	52
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
2.1 Βιολογικό Υλικό.....	60
2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρού απόβλητου ελαιουργίας (YAE).....	61
2.3 Μέτρηση της ταχύτητας γραμμικής αύξησης μυκηλίου.....	62
2.4 Πειράματα ζυμώσεων βυθού σε φιάλες.....	63
2.5 Χημικές αναλύσεις.....	64
2.5.1 Συλλογή βιομάζας.....	64

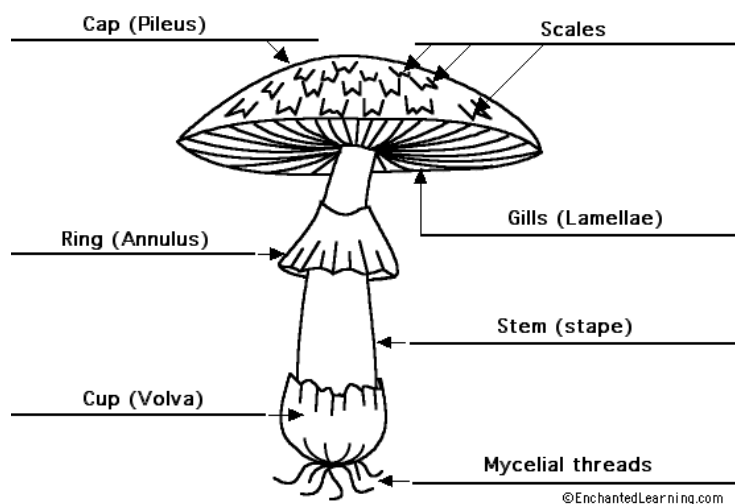
2.5.2 Προσδιορισμός pH.....	64
2.5.3 Προσδιορισμός σακχάρων.....	64
2.5.4 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων.....	65
2.5.5 Αποχρωματισμός.....	66
2.5.6 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.....	66
2.5.7 Προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	67
2.5.8 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών.....	68
2.5.9 Μέτρηση ενδοκυτταρικού λίπους.....	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
3.1 Μέτρηση ταχύτητας γραμμικής αύξησης μυκηλίου.....	69
3.2 Κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης.....	71
3.3 Παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους.....	82
3.4 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	88
3.5 Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.....	91
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	98
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	111
Βιβλιογραφία.....	112
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	121

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μακρομύκητες

1.1.1 Ορισμός και Μορφολογία

Ως μανιτάρια ορίζονται οι μακρομύκητες με διακριτά καρποσώματα που αναπτύσσονται υπέργεια ή υπόγεια (Chang & Milles, 1997). Τα καρποσώματα των μακρομυκήτων έχουν μέγεθος τέτοιο ώστε να είναι ορατά με γυμνό μάτι και να μπορούν να συλλεχθούν με το χέρι. Συνήθως αναπτύσσονται υπέργεια και συναντώνται σε ποικίλα μεγέθη, σχήματα και χρώματα, ανάλογα με το είδος του μανιταριού. Το καρπόσωμα αποτελεί το αναπαραγωγικό μέρος του μακρομύκητα, έχει διάρκεια ζωής περίπου 10-14 μέρες και σκοπός του είναι η παραγωγή σπορίων για την διαίωσιση του είδους. Το υπόλοιπο τμήμα του μακρομύκητα έχει μεγάλη διάρκεια ζωής και ονομάζεται μυκήλιο. Έχει τη μορφή τριχομορφου, αραχνοειδούς ιστού και συναντάται κάτω από το έδαφος καθώς και σε νεκρούς ή ζωντανούς κορμούς δέντρων.



Σχήμα 1.1.1: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός μακρομύκητα

Η δομή των μανιταριών που περιγράφεται συναντάται στα είδη Βασιδιομυκήτων και σε ένα μικρό αριθμό ειδών Ασκομυκήτων. Από τα 16.000 περίπου είδη των Βασιδιομυκήτων, έχει προταθεί ότι πάνω από 10.000 είδη παράγουν βασιδιοκάρπια (καρποσώματα) επαρκούς μεγέθους και κατάλληλης υφής ώστε να θεωρούνται πηγή τροφής. Σε αντίθεση με την κοινή γνώμη, ο αριθμός αυτών των μανιταριών τα οποία είναι δηλητηριώδη είναι αρκετά μεγάλος, περίπου 10%, εκ των οποίων περίπου 30 είδη θεωρούνται θανατηφόρα.

Τα μανιτάρια και οι μύκητες σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι μοιάζουν με φυτά, όμως σε αντίθεση με τα φυτά στερούνται χλωροφύλλης. Γι' αυτό το λόγο δεν μπορούν να συνθέσουν την τροφή τους μέσω φωτοσύνθεσης, με την βοήθεια δηλαδή την ενέργειας του ηλίου και χρησιμοποιώντας απλά ανόργανα υλικά, όπως νερό, διοξείδιο του άνθρακα και νιτρικά άλατα, όπως συμβαίνει στα φυτά. Αντί αυτού, συλλέγουν την τροφή τους από οργανικά υλικά που βρίσκονται σε νεκρούς ή ζωντανούς ιστούς των φυτών και των ζώων. Εκείνοι που λαμβάνουν την τροφή τους από νεκρή οργανική ύλη καλούνται σαπροφυτικοί, ενώ εκείνοι που απορροφούν θρεπτικές ουσίες από ζωντανούς οργανισμούς όπως φυτά, ζώα ακόμα και από άλλους μύκητες καλούνται παρασιτικοί. Επιπλέον, ορισμένοι μύκητες δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά καθώς και με ρίζες δέντρων. Η συμβιωτική αυτή σχέση είναι σημαντική για τον μύκητα αλλά και για το φυτό, λόγω του ότι ο μύκητας επιτρέπει στο φυτό να προσλαμβάνει θρεπτικές ουσίες τις οποίες δεν θα μπορούσε να προσλάβει χωρίς την παρουσία του και το φυτό παρέχει θρεπτικές ουσίες στον μύκητα. Αυτοί αναφέρονται ως συμβιωτικοί μύκητες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η συμβιωτική σχέση είναι τόσο σημαντική όπου αν υπήρχε απώλεια αυτής το φυτό δεν θα μπορούσε να επιβιώσει (Chang & Milles, 2004).

1.1.2 Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων

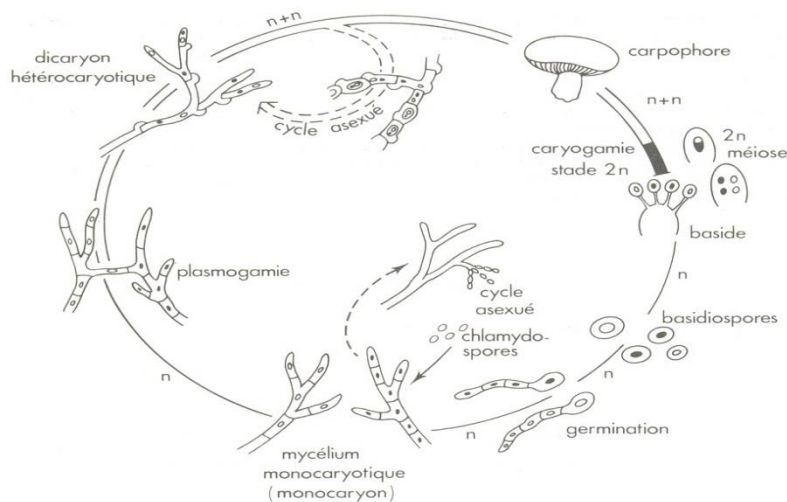
Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων παρουσιάζει πολλές παραλλαγές. Παρακάτω περιγράφεται εκείνος ενός τυπικού βασιδιομύκητα της τάξης των *Agaricales* (Delmas, 1989).

Ως σημείο εκκίνησης του βιολογικού κύκλου θεωρείται το βασιδιοσπόριο το οποίο είναι μονοκύτταρο και απλοειδές (η χρωμοσώματα). Το βασιδιοσπόριο βλασταίνοντας στη φύση δίνει γένεση σε ένα μυκήλιο απλοειδές (σε κάθε “κύτταρο” των υφών υπάρχει ένας απλοειδής πυρήνας και για αυτό ονομάζεται και μονοκάρυο μυκήλιο). Το μυκήλιο αυτό είναι άγονο (δεν σχηματίζει μανιτάρια), έχει περιορισμένη διάρκεια ζωής στη φύση και σύντομα εκφυλίζεται και πεθαίνει. Αν όμως έλθει σε επαφή με ένα άλλο μονοκάρυο μυκήλιο αντίθετου φύλου του ίδιου μύκητα (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 φύλου και για αυτό το μυκήλιο ονομάζεται δικάρυο. Δικαρυώση ενός μονοκαρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ειδικά μικρά σπόρια από μονοκάρυο αντίθετου φύλου τα οποία ονομάζονται σπερμάτια. Το δικάρυο μυκήλιο είναι αυτό που σχηματίζει μανιτάρια και θεωρητικά είναι αθάνατο αφού 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 που γεφυρώνουν τα γειτονικά “κύτταρα” και για αυτό ονομάζονται κρίκοι. Οι κρίκοι σχηματίζονται ταυτόχρονα με το εγκάρσιο διάφραγμα και σχετίζονται με τη συζυγή διαίρεση του ζεύγους των πυρήνων.

Στην κατάλληλη για κάθε είδος βασιδιομύκητα εποχή, το δικάρυο μυκήλιο αρχίζει σε κάποια σημεία του να σχηματίζει από ψευδοϊστό τις καταβολές (αρχέγονα) των βασιδιοκαρπίων που έχουν μέγεθος κεφαλής καρφίτσας. Οι καταβολές αυτές μεγαλώνουν σε μέγεθος και ταυτόχρονα διαφοροποιούνται σχηματίζοντας τα διάφορα τμήματα του βασιδιοκαρπίου. Ένα πλήρως αναπτυγμένο τυπικό καρπόσωμα των μυκήτων της τάξης των *Agaricales* αποτελείται από τον

πίλο (καπέλο) και το στύπο (πόδι). Στο κάτω μέρος του πύλου, τοποθετημένα κατακόρυφα και ακτινοειδώς γύρω από το στύπο, υπάρχουν τα βασίδια είναι κύτταρα ροπαλοειδή ή κυλινδρικά. Ολόκληρο το βασιδιοκάρπιο (μανιτάρι) είναι κατασκευασμένο από δικάρυες υφές (ψευδοϊστό).

Μέσα στο βασίδιο οι δύο πυρήνες αντίθετου φύλου 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 φύλου. 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 στην άκρη κάθε στηρίγματος ένα απλοειδές κύτταρο που είναι το βασιοσπόριο. Κάθε βασίδιο σχηματίζει 4 βασιδιοσπόρια απλοειδή και ανά δύο αντίθετου φύλου. Όταν ωριμάσουν τα βασιδιοσπόρια εκτινάσσονται από τα στηρίγματά τους, διασπείρονται, και όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα βλασταίνουν δίνοντας μονοκάρυα απλοειδή μυκήλια. Τέλος, σε πολλά είδη μανιταριών μεταξύ των βασιδίων υπάρχουν χαρακτηριστικά άγονα στοιχεία τα οποία ονομάζονται κυστίδια και των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι πολύ χρήσιμα στην ταξινόμηση.



Σχήμα 1.1.2 Ο βιολογικός κύκλος των *Βασιδιομυκήτων* (Delmas, 1989).

1.1.3 Διατροφικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών

Τα καλλιεργούμενα καθώς και τα άγρια μανιτάρια αποτελούν τροφή για τον άνθρωπο εδώ και αιώνες, λόγω της ιδιαίτερης γεύσης, υφής και αρώματος που διαθέτουν καθώς και λόγω της μεγάλης διατροφικής και φαρμακευτικής τους αξίας. Τα μανιτάρια είναι τροφή χαμηλή σε θερμίδες και λίπος αλλά πλούσια σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και διαιτητικές ίνες. Επίσης περιέχουν και άλλες ουσίες υψηλής διατροφικής αξίας όπως βιταμίνες και μέταλλα. Λόγω των χαρακτηριστικών που προαναφέρθηκαν τα μανιτάρια αποτελούν πολύ θρεπτική τροφή και η διατροφική τους αξία έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Cheung, 2010; Kalač, 2016; Chang & Miles, 2004).

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά στην περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη, σε γενικές γραμμές το ποσοστό αυτής κυμάνετε μεταξύ 15% και 35% σε βάση ξηρού βάρους, σε σύγκριση με 7,3% στο ρύζι, 13,2% στο σιτάρι, 39,1% στο φασόλι σόγιας και 25,2% στο γάλα. Συνεπώς το ποσοστό καθαρής πρωτεΐνης στα μανιτάρια μπορεί να είναι χαμηλότερο σε σχέση με το κρέας, είναι όμως υψηλότερο σε σχέση με ένα πολύ μεγάλο αριθμό τροφίμων συμπεριλαμβανομένου και του γάλακτος, το οποίο είναι ένα ζωικό παράγωγο. Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες των μανιταριών περιέχουν και τα εννέα απαραίτητα για την διατροφή του ανθρώπου αμινοξέα (ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη, φαινιλαλανίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, βαλίνη), επίσης έχουν συνήθως περιορισμένη ποσότητα θειούχων αμινοξέων όπως η μεθειονίνη και η κυστίνη, ενώ περιέχουν σημαντική ποσότητα αμινοξέων σε ελεύθερη μορφή (Cheung, 2010). Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος του μανιταριού καθώς και το στάδιο και τις συνθήκες ανάπτυξης. Οι Vetter & Rimóczi (1993) ανέφεραν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη, σε καλλιεργούμενο *Pleurotus ostreatus* με πύλο διαμέτρου 5-8 cm. Σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης, το περιεχόμενο της ακατέργαστης πρωτεΐνης ήταν 36,4 % και 11,8 % στο πύλο και στον στύπο αντίστοιχα. Στην συνέχεια της ανάπτυξης, το ποσοστό της ακατέργαστης πρωτεΐνης μειώθηκε (Kalač, 2016).

Τα εδώδιμα μανιτάρια είναι γενικά φτωχά σε λίπος. Η περιεκτικότητα σε λίπος σε διάφορα είδη μανιταριών κυμαίνεται μεταξύ 1,1% και 8,3% σε βάση ξηρού βάρους, με μέση περιεκτικότητα 4,0%. Οι λιπαρές ύλες των μανιταριών περιλαμβάνουν όλες τις κύριες ομάδες λιπαρών

συστατικών που συναντώνται στα τρόφιμα, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και τρίγλυκερίδια, στερόλες, εστέρες στερολών και φωσφολιπίδια. Επίσης το μεγαλύτερο ποσοστό του συνόλου των λιπαρών οξέων που βρίσκονται στα μανιτάρια είναι ακόρεστα λιπαρά οξέα. Το μεγάλο αυτό ποσοστό οφείλεται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι βασικά στην διατροφή σε σχέση με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία απαντώνται σε μεγάλα ποσοστά στα ζωικά λίπη και μπορεί να είναι επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Συνεπώς η υψηλή περιεκτικότητα των μανιταριών σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και το υψηλό ποσοστό λινελαϊκού οξέως είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες ώστε να θεωρηθούν τα μανιτάρια υγιεινό τρόφιμο με μεγάλη θρεπτική αξία. (Chang & Milles, 2004; Cheung, 2013).

Η συνολική περιεκτικότητα των μανιταριών σε υδατάνθρακες εξαρτάται από το είδος του μανιταριού και κυμαίνεται μεταξύ 35% και 70% σε βάση ξηρού βάρους. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι μικρή και κυμαίνεται μεταξύ 5g και 25g ανά 100g ξηρής ουσίας, με κύρια συναντώμενα σάκχαρα την μανιτόλη και την τρεχαλόζη και σε μικρότερες συγκεντρώσεις την γλυκόζη, την φρουκτόζη και την αραβινόζη. Η μανιτόλη παίζει σημαντικό ρόλο καθώς είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του όγκου και της σταθερότητας του καρποσώματος. Οι κύριοι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα μανιτάρια είναι το γλυκογόνο, ένας αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης, σε περιεκτικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 5% και 15% σε βάση ξηρού βάρους και η χιτίνη, ένας μη υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης, ο οποίος αποτελεί το 80-90% του ξηρού βάρους των κυτταρικών τοιχωμάτων (Kalač, 2016). Επίσης τα μανιτάρια αποτελούν μια καλή πηγή πρόσληψης διαιτητικών ινών, λόγω του ότι τα κυτταρικά τους τοιχώματα περιέχουν ινώδη συστατικά που περιλαμβάνουν χιτίνη (ευθείας αλυσίδας β - (1 \rightarrow 4) συνδεδεμένο πολυμερές της N-15 ακετυλο- γλυκοζαμίνης) και πολυσακχαρίτες όπως β - D- (1 \rightarrow 3) γλυκάνες και μαννάνες. Τα συστατικά αυτά του κυτταρικού τοιχώματος είναι Μη Εύπεπτοι Υδατάνθρακες (non-digestible carbohydrates – NDCs) οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στα ανθρώπινα ένζυμα και γι' αυτό το λόγο μπορούν να θεωρηθούν διαιτητικές ίνες. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην περιεκτικότητα διαιτητικών ινών σε διαφορετικά είδη μανιταριών. Οι διαιτητικές ίνες των μανιταριών είναι κυρίως μη υδατοδιαλυτές (water-insoluble fiber – IDF), με την χιτίνη και τις β -γλυκάνες να είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές, ενώ τα ποσοστά των υδατοδιαλυτών διαιτητικών ινών (water-soluble fiber – SDF) είναι συνήθως μικρότερα από 10% (Cheung, 2013).

Επίσης πλούσια είναι τα μανιτάρια και σε μεταλλικά στοιχεία και ιχνοστοιχεία όπως φώσφορο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, χαλκό και ψευδάργυρο (Ouzouni κ.α., 2007) καθώς και σε βιταμίνες όπως ριβοφλαβίνη (βιταμίνη Β2), νιασίνη (βιταμίνη Β3) και φολικό οξύ (βιταμίνη Β9). Επιπλέον παρότι στα καλλιεργούμενα μανιτάρια δεν υπάρχει παρουσία βιταμίνης D, παρατηρείτε υψηλή συγκέντρωση (400 – 600mg/100g Ξ.Ο.), εργοστερόλης, προβιταμίνη της εργοκαλσιφερόλης. Η εργοκαλσιφερόλη (προβιταμίνη D) μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη D με την παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας και θερμότητας (Mattila κ.α., 2002). Τέλος το ποσοστό υγρασίας των φρέσκων μανιταριών κυμαίνεται στο 70–95% αναλόγως την περίοδο συγκομιδής και τις συνθήκες ανάπτυξης, ενώ στα αποξηραμένα μανιτάρια βρίσκεται στο 10-13% (Cheung, 2013).

1.1.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών

Πέρα από την μεγάλη διατροφική τους αξία τα μανιτάρια διαθέτουν και σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες. Τουλάχιστον σε 651 είδη που αντιπροσωπεύουν 182 γένη βασιδιομυκήτων έχουν βρεθεί βιοδραστικές ουσίες με φαρμακευτικές ιδιότητες, οι οποίες απομονώνονται από το καρπόσωμα, το μυκήλιο και το υγρό θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Wasser και Weis, 1999; Lull κ.α., 2005). Οι ουσίες που απομονώνονται χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων με την μορφή φαρμακευτικών σκευασμάτων και συμπληρωμάτων διατροφής. Οι βασικότερες φαρμακευτικές δράσεις των μανιταριών είναι οι εξής: ανοσοδιεγερτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτική, καρδιακή τόνωση, μείωση χοληστερόλης, μείωση σακχάρου στο αίμα, μείωση αρτηριακής πίεσης καθώς και δράση κατά των ιών, μυκήτων, πρωτόζωων και βακτηρίων. Οι παραπάνω δράσεις οφείλονται σε κάποια χημικά συστατικά που εμπεριέχονται σε πολλά καλλιεργούμενα μανιτάρια, όπως είναι κάποιες διαιτητικές ίνες και συγκεκριμένα η χιτίνη (δομικός πολυσακχαρίτης των κυτταρικών τοιχωμάτων), τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και οι πολυσακχαρίτες β-γλυκάνες. Συγκεκριμένα αντικαρκινική δράση έχει βρεθεί στους πολυσακχαρίτες (β-γλυκάνες) των καρποσωμάτων στο μανιτάρι *Flammulina velutipes*, επίσης η γλυκοπρωτεΐνη προφλαμίνη διαθέτει ισχυρή αντικαρκινική δράση ενάντια στο καρκίνωμα Sarcoma 180, στον καρκίνο του πνεύμονα Lewis και στο μελάνωμα B-16 (Ikekawa, 1995). Σε πολλά είδη *Pleurotus*, οι πολυσακχαρίτες των καρποσωμάτων και κυρίως οι β-γλυκάνες έχει βρεθεί ότι διαθέτουν αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντιβακτηριδιακές δράσεις (Schillaci, 2013; Patel κ.α.,

2012; Breene, 1990). Επίσης ο πολυσακχαρίτης λεντινάνη, ο οποίος πείρε το όνομα του από το γένος *Lentinus* στο οποίο ανήκει το μανιτάρι *Lentinula edodes*, έχει βρεθεί ότι διαθέτει πολύ σημαντικές αντικές και αντικαρκινικές δράσεις, συμβάλλοντας έντονα στην αναστολή ανάπτυξης καρκινωμάτων καθώς είναι ιδιαίτερα δραστήσιος ενάντια στο καρκίνωμα Sarcoma 180 αλλά και σε άλλους τύπους καρκινώματος (Breene, 1990; Mizuno, 1995). Τέλος το μανιτάρι *Agrocybe aegerita* έχει βρεθεί ότι περιέχει βιοδραστικούς μεταβολίτες όπως πολυσακχαρίτες με υπογλυκαιμική δράση (Diyabalanage κ.α., 2008), τοκοφερόλες και φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση (Tsai κ.α., 2007) καθώς και το πεπτίδιο agrocycin το οποίο διαθέτει αντιμυκητιακή δράση (Ngai κ.α., 2005).

Πίνακας 1.1: Φαρμακευτικές δράσεις βασισιομυκήτων (Wasser και Weis, 1999)


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

* Αναγνωρισμένο εμπορικό προϊόν μανιταριού (συμπλήρωμα διατροφής)

x - Μη αναγνωρισμένο εμπορικό προϊόν μανιταριού

1.2 Μελετώμενα Είδη Μακρομυκήτων

1.2.1 Ο μύκητας *Agrocybe aegerita*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ: <i>Μύκητες</i>	
ΦΥΛΟ: <i>Basidiomycota</i>	
ΚΛΑΣΗ: <i>Agaricomycetes</i>	
ΤΑΞΗ: <i>Agaricales</i>	
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: <i>Strophariaceae</i>	
ΓΕΝΟΣ: <i>Agrocybe</i>	
ΕΙΔΟΣ: <i>A. Aegerita</i>	

Εικόνα 1.2.1 Καρποφορία τουμανιταριού *Agrocybe aegerita*

Το μανιτάρι *Agrocybe aegerita* (Brig) Singer είναι ένα σαπροφυτικό λιγνοκυτταρινούχο μανιτάρι. Το όνομα του προέρχεται από την ελληνική λέξη «αιγείτης» που φανερώνει ότι το μανιτάρι αυτό ευδοκμεί και αναπτύσσεται πάνω σε μαύρη λεύκα (Delmas, 1989).

Μορφολογία

Το μανιτάρι *Agrocybe aegerita* έχει ημισφαιρικό πύλο (γενικά κυρτό, αμβλύ, με διάμετρο 5 – 14 cm), ο οποίος στο νεαρό στάδιο έχει χρώμα ώχρας προς τις άκρες και καφέ ή απαλό κοκκινωπό προς το κέντρο. Μερικές φορές το κεντρικό μέρος αποκτά καστανόμαυρο χρωματισμό. Με την πάροδο του χρόνου σχηματίζονται χρώματα σε απαλότερους τόνους μέχρι και άσπρο. Αρχικά η επιφάνεια είναι λεία και μεταξένια αλλά αργότερα φιλοραγίζει και ρυτιδώνεται. Ο στύπος είναι συμπαγής και φιλόλιγνος, αρχικά με λευκό χρωματισμό, αργότερα ωχρό και με το χρόνο γίνεται καστανός. Κατά την ωρίμανση του εμφανίζει στο ανώτερο μέρος του έναν δακτύλιο, ο οποίος αποτελεί το υπόλοιπο του καλύμματος που καλύπτει τα ελάσματα. Τα ελάσματα είναι λεπτά, πεπλατυσμένα, σφιγμένα, τεντωμένα, συμφυόμενα με χρωματισμό παρόμοιο με εκείνον των σπορίων (από λευκό γίνεται γκριζωπό, ωχρό και καταλήγει στο καφέ ανοιχτό). Τέλος, η σάρκα

του πύλου είναι τρυφερή, αναδύει ένα ευχάριστο άρωμα και μία γεύση φουντουκιού (Stamets, 2000).

Συνθήκες ανάπτυξης

Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης του μυκηλίου βρίσκονται στους 20 – 22 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο κίνδυνος ανάπτυξης ανταγωνιστικών μικροοργανισμών αυξάνεται. Η καρποφορία αναπτύσσεται φυσιολογικά μέχρι ενός ποσοστού CO₂ (περίπου 0,25%). Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις CO₂ αυξάνουν την ποσότητα των παραγόμενων μανιταριών, αλλά η ποιότητα τους είναι κατώτερη (Stamets, 2000). Ιδανικό pH υποστρώματος για την ανάπτυξη του μύκητα είναι 5,7 – 6,0, αν και σύμφωνα με τον Zadrazil (1994) ο σχηματισμός των καρποφοριών δεν επηρεάζεται από το pH (έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη καρποφορίας σε pH που κυμαίνεται από 3,5 έως 7,0).


Καλλιέργεια

Η παραδοσιακή καλλιέργεια του μανιταριού *A. aegerita* γίνεται στο ύπαιθρο σε ξύλο φυλλωδών (λεύκας). Τον Μάρτιο κόβονται οι λεύκες, πριν το άνοιγμα των μπουμπουκιών τους. Τον Μάιο οι κορμοί τεμαχίζονται σε κομμάτια 20 – 25 cm. Στη συνέχεια ανοίγεται λάκκος, τα κομμάτια λεύκας εμβολιάζονται με την καθαρή καλλιέργεια και τοποθετούνται σε ομάδες 4 - 5 κομματιών το ένα πάνω στο άλλο. Η καθαρή καλλιέργεια εμβολιάζεται μεταξύ 2 τεμαχίων κάθε φορά. Έπειτα αυτά σκεπάζονται με ένα λεπτό στρώμα από ξύλο και όλα μαζί καλύπτονται με ένα πλαστικό φιλμ και μετά με χώμα. Ο συγκεκριμένος λάκκος ονομάζεται λάκκος «επώασης». Αυτή η φάση διαρκεί 3 μήνες (ή και περισσότερο). Το Σεπτέμβριο οι κορμοί τοποθετούνται κάθετα μέσα στο έδαφος. Ένα ελαφρύ στρώμα εδάφους τους καλύπτει και ποτίζονται με πολύ νερό. Είναι καλύτερο η καλλιέργεια να γίνει υπό σκιά και να είναι προστατευμένη από τον άνεμο, κάτω από φυλλώδη δέντρα, σε έδαφος σχετικά υγρό και πλούσιο σε οργανική ουσία. Οι καρποφορίες σχηματίζονται πάνω στον κορμό, στην επιφάνεια του εδάφους, όταν η θερμοκρασία είναι περίπου 20 °C σε υγρή περίοδο. Η συγκομιδή γίνεται από το φθινόπωρο ως την άνοιξη (Stamets, 2000).

Η εντατική καλλιέργεια του μανιταριού *A. aegerita* αποτελεί σήμερα αντικείμενο μελέτης, καθώς ο μύκητας παρουσιάζει αργή ανάπτυξη και ευαισθησία στους ανταγωνιστές, γεγονός που προϋποθέτει αποστείρωση των υποστρωμάτων. Η καλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί σε

ελεγχόμενες συνθήκες μαζικά σε κιβώτια ή πλαστικές σακούλες και κυρίως σε αποστειρωμένα κατεργασμένα υποστρώματα. Συνήθως καλλιεργείται σε αζύμωτο ή ελάχιστα ζυμωμένο υπόστρωμα από εμπλουτισμένα πριονίδια και ροκανίδια ιτιάς, λεύκας, σφενδάμου κ.α. που τεμαχίζονται, διαβρέχονται, αποστειρώνονται (στους 121 °C, για 2 ώρες) και εμβολιάζονται με τον μύκητα. Ακολουθεί επώαση για τρεις εβδομάδες σε θερμοκρασία 23 – 27 °C, με υψηλή συγκέντρωση CO₂ και σχετική υγρασία 95 – 98%. Οι καρποφορίες εμφανίζονται μετά 1 - 2 εβδομάδες στις ακόλουθες συνθήκες: καλός αερισμός (4 - 8 αλλαγές αέρα/ ώρα, CO₂ < 2.000 ppm), φωτισμός 300 - 700 lux/12 ώρες, θερμοκρασία 10 – 16 °C και σχετική υγρασία 90 – 95%. Συλλέγονται δύο κύματα καρποφοριών με μεσοδιάστημα 10 - 14 ημέρες (Stamets, 2000).

1.2.2 Ο μύκητας *Flammulina velutipes*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ: <i>Μύκητες</i>	
ΦΥΛΟ: <i>Basidiomycota</i>	
ΚΛΑΣΗ: <i>Agaricomycetes</i>	
ΤΑΞΗ: <i>Agaricales</i>	
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: <i>Tricholomataceae</i>	
ΓΕΝΟΣ: <i>Pseudohiatulea</i>	
ΕΙΔΟΣ: <i>F. velutipes</i>	

Εικόνα 1.2.2 Καρποφορία του μανιταριού *Flammulina velutipes*

Το συγκεκριμένο μανιτάρι αναπτύσσεται σε περιοχές με εύκρατο κλίμα λόγω του ότι έχει μικρές απαιτήσεις σε θερμοκρασία κατά την καρποφορία του. Καλλιεργείται κυρίως σε χώρες τις Ασίας και ειδικά στην Κίνα, στην Ιαπωνία και στην Νότια Κορέα. Παρόλο που έχουν απαιτήσεις σε χαμηλή θερμοκρασία για να καρποφορήσουν, τα μανιτάρια αυτά μπορούν να καλλιεργηθούν καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας.

Καταναλώνεται ευρύτατα λόγω της γεύσης του, της υφής του και της εμφάνισής του και γίνεται όλο και πιο διαδεδομένο στις χώρες της Δύσης (Chang & Milles, 2004).

Μορφολογία

Όσον αφορά στην μορφολογία του, ο πύλος έχει μέγεθος 2-10 cm όταν αναπτύσσεται φυσικά ενώ κάτω από καλλιεργούμενες συνθήκες είναι μικρότερος με μέγεθος 2-3 cm. Αρχικά ο πύλος έχει ημισφαιρικό σχήμα και στην συνέχεια ανοίγει και γίνεται επίπεδος. Η επιφάνεια του έχει πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα με μια κίτρινη χροιά στις άκρες του και πιο σκούρο χρώμα στο κέντρο του. Τα ελάσματα έχουν χρώμα λευκό ή απαλό κίτρινο. Ο στύπος έχει μέγεθος 5-10 x 0,4-0,8 cm όταν αναπτύσσεται στη φύση και 2-9 x 0,2-0,8 cm όταν καλλιεργείται τεχνητά. Τα βασιδιοσπόρια είναι λευκά, ελλειπτικά, επίπεδα, μεγέθους 7-10 x 3-5 μm. Γενικά το εύρος του μεγέθους και του χρώματος των καρποσωμάτων ποικίλει καθώς εξαρτάτε σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξης. (Chang & Milles, 2004).

Συνθήκες ανάπτυξης

Κατά την μυκηλιακή ανάπτυξη, οι συνθήκες που πρέπει να επικρατούν είναι παρόμοιες με εκείνες των περισσοτέρων βασιδιομυκήτων που παρασιτούν σε ξύλα. Θα πρέπει να υπάρχει πηγή αζώτου (αμινοξέα ή αμμωνιακά ιόντα), πηγή άνθρακα (μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες), μεταλλικά άλατα, ιχνοστοιχεία και θειαμίνη. Το pH ανάπτυξης των μυκηλίων κυμαίνεται από 4,5 έως 8,6, η θερμοκρασία από 0 – 34 °C με βέλτιστη τους 25 °C και η υγρασία του υποστρώματος από 60 – 65%. Η ανάπτυξη του μυκηλίου στους 0 °C είναι αργή αλλά σημαντική. Είναι ενδιαφέρον ότι το μυκήλιο δεν θανατώνεται σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία αλλά θανατώνεται μετά από έκθεση στους 34 °C για σύντομο χρονικό διάστημα. (Chang & Milles, 2004).

Κατά την ανάπτυξη του καρποσώματος οι θρεπτικές απαιτήσεις είναι ουσιαστικά ίδιες με αυτές του μυκηλίου. Η θερμοκρασία για τον σχηματισμό των καταβολών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10-20 °C, με βέλτιστη τους 15 °C. Σε θερμοκρασίες εκτός αυτών των ορίων απαιτητέ περισσότερος χρόνος για την ανάπτυξη του καρποσώματος. Σε αντίθεση με άλλα μανιτάρια, το μανιτάρι *F. velutipes* χρειάζεται σκοτάδι για να σχηματίσει της καταβολές και τον στύπο του ενώ για τον σχηματισμό και την επέκταση του πύλου χρειάζεται φως. Επίσης όταν αυξάνεται η

συγκέντρωση του CO₂, όπως συμβαίνει σε καλλιέργειες μανιταριών που γίνονται σε κλειστό χώρο, μειώνεται η ανάπτυξη του πύλου. Συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση του CO₂ είναι 5% τότε ο πύλος δεν αναπτύσσεται σχεδόν καθόλου. Τέλος, κατά την ανάπτυξη του καρποσώματος επέρχεται περιστροφή του στύπου. (Chang & Milles, 2004).

Καλλιέργεια

Παραδοσιακά η καλλιέργεια του μανιταριού *F. velutipes* γινόταν σε κορμούς δέντρων ενώ τώρα η καλλιέργεια του γίνεται σε πριονίδι. Το σύνθηδες υπόστρωμα που χρησιμοποιείτε για την καλλιέργεια του αποτελείται από πριονίδι (80%) και πίτουρο ρυζιού (20%). Το πίτουρο ρυζιού παρέχει βιταμίνες όπως θειαμίνη η οποία είναι γνωστό ότι συμβάλει θετικά στην ανάπτυξη του μύκητα. Τα συστατικά του θρεπτικού μέσου αναμιγνύονται καλά και στην συνέχεια προστίθεται νερό έως ότου το ποσοστό υγρασίας φτάσει το 58-60%, έπειτα το μέσο αναμιγνύεται πάλι. Πλαστικά μπουκάλια των 800 ml γεμίζονται μηχανικά με περίπου 540 g θρεπτικό μέσο. Τα μπουκάλια στη συνέχεια πωματίζονται και αποστειρώνονται σε κλίβανο. Η αποστείρωση πραγματοποιείται σε συνθήκες χαμηλής πίεσης για 4 ώρες στους 95 °C ή σε συνθήκες υψηλής πίεσης για 1 ώρα στους 120 °C. Μετά το πέρας της αποστείρωσης τα μπουκάλια ψήχονται στους 20 °C και εμβολιάζονται με τον μύκητα. Στη συνέχεια τα εμβολιασμένα μπουκάλια τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 18-20 °C με σκοπό την ανάπτυξη του μυκηλίου. Μετά από 20 με 25 ημέρες, όταν το μυκήλιο έχει καλύψει το 90% του μπουκαλιού, αφαιρείτε το πώμα και η επιφάνεια του μέσου ξύνεται ομαλά με σκοπό να επιτευχθεί ομοιόμορφη καρποφορία. Τα μπουκάλια στη συνέχεια τοποθετούνται σε συνθήκες σκότους, θερμοκρασίας 10-12 °C και υγρασίας 80-85% με σκοπό ευνοηθεί ο σχηματισμός των καταβολών. Οι καταβολές σχηματίζονται μετά το πέρας 10-14 ημερών. Η ανάπτυξη του καρποσώματος πραγματοποιείται πολύ γρήγορα στους 10-12 °C όμως ο στύπος σε αυτό το στάδιο είναι λεπτός και αδύναμος. Γι' αυτό το λόγο η θερμοκρασία μειώνεται στον 3-5 °C. Σε αυτή την θερμοκρασία και με την παρουσία ρεύματος αέρα, τα καρποσώματα που σχηματίζονται είναι σκληρά, λευκά και πιο ξηρά. Η παραπάνω μεταχείριση συνεχίζεται για 5-7 ημέρες, μέχρι την πρώτη εμφάνιση του πύλου και έως ότου ο στύπος αποκτήσει περίπου 2 cm ύψος. Σε αυτή την φάση η θερμοκρασία αυξάνεται στους 5-8 °C και η υγρασία ρυθμίζεται στο 75-80% (συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του καρποσώματος). Όταν ο στύπος φτάσει τα 2-3 cm ύψος ξεκινώντας από το στόμιο του μπουκαλιού, ένα παχύ χάρτινο ή πλαστικό φύλο με

κωνικό ή κυλινδρικό σχήμα τοποθετείτε γύρω από το στόμιο του μπουκαλιού με σκοπό την στήριξη των καρποσωμάτων όσο αυτά αναπτύσσονται. Το χάρτινο ή πλαστικό στήριγμα αφαιρείτε όταν τα καρποσώματα έχουν 13-14 cm ύψος. Στη συνέχεια τα καρποσώματα αποκόπτονται από μπουκάλι και πακετάρονται. Μπορεί ακόμα να συλλεχθεί και μια δεύτερη καρποφορία με χαμηλότερη όμως απόδοση και ποιότητα. Η συνολική απόδοση της συγκεκριμένης τεχνικής κυμαίνεται μεταξύ 160-220 g ανά μπουκάλι (Chang & Milles, 2004).

1.2.3 Είδη του γένους *Pleurotus* spp.

ΒΑΣΙΛΕΙΟ: <i>Μύκητες</i>	
ΦΥΛΟ: <i>Basidiomycota</i>	
ΚΛΑΣΗ : <i>Agaricomycetes</i>	
ΤΑΞΗ : <i>Agaricales</i>	
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: <i>Pleurotaceae</i>	
ΓΕΝΟΣ : <i>Pleurotus</i>	

Εικόνα 1.2.3 Καρποφορία του μανιταριού *Pleurotus*.

Το μανιτάρι *Pleurotus*, το οποίο αποκαλείτε συχνά και ως οστρακοειδές μανιτάρι λόγω του ότι ο πύλος του έχει σχήμα που ομοιάζει με κοχύλι, καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια ως τροφή λόγω της μεγάλης διατροφικής καθώς και φαρμακευτικής του αξίας και γενικά παίζει πολύ σημαντικό ρόλο ως εδώδιμο εμπορικό μανιτάρι. Αναπτύσσεται φυσικά, κυρίως σε εύκρατες καθώς και υποτροπικές περιοχές κατά τους πιο κρύους μήνες, πάνω σε δέντρα υπό σήψη όπως ο δρυς, η φτελιά, η φιλύρα, η λεύκα, η βελανιδιά και το πουρνάρι. Διαθέτει ωραίο άρωμα και νόστιμη γεύση και καταναλώνεται ευρέως ως τρόφιμο σε όλο τον κόσμο λόγω της εύκολης και οικονομικής καλλιέργειας και ανάπτυξης του (Chang & Milles, 2004).

Μορφολογία

Όσον αφορά την μορφολογία τα μανιτάρια *Pleurotus* είναι μαλακά με λεία υφή και συναντώνται σε πολλά χρώματα όπως σκούρο μπλε, ωχρό έως σκούρο καφέ, κίτρινο και ροζ. Η ένταση του χρώματος επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το φως και η θερμοκρασία. Γενικά το χρώμα είναι πιο σκούρο σε συνθήκες υψηλού φωτισμού και χαμηλής θερμοκρασίας και πιο ανοιχτόχρωμο σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και υψηλής θερμοκρασίας. Ο πύλος είναι αρχικά κυρτός, στη συνέχεια οστρακόμορφος έως δισκόμορφος και τελικά επίπεδος ή κοίλος έως χωνοειδής, με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 5 – 30 cm, γενικά παράγονται μικρότερα σε μέγεθος μανιτάρια όταν καλλιεργούνται σε κορμούς δέντρων σε σχέση με αυτά που καλλιεργούνται σε αγρό-βιομηχανικά απόβλητα. Ο στύπος είναι συνήθως οριζόντιος, έκκεντρος ή πλευρικός, με λευκό έως ωχρό χρωματισμό. Τα ελάσματα του είναι μακρόστενα και λεία, λευκού έως γκριζου-καφέ χρώματος (Chang & Milles, 2004; Stamets, 2000).

Συνθήκες ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του μυκηλίου και του καρποσώματος του μανιταριού εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία, τον φωτισμό, τη συγκέντρωση CO₂ στην ατμόσφαιρα και το pH. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μυκηλίου είναι 25-28 °C ενώ για το καρπόσωμα εξαρτάτε από το είδος του μανιταριού και κυμαίνεται μεταξύ 10 και 28 °C, οι άριστες τιμές του pH κυμαίνονται μεταξύ 5,5 και 6,5. Το μυκήλιο του *Pleurotus* εμφανίζει μεγάλη ανοχή στο CO₂ καθώς αναπτύσσεται κανονικά ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ (15-20%), όταν όμως η συγκέντρωση του CO₂ αυξηθεί στο 30% τότε η μυκηλιακή ανάπτυξη μειώνεται σημαντικά. Παρόλη την μεγάλη ανοχή του μυκηλίου στο CO₂, οι υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ δεν ευνοούν την ανάπτυξη του καρποσώματος. Όταν η συγκέντρωση του CO₂ στο θάλαμο ή στους σάκους ανάπτυξης των μανιταριών είναι υψηλότερη από 600 ppm (0,06%), τότε ο στύπος επιμηκύνεται και ο πύλος παύει να αναπτύσσεται. Οι απαιτήσεις σε φωτισμό διαφέρουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης. Κατά την μυκηλιακή αύξηση δεν απαιτητέ φωτισμός καθώς το μυκήλιο του μανιταριού αναπτύσσεται καλύτερα υπό συνθήκες σκότους ενώ κατά τα στάδια σχηματισμού των καταβολών και ανάπτυξης του καρποσώματος η παρουσία φωτός είναι απαραίτητη. Συγκεκριμένα για τον σχηματισμό των καταβολών απαιτείτε φωτισμός με ένταση 200 lux για

πάνω από 12 ώρες και για την ανάπτυξη των καρποφοριών απαιτείτε φωτισμός με ένταση η οποία κυμαίνεται μεταξύ 50 και 500 lux (Chang & Milles, 2004; Stamets, 2000).

Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια των εδώδιμων μυκήτων του γένους *Pleurotus* αρχικά γινόταν σε κούτσουρα ενώ σήμερα πραγματοποιείται συνήθως μέσα σε κλειστούς χώρους για τον καλύτερο έλεγχο των συνθηκών παραγωγής.

Γενικά υπάρχουν πολλοί τρόποι καλλιέργειας των μανιταριών *Pleurotus*. Ορισμένα είδη καλλιεργούνται σε κομμένους κορμούς δέντρων (κούτσουρα), άλλα είδη σε θρεπτικά μέσα από γεωργικά υπολείμματα, μέσα σε πλαστικές σακούλες ή βάζα, ενώ άλλα είδη σε θρεπτικά υποστρώματα τα οποία τοποθετούνται στην επιφάνεια ειδικών πλαισίων ή μέσα σε κιβώτια διαφόρων μεγεθών. Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των μανιταριών *Pleurotus* αποτελούνται κυρίως από λιγνοκυτταρινούχα υλικά τα οποία προέρχονται από υπολείμματα της γεωργικής παραγωγής π.χ. άχυρο σιτηρών (σιταριού και κριθαριού), σπάδικες καλαμποκιού, πριονίδια ξύλου, στελέχη βαμβακιού, πούλπα καφέ, λάσπη κατεργασμένων αποβλήτων κ.α. (Φιλιπούσης, 2007; Chang & Milles, 2004).

Η διαδικασία παραγωγής των μανιταριών *Pleurotus* σε εμπορική κλίμακα περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Φιλιπούσης, 2007):

1. Επεξεργασία πρώτων υλών – Παρασκευή υποστρώματος (4 ημέρες):

Πραγματοποιείται τεμαχισμός και διαβροχή του αχύρου, προσθήκη γύψου και πηγής αζώτου (τριφύλλι, σογιάλευρο κ.λ.π.), ανάμειξη και δημιουργία σωρού ζύμωσης ύψους 1,5-2,5 m, ακολουθεί αερόβια ζύμωση διάρκειας 2-3 ημερών με διαβροχή και 1-2 γυρίσματα και τέλος μεταφορά του υποστρώματος και γέμισμα του τούνελ παστερίωσης.

2. Παστερίωση υποστρώματος (4 ημέρες):

Αρχικά πραγματοποιείται ρύθμιση της εσωτερικής θερμοκρασίας στους 65 °C (μέσα σε 4-6 ώρες) με διοχέτευση υπέρθερμου ατμού έτσι ώστε να διατηρείτε και η υγρασία σε υψηλά επίπεδα για αποφυγή αφυδάτωσης του υποστρώματος, στη συνέχεια αρχίζει η μικροβιολογική δραστηριότητα που προκαλεί νέα αύξηση της θερμοκρασίας στους 68-72 °C (η θερμοκρασία

διατηρείται σταθερή για 10 ώρες). Ακολουθεί ωρίμανση του υποστρώματος σε ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού και θερμοκρασίας (50-55 °C, για 60 ώρες).

3. Εμβολιασμός σάκκων καλλιέργειας – Επώαση μυκηλίου (15 – 20 ημέρες)

Πραγματοποιείται εμβολιασμός του υποστρώματος με τον σπόρο του μανιταριού και ανάμειξη, στη συνέχεια γίνεται πλήρωση των πλαστικών σάκων καλλιέργειας με 15-20 κιλά εμβολιασμένου υποστρώματος και μεταφορά αυτών σε θάλαμο καλλιέργειας όπου στοιβάζονται στο πάτωμα ο ένας δίπλα στον άλλον. Ακολουθεί επώαση του μυκηλίου για 15-20 ημέρες κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας κομπόστας (25-27 °C), υψηλής σχετικής υγρασίας (90%), υψηλής συγκέντρωσης CO₂ (20-30 %) και συνθήκες σκότους.


4. Σχηματισμός καρποφοριών (4 – 7 ημέρες)

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται ο σχηματισμός των καταβολών κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας κομπόστας (12-17 °C) και σχετικής υγρασίας (92-96 %), επιπλέον γίνεται και εισαγωγή φρέσκου αέρα με σκοπό την μείωση του CO₂. Επίσης σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη και η παρουσία φωτός.

5. Ανάπτυξη καρποφοριών – συγκομιδή (5 – 8 ημέρες)

Πραγματοποιείται η ανάπτυξη των καρποφοριών (σε 5 – 8 ημέρες) κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας κομπόστας (16-19 °C) και σχετικής υγρασίας (85%) με επιπλέον φωτισμό και αερισμό. Η παραγωγή των μανιταριών γίνεται σε κύματα (συνήθως 3 – 4) κάθε 15 ημέρες με συνολική απόδοση 15-25% επί νωπού βάρους υποστρώματος. Η συγκομιδή κάθε κύματος διαρκεί 2 – 4 ημέρες και γίνεται με μαχαίρι, κόβεται ολόκληρη η καρποφορία μόλις τα μεγαλύτερα μανιτάρια της φτάσουν το σημείο ωρίμανσης. Μετά την συγκομιδή ακολουθεί διαλογή, συσκευασία και συντήρηση των μανιταριών σε ψυγείο (2-4 °C).

1.2.4 Ο μύκητας *Lentinula edodes*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ: <i>Μύκητες</i>	
ΦΥΛΟ: <i>Basidiomycota</i>	
ΚΛΑΣΗ : <i>Agaricomycetes</i>	
ΤΑΞΗ : <i>Agaricales</i>	
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: <i>Marasmiaceae</i>	
ΓΕΝΟΣ : <i>Lentinula</i>	
ΕΙΔΟΣ: <i>L. edodes</i>	

Εικόνα 1.2.4 Καρποφορία τουμανιταριού *Lentinula edodes*.

Το μανιτάρι *Lentinula edodes* το οποίο αποκαλείται συχνά και ως μανιτάρι shiitake είναι το δεύτερο πιο εντατικά καλλιεργούμενο εμπορικό μανιτάρι στον κόσμο μετά το *Agaricus bisporus* καθώς και το πιο δημοφιλές καλλιεργούμενο μανιτάρι στην Κίνα, στην Ιαπωνία και σε άλλες χώρες της Ασίας. Καλλιεργείται εντατικά τόσο για τις διατροφικές όσο και για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες (Chang & Milles, 2004).

Μορφολογία

Το μυκήλιο του μανιταριού *Lentinula edodes* έχει λευκό χρώμα το οποίο μετατρέπεται σε σκούρο καφέ σε περίπτωση που τραυματιστεί. Οι υφές έχουν σχήμα επίμηκες γραμμικό και βαμβακώδη υφή. Έχει ευχάριστη οσμή η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί ως γλυκιά και φρέσκια. Ο πύλος έχει διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 5-25 cm. Είναι αρχικά ημισφαιρικός ενώ όταν ωριμάσει γίνεται επίπεδος. Το χρώμα του είναι αρχικά σκούρο καφέ σχεδόν μαύρο και εξελίσσεται σε ανοιχτό καστανό με το πέρασμα του χρόνου. Η περιφέρεια του πύλου είναι ομαλή ως ακανόνιστη. Αρχικά είναι στραμμένη προς τα μέσα ενώ τελικά γίνεται κυματοειδής έως επίπεδη. Οι καρποφορίες φέρουν λευκές φολίδες στην πάνω επιφάνεια του πύλου και τα

ελάσματα είναι λευκά. Ο στύπος είναι έκκεντρα συνδεδεμένος με τον πύλο και είναι ινώδης και σκληρός. Η σάρκα του έχει χρώμα καστανό έως μαύρο. Τα βασίδια φέρουν 4 σπόρια τα οποία έχουν χρώμα λευκό και σχήμα ωοειδές έως επίμηκες ελλειψοειδές ενώ μετά τον σχηματισμό των καρποφοριών παίρνουν σκούρο καφέ χρώμα (Chang & Milles, 2004; Stamets, 2000).

Συνθήκες ανάπτυξης

Η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος επιδρά έντονα στην επιβίωση και στην ανάπτυξη του μυκηλίου καθώς επηρεάζει τις χημικές διαδικασίες που σχετίζονται με την μυκηλιακή αύξηση. Ο μύκητας *L.edodes* νεκρώνεται σε θερμοκρασίες γύρω στους 45 °C καθώς και κάτω από παρατεταμένη έκθεση σε θερμοκρασίες άνω των 35 °C (Tokimoto και Komatsu, 1978; Han κ.α., 1981). Το μυκήλιο του μύκητα αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 4-35 °C, με άριστη θερμοκρασία η οποία κυμαίνεται στους 22-28 °C. Η περιεκτικότητα υγρασίας στο υπόστρωμα καλλιέργειας αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη του μύκητα. Συγκεκριμένα ο μύκητας δεν αναπτύσσεται καθόλου σε υγρασίας μικρότερη από 40%, ενώ η μέγιστη ανάπτυξη του επιτυγχάνεται σε υγρασία 50-60% (Donoghue και Denison, 1995). Όταν καλλιεργείτε σε κούτσουρα δέντρων το ποσοστό υγρασίας θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 35 και 75%. Τιμές μεγαλύτερες ή μικρότερες από αυτές δημιουργούν προβλήματα στην ανάπτυξη του μύκητα, ενώ το άριστο εύρος τιμών για καλλιέργεια σε κούτσουρα είναι 35-55% (Przybylowicz και Donoghue, 1990). Τέλος το pH είναι ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη του μύκητα καθώς επιδρά στην διαλυτότητα των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος και στην δράση των ενζύμων του συγκεκριμένου μύκητα. Οι τιμές του pH όταν ο μύκητας καλλιεργείτε σε κούτσουρα δέντρων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 3,5 και 5,5, με βέλτιστη τιμή μεταξύ 5,0 και 5,5 (Przybylowicz και Donoghue, 1990), ενώ όταν καλλιεργείτε σε γεωργικά υπολείμματα το pH του υποστρώματος θα πρέπει να ρυθμίζεται στο 4,5 – 6,0 με προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου (Miller & Jong, 1987).

Καλλιέργεια

Η παραδοσιακή μέθοδος καλλιέργειας του μανιταριού *L. edodes* γινόταν σε κορμούς δέντρων, ιδιαίτερα στην Ασία. Οι κορμοί δέντρων που χρησιμοποιούνται ανήκουν στην οικογένεια *Fagaceae*, δηλαδή το συγκεκριμένο μανιτάρι αναπτύσσεται σε βελανιδιά (*Quercus serrata*, *Q.*

acutissima, *Q. mongolica* var. *grossoserrata*, *Cyclobalanopsis acuta*, *C. glauca*), στο δέντρο *Shii* (*Castanopsis cuspidata*, *C. cuspidate* var. *shieboldii*), σε καστανιά (*Castanea crenata*) και σε καρπίνο (*Carpinus tschonoskii*, *C. laxiflora*, *C. japonica*) (Chang & Milles, 2004; Stamets, 2000).

Όσον αφορά στην επιλογή των κουτσούρων, προτιμώνται κορμοί δέντρων με χονδρό φλοιό, καθώς αυτός αντιστέκεται καλύτερα στις φυσικές φθορές και στην απώλεια υγρασίας. Τα δέντρα κόβονται αργά το φθινόπωρο έως νωρίς την άνοιξη, όταν η περιεκτικότητα τους σε υγρασία είναι 33-55 %, ο χυμός του δέντρου ρέει και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Η κοπή των δέντρων πρέπει να γίνεται και στο κατάλληλο σημείο αλλιώς τα κούτσουρα μπορεί να μολυνθούν από μύκητες που πιθανώς να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη του μυκηλίου τουμανιταριού. Αν μετά την κοπή και πριν τον εμβολιασμό τα κούτσουρα πρέπει να αποθηκευτούν για μεγάλη χρονική περίοδο, τότε είναι σημαντικό να αποφευχθεί η υπερβολική ξηρασία ή υγρασία. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη δημιουργία κατάλληλου σωρού. Κατά τη διάρκεια ζεστού, και ξηρού καιρού, η απώλεια υγρασίας ελαχιστοποιείται με δημιουργία ογκωδών σωρών, ενώ αν ο καιρός είναι κρύος και βροχερός απαιτούνται χαμηλοί σωροί κούτσουρων (Chang & Milles, 2004; Stamets, 2000).

Η σύγχρονη μέθοδος καλλιέργειας του μύκητα *L. edodes* γίνεται σε σάκους με γεωργικά υπολείμματα βελανιδιάς, φλαμουριάς, λεύκας, ευκάλυπτου, κλήθρας, οξιάς, πεύκου, πριονίδι σφενδάμου και σημύδας, άχυρα δημητριακών (κυρίως κριθαριού και σιταριού), κότσαλα καλαμποκιού, υπολείμματα έκθλιψης σακχαροκάλαμου, φλούδια ηλιόσπορου, φλούδες φιστικιών, κλαδιά αμπέλου, πούλπα καφέ, φλούδια ηλιόσπορου, υπολείμματα βάμβακος κ.α. (Philippoussis, 2009). Η μέθοδος αυτή είναι σχετικά καινούρια και εφαρμόστηκε περισσότερο από Αμερικανούς καλλιεργητές αφού παραδοσιακά στην Ασία χρησιμοποιούν τους κορμούς δέντρων. Η καλλιέργεια σε σάκους έχει υψηλότερες αποδόσεις σε μικρότερο χρονικό διάστημα (Stamets, 2000; Philippoussis κ.α., 2003). Το υπόστρωμα συνήθως αποτελείται από μίγμα πριονιδίου και/ή λιγνοκυτταρινούχων υλικών, όπως είναι το άχυρο, καθώς και από άλλα πρόσθετα υλικά για υδατάνθρακες και άζωτο, όπως είναι το πίτουρο. Επίσης, προτιμάται πριονίδι από πλατύφυλλα δένδρα (βελανιδιά, σφενδάμι). Το πριονίδι είναι το κυριότερο συστατικό των περισσότερων μιγμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του μύκητα *L. edodes*. Η σύσταση και η απόδοση του υποστρώματος διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και

εξαρτάται από την ποικιλία των διαθέσιμων λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Philippoussis κ.α., 2007α; Philippoussis, 2009). Ευρέως χρησιμοποιείται 80% πριονίδι και 20% συμπληρώματα (σε ξηρό βάρος) (Roysse 1985α,β; Miller & Jong, 1986). Για παράδειγμα, στην Ασία, το υπόστρωμα αποτελείται από 80% πριονίδι και 20% πίτουρο (Iizuka & Takeuchi, 1978), ενώ στην Αμερική αποτελείται από 80% πριονίδι, 10% άχυρο και 10% πίτουρο (Roysse 1985α; Miller & Jong, 1986).

Η εφαρμοζόμενη τεχνολογία παραγωγής καρποσωμάτων *L. edodes* που εφαρμόζεται στο ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ (Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων) περιλαμβάνει τη παρασκευή ‘σπόρου’ (spawn) σε κόκκους κεχριού (Philippoussis κ.α., 2002) καθώς και του υποστρώματος καλλιέργειας σε αναλογία 75% τεμαχισμένα και διαβρεγμένα γεωργικά υπολείμματα (άχυρο σίτου, εκκοκκισμένοι σπάδικες καλαμποκιού και πριονίδι βελανιδιάς) και 25% κατάλληλα προσθετικά ώστε ο τελικός λόγος C/N να είναι 25-50/1 και η υγρασία να είναι 60-70% (Philippoussis κ.α., 2003). Καθώς ο μύκητας παρουσιάζει ευαισθησία στους ανταγωνιστές, τα υποστρώματα τοποθετούνται σε σακούλες 2-15 κιλών και αποστειρώνονται πριν τον εμβολιασμό με τον μύκητα. Ο παραγωγικός κύκλος, που διαρκεί συνολικά 150 ημέρες (80-90 ημέρες για αποικισμό του υποστρώματος και 60-70 ημέρες καρποφόρηση) πραγματοποιείται σε θαλάμους με ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας σύμφωνα με την μέθοδο των Philippoussis κ.α. (2002; 2003). Η επώαση γίνεται σε σχετική υγρασία 85% και θερμοκρασία 24-25 °C. Στη συνέχεια αφαιρούνται οι σακούλες και ακολουθεί επαγωγή στους 15 °C και καρποφόρηση σε θερμοκρασία 17,5 °C, φωτισμό (300-500 Lux, 12-24 h/ημέρα) και υγρασία 85-90%.

1.3 Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και χρήσιμων μεταβολιτών μακρομυκήτων σε υγρές ζυμώσεις

Τα μυκήλια των μανιταριών που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες βυθού δύναται να παράγουν προϊόντα καλής θρεπτικής αξίας (Block κ.α., 1958; Reusser κ.α., 1958) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τρόφιμα, πρόσθετα τροφίμων ή διατροφικά συμπληρώματα (Cirillo κ.α., 1960; Janardhanan κ.α., 1970; Litchfield, 1968). Η καλλιέργεια βυθού έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ικανή να παράγει μεγάλες ποσότητες μυκηλίου σε μια σχετικά σύντομη χρονικά περίοδο (Litchfield & Overbeck, 1965). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα οφείλεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός αύξησης των μυκήτων είναι υψηλότερος στα υγρά μέσα ανάπτυξης από ό,τι στα στερεά και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως είναι το pH, η θρεπτική σύσταση και ο αερισμός, μπορούν να ελεγχθούν καλύτερα (Taguchi κ.α., 1968). Εκτός των άλλων, το τελικό προϊόν που παραλαμβάνεται είναι και ποιοτικά ομοιόμορφο (Szuecs, 1958). Στις περισσότερες έρευνες, ο σύνηθες τρόπος ανάπτυξης των μυκηλίων σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα για παραλαβή της μυκηλιακής βιομάζας και διαφόρων μεταβολιτών γίνεται χρησιμοποιώντας απλές πηγές άνθρακα με κυρίαρχη τη γλυκόζη (Manu-Tawiah & Martin, 1987; Gern κ.α., 2008; Xu κ.α., 2008; Diamantopoulou κ.α., 2012α,β, 2014, 2016). Επίσης, έχει αναφερθεί και η χρήση λακτόζης (Tang & Zhong, 2002), σακχαρόζης (Chen, 2002) κ.α., ενώ ως πηγή αζώτου προτιμώνται συνήθως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης. Επιπρόσθετα, έχουν γίνει έρευνες για κάποια είδη μυκήτων που αναπτύχθηκαν σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα και χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα διάφορα αγρο-βιομηχανικά υποπροϊόντα όπως η γλυκερόλη και τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου (Tsioulpas κ.α., 2002; Fountoulakis κ.α., 2002; Aggelis κ.α., 2003). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι οι καλλιέργειες βυθού μπορούν να δράσουν οικολογικά στο περιβάλλον μειώνοντας το απαιτούμενο βιολογικό οξυγόνο (BOD) καθώς αξιοποιούν ως θρεπτικά υποστρώματα τα βιομηχανικά απόβλητα και τα απόβλητα που προκύπτουν κατά την παραγωγή τροφίμων (Litchfield, 1977).

Ο Zadrazil (1978) παρατήρησε ότι τα είδη που ανήκουν στο γένος *Pleurotus* αναπτύσσονται καλά σε καλλιέργειες βυθού και γενικά, διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *P. ostreatus* (Volt, 1966; Ginterova, 1973; Zadrazil, 1975, 1978; Shannon & Stevenson, 1975; Dijkstra, 1976; Diamantopoulou κ.α., 2012α). Οι Manu-Tawiah & Martin

(1987) ανέπτυξαν το μυκήλιο του συγκεκριμένου μύκητα σε δύο διαφορετικά υποστρώματα σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες βυθού. Το πρώτο συνθετικό υπόστρωμα βασιζόταν στην γλυκόζη ενώ το δεύτερο σε εκχύλισμα τύρφης. Η μυκηλιακή βιομάζα αναλύθηκε ως προς τους ολικούς υδατάνθρακες, τις ινώδεις ουσίες, το άζωτο, τα ολικά λιπίδια, τα λιπαρά οξέα, την τέφρα, τα αμινοξέα και τα μεταλλικά στοιχεία. Τα αποτελέσματα της μυκηλιακής βιομάζας που αναπτύχθηκε στα δύο υποστρώματα συγκρίθηκαν τόσο μεταξύ τους όσο και με τα αντίστοιχα των καρποφοριών που σχηματίστηκαν σε στερεή καλλιέργεια τύρφης. Το μυκήλιο που αναπτύχθηκε στο υγρό υπόστρωμα με το εκχύλισμα τύρφης περιείχε υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, μία ικανοποιητική σύνθεση από αμινοξέα και υψηλές συγκεντρώσεις σε απαραίτητα λιπαρά οξέα και μεταλλικά στοιχεία. Επίσης, οι Diamantopoulou κ.α. (2012α) ανέπτυξαν στελέχη των μυκήτων *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *M. elata*, *M. esculenta*, *G. lucinum*, *G. applanatum*, *A. auricula*, *A. aegerita*, *F. velutipes*, *L. edodes* και *V. volvacea*, σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη (30 g/L) και με πηγές αζώτου, εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη, σε στατικές και αναδεδυόμενες συνθήκες. Τα περισσότερα στελέχη εμφάνισαν τις μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας κατά την καλλιέργεια τους σε αναδεδυόμενες φιάλες, *P. pulmonarius* (18,8 g/L), *P. ostreatus* (19,2 g/L), *M. elata* (9,6 g/L), *M. esculenta* (12,2 g/L), *G. lucinum* (10,9 g/L), *A. auricular* (10,6 g/L), *A. aegerita* (7,5 g/L), *F. velutipes* (10,9 g/L), *L. edodes* (4,6 g/L), ενώ εξαίρεση αποτέλεσαν τα στελέχη *G. applanatum* και *V. volvacea* όπου εμφάνισαν μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, 15,1 g/L και 14,5 g/L αντίστοιχα, κατά την καλλιέργεια τους σε στατικές συνθήκες. Η καλλιέργεια των παραπάνω στελεχών σε αναδεδυόμενες συνθήκες φαίνεται να επηρεάζει θετικά και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών καθώς τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν πιο αυξημένη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και εξωπολυσακχαριτών κατά την καλλιέργεια τους σε συνθήκες ανάδευσης σε σχέση με τις στατικές συνθήκες. Ακόμη, οι Gem κ.α. (2008) θέλησαν να επιλέξουν ένα κατάλληλο υπόστρωμα το οποίο θα μεγιστοποιούσε την παραγωγή της μυκηλιακής βιομάζας του είδους *P. ostreatus* DSM 1833 και κατ' επέκταση την παραγωγή της β-γλυκάνης, ενός πολυσακχαρίτη ο οποίος ανευρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του μυκηλίου και του καρποσώματος των ειδών που ανήκουν στο γένος *Pleurotus* και θεωρείται ότι έχει σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα σίτου/καλαμποκιού (10 ή 20 g/L), εκχύλισμα ζύμης (2 ή 5 g/L), θειϊκό αμμώνιο (0 ή 5 g/L) και γλυκόζη (20 ή 40 g/L) σε διάφορες αναλογίες. Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαριτών παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν 5 g/L

εκχυλίσματος ζύμης και 40 g/L γλυκόζης. Όσον αφορά στη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, οι βέλτιστες τιμές ανευρέθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε 20 g/L εκχύλισμα σίτου/καλαμποκιού και 40 g/L γλυκόζης.

Οι Martirani κ.α. (1995) ανέπτυξαν τον βασιδιομύκητα *Pleurotus ostreatus* σε υγρή καλλιέργεια από εκχύλισμα πατάτας και ζύμης, απομόνωσαν το παραχθέν ένζυμο οξειδάση και το πρόσθεσαν σε υγρά απόβλητα ελαιουργείων (έως 20%) με σκοπό να μελετήσουν την ικανότητα του συγκεκριμένου μύκητα και ιδιαίτερα του ενζύμου οξειδάση να αποτοξινώνει τέτοιου είδους υγρά απόβλητα καθώς προκαλούν μεγάλο οικολογικό πρόβλημα λόγω της έντονης περιεκτικότητας τους σε φαινολικά συστατικά. Η μελέτη αυτή βασίστηκε στη σκέψη ότι ορισμένα από τα συγκεκριμένα αρωματικά συστατικά έχουν παρόμοια δομή με πολλά συστατικά της λιγνίνης, η οποία διασπάται μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων από ένζυμα μικρού βαθμού ειδίκευσης, π.χ. φαινολική οξειδάση και υπεροξειδάση, τα οποία παράγονται από λιγνινολυτικούς οργανισμούς όπως είναι ο μύκητας *P. ostreatus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απομονωθείσα οξειδάση μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό την περιεκτικότητα σε φαινολικά, ενώ η άμεση προσθήκη του μικροοργανισμού στα απόβλητα ελαιουργείου οδήγησε σε μια λιγότερο σημαντική μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων με τη συνακόλουθη μείωση της περιεκτικότητας σε φαινόλες. Επιπλέον, οι Burla κ.α. (1992) μελέτησαν τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα *P. ostreatus* σε καλλιέργειες βυθού όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας και δύο μεταβολιτών, της φαινολοξειδάσης (λιγνολυτικό ένζυμο) και της ενδογλυκανάσης (κυτταρινολυτικό ένζυμο), εξετάζοντας παράλληλα την επίδραση του pH, την παροχή οξυγόνου και την ταχύτητα ανάδευσης. Τελικά οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης σημειώθηκαν για pH ίσο με 6, ταχύτητα ανάδευσης 500 rpm (στα 2 L καλλιέργειας) και παροχή οξυγόνου 2 L min⁻¹.

Οι Israilides κ.α. (2008) ανέπτυξαν το μύκητα *Lentinula edodes* σε καλλιέργεια βυθού και παρέλαβαν ενεργά εκχυλίσματα από το μυκήλιο και το καρπόσωμά του με σκοπό να διερευνήσουν την ανοσοδιεγερτική τους δράση, την κυτταροτοξικότητα τους και την παρεμποδιστική τους δράση στην ανάπτυξη διαφόρων φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, πολλοί ερευνητές έχουν αναπτύξει το μύκητα *L. edodes* για την παραλαβή ενός πολύ σημαντικού πολυσακχαρίτη, της λεντινάνης, ο οποίος διαθέτει αντικαρκινική, ανοσορρυθμιστική, αντιμικροβιακή και αντιαυτική δράση (Mizuno, 1995; Maeda κ.α., 1974).

Επίσης οι Maziero κ.α. (1999), σε καλλιέργειες βυθού διαφόρων στελεχών του *L. edodes* ανέφεραν παραγωγή βιομάζας 4,70 g/L σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό ανάδευση. Ακόμη οι Lombeth κ.α. (2002) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* σε αναδεδυόμενες φιάλες κατέγραψαν μυκηλιακή βιομάζα 6,1 g/L, ενώ καλλιέργεια του *L. edodes* σε γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης έδωσε μετά από αριστοποίηση των συνθηκών βιομάζα 6,88 g/L (Feng κ.α., 2010). Ωστόσο, μικρότερες παραγωγές βιομάζας (~5,0 g/L) σημειώθηκαν όταν ο μύκητας καλλιεργήθηκε με γεωργικά υπολείμματα σε αναδεδυόμενες φιάλες (Hasegawa κ.α., 2005) και σε υγρά απόβλητα ελαιουργίας (~5,0 g/L) (D'Annibale κ.α., 2004). Επιπλέον, οι Reverberi κ.α. (2004) ανέφεραν αυξημένη σύνθεση της β-1-3-γλυκάνης από τον μύκητα *L. edodes* σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ). Τα ΥΑΕ βρέθηκαν να είναι πολύ καλό υπόστρωμα για την παραγωγή βιομάζας του *L. edodes* (Lakhtar κ.α., 2010) και αυτό κυρίως λόγω του ότι είναι πλούσια σε λιπίδια (1,5%, κ.β.), πλούσια κυρίως σε παλμιτικό και ελαϊκό οξύ, τα οποία υποκινούν την ανάπτυξη του μυκηλίου (Song κ.α., 1989). Οι Tomati κ.α. (2004) αναφέρουν επίσης ότι από τη βιομάζα του μυκηλίου του *L. edodes* που επώαστηκε σε ΥΑΕ, εκχυλίστηκαν οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και ξυλόζη σε μεγάλη ποσότητα (αναλογία 7:1), αλλά και ίχνη από ριβόζη, αραβινόζη και μαννόζη.

1.4 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών μακρομυκήτων

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και από τον γενικό χημικό τους τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$ με $n > 100$ τις περισσότερες φορές, οι ενδοπολυσακχαρίτες είναι πολυμερή που αποτελούνται από μονοσακχαρίτες. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι είναι λίγοι οι πολυσακχαρίτες που έχουν βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 100 καθώς η πλειοψηφία τους κυμαίνεται μεταξύ 200-3000. Ολιγοσακχαρίτες ονομάζονται πολυμερή χαμηλού μοριακού βάρους, που αποτελούνται από δύο έως εννιά μονοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες, των οποίων ο γενικός επιστημονικός όρος είναι γλυκάνες (Belitz κ.α., 2009), μπορούν να διακριθούν ανάλογα με το είδος των σακχάρων από τα οποία αποτελούνται σε διάφορες κατηγορίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το άμυλο και η κυτταρίνη που ανήκουν στην κατηγορία των ομοπολυσακχαριτών, και οι πηκτίνες που ανήκουν στην κατηγορία των ετεροπολυσακχαριτών.

Οι βιολογικές λειτουργίες που εξυπηρετούν οι πολυσακχαρίτες ποικίλουν καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διάφορους τρόπους. Χαρακτηριστικά, χρησιμοποιούνται ως αποθήκες άνθρακα (π.χ. άμυλο, γλυκογόνο), αποτελούν δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων (π.χ. κυτταρίνη, χιτίνη), παρέχουν προστασία και στήριξη στα κύτταρα (π.χ. γλυκοζαμινογλυκάνες), χρησιμοποιούνται ως δείκτες αναγνώρισης (π.χ. πολυσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και είναι συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες ή λιπίδια) κ.λ.π..

Εν συνεχεία, με την μορφή γλυκανών συναντάμε τους πολυσακχαρίτες των ανώτερων μυκήτων. Ειδικότερα, οι γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες οι οποίοι περιέχουν και άλλες δομικές μονάδες στη βασική τους αλυσίδα πέραν της γλυκόζης. Σε μερικούς πολυσακχαρίτες, τα δομικά σάκχαρα ενώνονται με β -(1-3), (1-6) και α -(1-3) γλυκοσιδικούς δεσμούς, ενώ άλλοι είναι πραγματικές ετερογλυκάνες. Οι πλευρικές αλυσίδες των ετερογλυκανών περιέχουν γλυκουρονικό οξύ, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη ή ξυλόζη ως κύριο συστατικό ή σε διάφορους συνδυασμούς. Επιπροσθέτως, πολύ συχνά, εμφανίζεται μια κύρια αλυσίδα, η οποία είναι β (1-3) ή β (1-4) αλυσίδα ή ανάμεικτη β (1-3), β (1-4) αλυσίδα με β (1-6) πλευρικές αλυσίδες.

Στον παρακάτω **Πίνακα 1.4** είναι καταγεγραμμένες οι κατηγορίες πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες χημικές τους δομές που απομονώθηκαν από διάφορα μανιτάρια (Zhang κ.α., 2007)

Πίνακας 1.4.1 Χημικές δομές πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από διάφορα μανιτάρια (Zhang κ.α., 2007).

Κατηγορία πολυσακχαρίτη	Είδη δεσμών	Αναφορές	Κύρια αλυσίδα	Διακλάδωση	M. B.
Ομογλυκάνες	(1→3) - β -D-γλυκάνη με 1-6 διακλαδώσεις	Λεντινάνη από <i>L.edodes</i> (Mizuno, 1997)	(1→3) - β -D-γλυκάνη	(1→6) - β -	5x10 ⁵
		Σχιζοφυλλάνη από <i>Schizophyllum commune</i> (Yamamoto, 1981)	(1→3) - β -D-γλυκάνη	(1→6) - β -	
		Γριφολάνη από <i>Grifola frondosa</i> (Zhuang κ.α., 1994)	(1→3) - β -D-γλυκάνη	(1→6) - β -	5x10 ⁵
		Σκληρογλυκάνη από <i>Sclerotium sclerotia</i> (Palleschi κ.α., 2005)	(1→3) - β -D-γλυκάνη	(1→6) - β -	

		Μία βασική-διαλυτή γλυκάνη από <i>Pleurotus tuber-regium</i> (Zhang κ.α., 2003)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→6) -β-	2x10 ⁵
	Γραμμική (1→3) -β-D γλυκάνη	<i>Auricularia auricula</i> (Ukai κ.α., 1983) <i>Lyophyllum decastes</i> (Ukawa κ.α., 2000)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	-	-
	Γραμμική (1→6) -β-γλυκάνη, (1→3) -β-D γλυκάνη με 1-2 ή 1-6 διακλαδώσεις (1→3) -α-γλυκάνης	<i>Armillariella tabescens</i> (Kihō κ.α., 1992)	(1→6) -β-D-γλυκάνη	-	-
		Παχυμάνη από <i>Poria cocos</i> (Kanayama κ.α., 1986)	(1→3) -β-D-γλυκάνη	(1→2) -β- ή (1→6) -β-	1x10 ⁵
		<i>Armillariella tabescens</i> (Ukawa κ.α., 2000) γραμμική α-(1-3)-γλυκάνη από <i>Amanita muscaria</i> (Kihō κ.α., 1992)	(1→3) -α-γλυκάνη	-	-
	(1→4) -α; (1→6) -α-γλυκάνη		(1→6) -α-γλυκάνη	(1→4) -α-	-
	(1→4) -α; (1→6) -β-γλυκάνη	<i>Agaricus blazei</i> (Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	(1→6) -β-D-γλυκάνη	(1→4) -α-	-
	(1→6) -β; (1→3) -α-γλυκάνη		(1→3) -α-γλυκάνη	(1→6) -β-	-
Ετερογλυκάνες	(1→3) -β-γλυκουρονογλυκάνη	<i>Ganoderma lucidum</i> (Mizuno, 1998)	(1→3) -β-γλυκουρονο-γλυκάνη	γλυκουρονικό οξύ	5,3x10 ⁴
	Ξυλογλυκάνη	<i>Grifola frondosa</i> (Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994) <i>Polyporus confluens</i> (Sugiyama κ.α., 1992) <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Wasser, 2002)	γλυκάνη	ξύλοζη	-
	Αραβινογλυκάνη	<i>Ganoderma tsugae</i> (Wang κ.α., 1993)	γλυκάνη	αραβινόζη	-
	Ριβογλυκάνη	<i>Agaricus blazei</i> (Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	γλυκάνη	ριβόζη	-

		<i>Flammulina velutipes</i> (Zeng, 1990)			
	Γαλακτομαννογλυκάνη	<i>Hohenbuehelia serotina</i> (Ma κ.α., 1991) <i>Leucopaxillus giganteus</i> (Wasser, 2002)	γλυκάνη	γαλακτόζη & μαννόζη	-
	Γαλακτοξυλογλυκάνη	<i>Hericium erinaceus</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	γλυκάνη	γαλακτόζη & ξυλόζη	-
	Μαννοξυλογλυκάνη	<i>Grifola frondosa</i> (Cun κ.α., 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994)	γλυκάνη	μαννόζη και ξυλόζη	-
	Ξυλογαλακτογλυκάνη	<i>Inonotus obliquus</i> (Kim κ.α., 2005)	γλυκάνη	γαλακτόζη, ξυλόζη	-
Ετερογαλακτάνη	Γλυκογαλακτάνη	<i>Ganoderma teugae</i> (Peng κ.α., 2005)	γαλακτάνη	γλυκόζη	-
	Αραβινογαλακτάνη	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Wang κ.α., 2005)	γαλακτάνη	αραβινόζη	-
	Φουκογαλακτάνη	<i>Sarcodon aspratus</i> (Mizuno κ.α., 2000)	γαλακτάνη	φουκόζη	-
	Μαννογαλακτάνη	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Wasser, 2002)	γαλακτάνη	μαννόζη	-
	Φουκομαννογαλακτάνη	<i>Grifola frondosa</i> (Cun κ.α., 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994)	γαλακτόζη	φουκόζη - μαννόζη	-
Άλλες ετερογλυκάνες	Ξυλάνη	<i>Hericium erinaceus</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992, 1998)	ξυλάνη	-	-
	Γλυκοξυλάνη		ξυλάνη	γλυκόζη	-
	Μαννογαλακτοφουκάνη	<i>Grifola frondosa</i> (Cun κ.α., 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang κ.α., 1994)	φουκάνη	μαννόζη, γαλακτόζη	-
	Μαννογλυκοξυλάνη	<i>Hericium erinaceus</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992, 1998)	ξυλόζη	μαννόζη, γλυκόζη	-

	(1→3)-α-μαννάνη	<i>Dictyophora indusiata</i> (Hara κ.α., 1991)	(1→3)-α-μαννάνη	-	-
	Γλυκομαννάνη		μαννάνη	γλυκόζη	-
	(1→2)-β-; (1→3)-β- γλυκομαννάνη	<i>Agricus blazei</i> (Kawagishi κ.α., 1990; Mizuno, 1992)	(1→3)-β-ενωμένη μαννόζη	(1→2)-β- γλυκάνη	-
	Γαλακτογλυκομαννάνη		μαννάνη	γαλακτόζη & γλυκόζη	-
Σύμπλοκα πολυσακχαρίτη- πρωτεΐνης/πεπτιδίου	Σύμπλοκα πολυσακχαρίτη- πεπτιδίου	<i>Coriolus versicolor</i> (Cui & Chisti, 2003)	α-1,4 και β-1,3 γλυκοσιδικός δεσμός; περιέχεται αραβινόζη, ριμαννόζη αλλά όχι φουκόζη	Το πεπτίδιο αποτελείται κυρίως από ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ	1x10 ⁵
	Σύμπλοκα πολυσακχαρίτη- πρωτεΐνης		α-1,4 και β-1,3 γλυκοσιδικός δεσμός; περιέχεται φουκόζη αλλά όχι αραβινόζη, ριμαννόζη	Το πεπτίδιο αποτελείται κυρίως από ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ	1x10 ⁵

Δεν είναι λίγα τα μανιτάρια που ανήκουν στην κατηγορία των Βασιδιομυκήτων, για τα οποία η βιβλιογραφία αναφέρει ότι περιέχουν βιολογικά ενεργούς αντικαρκινικούς και ανοσοδιεγερτικούς πολυσακχαρίτες. Συγκεκριμένα, μετά από έρευνα των Reshetnikov κ.α. (2001) καταγράφηκαν 650 είδη βασιδιομυκήτων οι οποίοι περιέχουν φαρμακευτικά ενεργούς πολυσακχαρίτες που μπορεί να προέρχονται από τα καρποσώματα, την μυκηλιακή βιομάζα ή την υγρή φάση σε καλλιέργειες βυθού. Πράγματι, η ίδια έρευνα κάνει αναφορά στο γεγονός ότι η ποσότητα και ο αριθμός των διαφορετικών πολυσακχαριτών που αποσπώνται από τα καρποσώματα είναι συνήθως πολύ υψηλότερος από εκείνον στις καλλιέργειες βυθού. Στον **Πίνακα 1.4.2** γίνεται αναφορά σε ορισμένους δραστικούς αντικαρκινικούς πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από Βασιδιομύκητες με φαρμακευτικές ιδιότητες είτε από τα καρποσώματα τους είτε από καλλιέργειες βυθού (μυκηλιακή βιομάζα ή υγρή φάση).

Πίνακας 1.4.2 Δραστικοί αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από φαρμακευτικά μανιτάρια Βασιδιομυκήτων (Wasser & Weis, 1999).

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

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι καρκινοπαθείς και γενικότερα άτομα που αντιμετωπίζουν πολύ σοβαρές ασθένειες αντλούν ελπίδα από τους πολυσακχαρίτες. Πράγματι, μία ποικιλία πολυσακχαριτών από ένα σύνολο μανιταριών έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, σημαντική αντικαρκινική δράση είναι αυτή των εν λόγω πολυσακχαριτών, αφού έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς να δρουν τοξικά στα κύτταρα. Παράλληλα, φαίνεται ότι οι

πολυσακχαρίτες των μανιταριών είναι ανθεκτικοί και εναρμονίζονται με τις χημειοθεραπείες και τις θεραπείες με ακτινοβολία.

Αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από ανώτερους μύκητες (καρποσώματα, καλλιέργειες βυθού) είναι είτε υδατοδιαλυτές β-D-γλυκάνες, β-D-γλυκάνες με αλυσίδες ετεροσακχαριτών ξυλόζης, μαννόζης, γαλακτόζης και ουρονικού οξέος ή σύμπλοκα β-D-γλυκάνης-πρωτεΐνης (πρωτεογλυκάνες). Σαν γενικός κανόνας, οι γλυκάνες που συνδέονται με τις πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη ενεργητικότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα σε σχέση με τις απλές γλυκάνες. Στον Πίνακα 1.4.3 αναφέρονται οι χημικές δομές και οι φαρμακευτικές δράσεις μερικών πολυσακχαριτών απομονωθέντων από διάφορες φυσικές πηγές (Yang & Zhang, 2009).

Πίνακας 1.4.3 Χημικές δομές και δράσεις μερικών πολυσακχαριτών απομονωθέντων από φυσικές πηγές (Yang & Zhang, 2009).

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

Πολυσακχαρίτης από τοσί	Πρωτεϊνικοί ετεροπολυσακχαρίτες που περιέχουν L-αραβινόζη, D-ριβόζη, D-ξυλόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, D-μαννόζη και γλυκουρονικό οξύ μέσα σε τμήματα πολυσακχαριτών	Αντιοξειδωτική, μείωση της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων του αίματος, ενάντια της υπεργλυκαιμίας και αντικολοειδή δράση ενάντια παθογόνων βακτηριών	Chen κ.α., 2004, 2005, 2007, 2008; Deng κ.α., 1998; Lee κ.α., 2006β; Wang κ.α. 2001; Zhou κ.α., 2007
Πολυσακχαρίτης από <i>Spirulina platensis</i>	θειωμένος πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από δύο είδη επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων δισακχαριτών, την O-hexuronosylrhamnose (aldobiuronic acid) και την O-rhamnosyl-3-O methylrhamnos (acofriose) ενωμένες με θειώδεις ομάδες	Αντιαθηρογονική και αντιθρομβωγονική	Kaji κ.α., 2002, 2004; Sekharam κ.α., 1987, 1989
α-D-γλυκάνες από το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης <i>S. cerevisiae</i>	(1→3) α-D-γλυκάνες μέτρια διακλαδιζόμενες με αλυσίδες (1→6) α-D-γλυκάνης	Το Adsorb zearalenone μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα κατά την διαδικασία της χώνεψης και προστατεύει τα ζώα ενάντια των αντίστροφων επιδράσεων	Yiannikouris κ.α. (2006)

Πιο συγκεκριμένα για τους ανώτερους μύκητες, η λεντινάνη, η οποία παράγεται από τον εδώδιμο μύκητα *Lentinula edodes*, είναι μία β (1-3), β (1-6) γλυκάνη, η οποία θεωρείται ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες. Πρωτοπόροι στην μελέτη τους, υπήρξαν οι Chihara κ.α. (1970) οι οποίοι την απομόνωσαν και τη μελέτησαν όσον σχετικά με τις αντικαρκινικές της δράσεις, οι οποίες δείχθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικές σε σχέση με άλλους πολυσακχαρίτες. Απεναντίας, οι Maeda κ.α. (1974) ανέφεραν λίγο αργότερα ότι η λεντινάνη δεν είναι δραστική σε όλους τους τύπους καρκινώματος. Εν τούτοις έχει αποδειχθεί ότι η λεντινάνη συμβάλει επιτυχώς στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής καρκινοπαθών, ιδιαίτερων εκείνων με όγκους στο γαστρεντερολογικό σύστημα (Furie κ.α., 1981; Taguchi κ.α., 1985α,β).

Τέλος, η σχιζοφυλλάνη, η οποία παράγεται από το μανιτάρι *Schizophyllum commune*, έχει δείχθει ότι έχει κυτταροστατική δράση στο σάρκωμα 180. Επιπροσθέτως, έρευνες υποστηρίζουν ότι έχει την δυνατότητα να παρατείνει τη διάρκεια ζωής ασθενών με καρκίνωμα στο λαιμό ή το κεφάλι (Kimura κ.α., 1994). Είναι γεγονός ότι η χρήση του συγκεκριμένου πολυσακχαρίτη σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες (χειρουργείο, χημειοθεραπεία, ακτινοβολία), προβαίνει σε

θετικότερα αποτελέσματα στη συνολική επιβίωση των ασθενών που την έλαβαν σε σχέση με εκείνους που δεν την έλαβαν καθόλου (Miyazaki κ.α., 1995).

1.5 Παραγωγή λιπιδίων μακρομυκήτων

Λιπίδια περιέχονται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα των μικροοργανισμών καθώς ο ρόλος τους είναι σημαντικός στην δόμηση και τη σωστή λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών. Ωστόσο δεν θεωρούνται όλοι οι μικροοργανισμοί πλούσιες πηγές λιπών και ελαίων. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένο περιβάλλον είναι ικανοί να συσσωρεύσουν λίπος στο εσωτερικό του κυττάρου τους σε ποσοστό τουλάχιστον 20 – 25% κ.β. επί της ξηράς ουσίας τους χαρακτηρίζονται ως ελαιογόνοι (Ratledge, 2002). Έχει αναφερθεί ότι από τα 600 περίπου διαφορετικά είδη ζυμών, τουλάχιστον 25 μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστά μεγαλύτερα από 20% κατά βάρος (επί ξηράς ουσίας), ενώ από τα 60.000 είδη μυκήτων λιγότερα από 50 είδη μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος πάνω από το 25% κ.β. επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 1989α). Επιπλέον, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος έως και 70% κ.β. επί της ξηράς ουσίας (Ratledge, 2002).

Το λίπος που συσσωρεύεται στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι κυρίως υπό μορφήν TAGS (τριάκυλογλυκερόλες). Με μερικές εξαιρέσεις, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ευκαρυωτικοί και στα πιο αντιπροσωπευτικά είδη περιέχονται φύκη, ζύμες και μύκητες. Τα βακτήρια συνήθως δεν συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες TAGS αλλά κυρίως κηρούς και πολυεστέρες (προϊόντα σημαντικού εμπορικού ενδιαφέροντος της σύγχρονης εποχής). Η εκάστοτε σύνθεση του μικροβιακού λίπους είναι αποτέλεσμα γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων για κάθε ελαιογόνο μικροοργανισμό (Ratledge, 2004). Παρ' όλα αυτά, τα μικροβιακά έλαια είναι άξια μελέτης διότι έχουν την δυνατότητα να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα φυτικών ή ζωικών λίπους εξεζητημένης σύστασης και δομής όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στη φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων όπως το λίπος του κακάο.

Επίσης, το μικροβιακό λίπος έχει ενδιαφέρουσα σύσταση σε λιπαρά οξέα (**Πίνακας 1.5**), καθώς είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. λινελαϊκό $\Delta^{9,12}$ C18:2 και ελαϊκό Δ^9 C18:1 οξύ). Το λίπος ορισμένων κατηγοριών μυκήτων (π.χ. Ζυγομύκητες) εμφανίζει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα, όπως είναι το γ-λινολενικό οξύ. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι το μικροβιακό λίπος παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούνται σε σχέση με το λίπος φυτικής ή ζωικής προέλευσης αφού τα τελευταία εμφανίζουν διακυμάνσεις στη σύσταση τους τόσο σε ακόρεστα όσο και σε κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 1.5 Σύνθεση λίπους μερικών μικροοργανισμών (Meng κ.α., 2008)

Μικροοργανισμοί	Σύνθεση λίπους (βάρους λιπαρού οξέος / ολικά λιπίδια)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Μικροφύκη	12 - 21	55 - 57	1 - 2	58 - 60	4 - 20	14 - 30
Ζύμες	11 - 37	1 - 6	1 - 10	28 - 66	3 - 24	1 - 3
Μύκητες	7 - 23	1 - 6	2 - 6	19 - 81	8 - 40	4 - 42
Βακτήρια	8 - 10	10 - 11	11 - 12	25 - 28	14 - 17	-

1.5.1 Είδη και χημική σύσταση λιπιδίων μακρομυκήτων

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν συστατικά των κυττάρων των μυκήτων κατέχοντας διάφορους αναγνωρισμένους ρόλους. Για παράδειγμα, αποτελούν μέσα αποθήκευσης διαφόρων συστατικών και τα ίδια αποτελούν συστατικά του πλασμολύματος και των μεμβρανών παίζοντας βασικό ρόλο στην οργάνωση του κυττάρου. Στους μύκητες, τα κύρια λιπαρά οξέα που τυπικά απαντώνται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και κατά την αποθήκευση των τριακυλγλυκερολών είναι το παλμιτικό και το στεαρικό οξύ μαζί με τα ακόρεστα παράγωγα τους, το παλμιτελαϊκό οξύ, το ελαϊκό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και το λινολενικό οξύ (Suutari, 1995).

Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το περιεχόμενο λίπος των μυκήτων, αλλά και γενικότερα όλων των ζωντανών οργανισμών (Losel, 1988). Πράγματι, η σύνθεση των μυκηλιακών λιπαρών οξέων ποικίλλει πάρα πολύ και εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα όπως είναι το θρεπτικό υπόστρωμα, το οξυγόνο και η θερμοκρασία (Suutari, 1995). Όσον αφορά στη θερμοκρασία, είναι γενικά αναγνωρισμένο ότι η ακορεστότητα

των λιπαρών οξέων αυξάνεται όσο μειώνεται η θερμοκρασία, παρόλο που υπάρχουν και αντίθετες αναφορές (Chavant κ.α., 1981; Losel, 1988; Sumner κ.α., 1969; Suutari, 1995; Suutari & Laakso, 1994; Suutari κ.α., 1990; Wilson & Miller, 1978). Σήμερα, το ενδιαφέρον για τα λιπίδια και ιδιαίτερα για τη σύσταση των λιπαρών οξέων διευρύνεται. Οι αντίστοιχες πληροφορίες χρησιμοποιούνται στις φυσιολογικές, χημικοταξονομικές και ενδογενετικές έρευνες για τη διαφοροποίηση διαφόρων μυκήτων όπως γίνεται και για τους άλλους οργανισμούς (βακτήρια, φύκη, μύκητες και φυτά) (Bagci κ.α., 2003; Dimou κ.α., 2002; Erwin, 1973; Stahl & Klug, 1996; Wolff κ.α., 2002).

Όσον αφορά στα είδη και τη χημική σύσταση λιπιδίων βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων, οι Kitzberger κ.α. (2009) μελέτησαν τον εδώδιμο μύκητα *Lentinula edodes* (Berk), το δεύτερο σε παγκόσμια κατάταξη καλλιεργούμενο μανιτάρι, και ανέφεραν ότι τα κύρια συστατικά που ανιχνεύθηκαν στην παραχθείσα ποσότητα ελαίου μέσω ανάλυσης στον αέριο χρωματογράφο και σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία ανάλυσης μαζών, ήταν το παλμιτικό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και η εργοστερόλη. Επίσης οι Diamantopoulou κ.α. (2012α) κατά την μελέτη της σύστασης των λιπαρών οξέων, των μυκήτων *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *M. elata*, *M. esculenta*, *G. lucinum*, *G. applanatum*, *A. auricula*, *A. aegerita*, *F. velutipes*, *L. edodes* και *V. volvacea* σε καλλιέργειες βυθού, σε αναδεδυόμενη και στατική κατάσταση, με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ βρέθηκε ότι ήταν το λινελαϊκό. Επίσης παράχθηκαν μεγάλες ποσότητες παλμιτικού και ελαϊκού οξέος, ενώ το στεατικό οξύ ανιχνεύτηκε σε αρκετά μικρότερες συγκεντρώσεις (<4 %), με εξαίρεση τα μικροβιακά λιπίδια που παράχθηκαν από τα στελέχη *M. elata*, *M. esculenta*, *G. lucinum* και *A. auricular* όπου εμφανίστηκαν μεγαλύτερες ποσότητες στεατικού οξέος. Όσον αφορά τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, η ανάλυση των παραγόμενων μικροβιακών λιπιδίων έδειξε ότι τα ποσοστά του λινελαϊκού οξέως ήταν 74,1 με 82,5 % στο *L. edodes*, 73,4 % στο *P. ostreatus*, 72,9 % στο *G. lucinum*, 70,0 % στο *A. auricular* και 67,4 % στο *G. applanatum*. Επίσης μεγάλες ποσότητες ελαϊκού οξέος παράχθηκαν κατά την καλλιέργεια σε αναδεδυόμενες συνθήκες των στελεχών *M. esculenta* και *A. aegerita*, με το λινελαϊκό οξύ να εμφανίζει μικρότερα ποσοστά, 27,3 και 38,2 % αντίστοιχα. Ενώ στα λιπίδια των στελεχών *L. edodes*, *P. ostreatus* και *G. lucinum* τα ποσοστά ελαϊκού οξέος ήταν αρκετά μικρότερα (1,4 – 7,4 %). Στα κορεσμένα λιπαρά οξέα κυρίαρχο ήταν το παλμιτικό οξύ, με ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 12,4 και 28,4 % και μόνο στην αναδεδυόμενη καλλιέργεια του *L. edodes* η συγκέντρωση μειώθηκε στο 4,5 %. Ακόμη, οι Dimou κ.α. (2002) μελέτησαν τη

μυκηλιακή σύσταση λιπαρών οξέων διαφόρων ειδών του γένους *Pleurotus* και τις ενδογενετικές τους διαφοροποιήσεις (οι καλλιέργειες ήταν βυθισμένου τύπου, αναδευόμενης φάσης και με θρεπτικό υπόστρωμα ζωμό πατάτας – δεξτρόζης). Στα λιπίδια που παράχθηκαν από τα είδη *Pleurotus abalonus*, *P. calypratus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* και *P. sapidus*, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το λινελαϊκό (33 - 68 % των ολικών λιπαρών οξέων), ενώ το στέλεχος *P. eryngii* είχε ως κύριο λιπαρό οξύ το ελαϊκό (43 - 46 %). Σε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν, το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ βρέθηκαν σε σημαντικές συγκεντρώσεις (>12 %), ενώ το στεαρικό οξύ βρέθηκε σε χαμηλότερα ποσοστά. Επιπρόσθετα, οι Necmettin κ.α. (2006) παρέλαβαν τα λιπαρά οξέα των ειδών *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Boletus edulis*, *Coprinus comatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Oudemansiella radicata* και *Armillaria mellea* με τη χρήση μίγματος διαλυτών χλωροφόρμιου/μεθανόλης (2:1) και τα προσδιόρισαν ποσοτικά και ποιοτικά μέσω της διαδικασίας της μεθυλεστεροποίησης και τη χρήση αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση έγινε στα καρποσώματα και στο στύπο των συγκεκριμένων στελεχών και η σύνθεση τους σε λιπαρά οξέα διέφερε από είδος σε είδος. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλα τα στελέχη ήταν το λινελαϊκό (C18:2) και κυμαινόταν από 13 – 59 %. Τα λοιπά βασικά λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν ήταν αντίστοιχα το παλμιτικό, το ελαϊκό, το στεαρικό και το αραχιδονικό. Το λινολενικό οξύ ανιχνεύθηκε σε πολύ χαμηλά ποσοστά σε όλα τα στελέχη. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ανάλυση έδειξε ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκονταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα κορεσμένα.

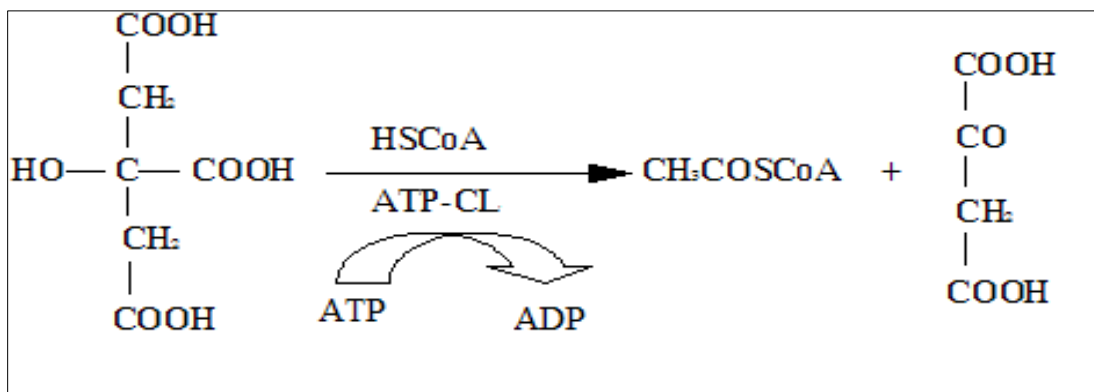
Τέλος, τα λιπαρά οξέα των εδώδιμων μανιταριών είναι μεγάλου ενδιαφέροντος καθώς μπορούν να συμβάλουν θετικά στην ανθρώπινη διατροφή, κυρίως κατά το βασικό μεταβολισμό του ανθρώπου. Το λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12}C18:2) και το α-λινολενικό οξύ (^{Δ9,12,15}C18:3), καθώς, επίσης, και οι μακριές αλυσίδες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων θεωρείται ότι έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία (Parikh κ.α., 2005). Χωρίς την παρουσία των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων (απαραίτητα λιπαρά οξέα), ο ανθρώπινος οργανισμός δε θα μπορούσε να επιτελέσει σημαντικές λειτουργίες για τη φυσιολογία του. Πέρα από το ρόλο τους ως λιπίδια στην παροχή ενέργειας (μέσω β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων), τα λιπαρά οξέα καθώς και οι μεταβολίτες τους αποτελούν δομικά τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων τη ρευστότητα και τη σταθερότητα της συγκεκριμένης δομής. Ακόμη, τα λιπαρά οξέα ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων, επηρεάζοντας τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και τη μεταφορά της χοληστερόλης (Horrobin, 1992). Ωστόσο, το

μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον ρόλο αυτών των μακρομορίων εστιάζεται στην ιδιότητα τους ως προάγγελοι για τη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους βραχύβιων ρυθμιστικών μορίων του οργανισμού, όπως οι είναι οι προσταγλαδίνες, οι προστακυκλίνες, οι θρομβοξάνες και τα υδροξύ-λιπαρά οξέα, ουσίες γνωστές και ως εικοσανοειδή, υπεύθυνες για την ρύθμιση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών (Horrobin, 1992; Certik & Simizu, 1999; Ratledge και Wynn, 2005). Η ανεπάρκεια σε απαραίτητα λιπαρά οξέα και κατ'επέκταση η ελλιπής σύνθεση εικοσανοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό οδηγεί σε ανωμαλίες του δέρματος, του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης και σε καρδιαγγειακά, νεφρικά, ενδοκρινολογικά και αναπνευστικά προβλήματα (Certik & Simizu, 1999). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία δεν είναι απαραίτητα δεδομένου ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να βιοσυντεθούν από τα υγιή άτομα (π.χ. γ- λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3), θεωρούνται παρόλα αυτά μεγάλης φαρμακευτικής, εμπορικής και βιολογικής σημασίας, αφού σε πολλές περιπτώσεις (π.χ. λόγω stress, υπερλιπιδαιμίας, φτωχής διατροφής, κατάχρησης αλκοόλ κλπ) ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα βιοσυνθέσει και επομένως πρέπει να ληφθούν μέσω της τροφής.

1.5.2 Βιοσύνθεση μικροβιακών λιπιδίων

Ως υλικό εκκίνησης για τη *de novo* βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, χρησιμοποιείται το ακετυλο-CoA, το οποίο με αντιδράσεις κατ' ουσίαν αντίστροφες αυτών της β-οξειδωσης δημιουργεί τα ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα, τα οποία κατόπιν θα εστεροποιηθούν δίδοντας γένεση στα ενδοκυτταρικά τριακυλγλυκερόλες, φωσφολιπίδια, κ.λ.π.. Η προέλευση του ακετυλο-CoA είναι ξεχωριστή αναλόγως με το γεγονός αν ο μικροοργανισμός είναι ελαιογόνος ή όχι. Το ακετυλο-CoA, το οποίο δημιουργείται μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, είτε θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, είτε το υλικό δόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Όμως, η σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδιακών δομών δεν πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο, αλλά στο κυτταρόπλασμα, ως εκ τούτου το ακετυλο-CoA θα πρέπει εκ νέου να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Η μεμβράνη των μιτοχονδρίων δεν είναι περατή από το ακετυλο-CoA, το οποίο εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια σε σχετικά μικρά ποσά υπό την μορφή της ακετυλο-καρνιτίνης και μόνο για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Gilbert, 1985; Davies και Holdsworth, 1992). Από την άλλη πλευρά, μεγάλες ποσότητες ακετυλο-CoA οφείλουν να ευρίσκονται στο

κυτταρόπλασμα, προκειμένου να μετατραπούν σε λιπαρά οξέα στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Στην πραγματικότητα, για να συμβεί κάτι τέτοιο, η αύξηση θα πρέπει να παύσει να είναι ισόρροπη και ικανός περιορισμός στο εξωκυτταρικό (και κατόπιν ενδοκυτταρικό) άζωτο θα πρέπει να επισυμβεί. Έτσι, αρχικά παρατηρείται πτώση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της μονο-φωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine monophosphate – AMP) που οφείλεται στο ένζυμο απαμινάση της AMP, της οποίας η ενεργότητα αυξάνει με την εξάντληση του αζώτου. Η αντίδραση αυτή ($AMP \longrightarrow IMP + NH_4^+$) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ποσοτήτων αζώτου που θα χρησιμοποιηθούν στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοξέων. Η μείωση της συγκέντρωσης του AMP καταστέλλει τη δράση των ενζύμων 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6-Phosphorofructokinase – 6-PFK), πυροσταφυλική κινάση (Pyruvate kinase – PK) και NAD^+ (και σε μερικές περιπτώσεις επίσης και $NADP^+$) ισοκιτρική αφυδρογονάση (NAD -ICDH και $NADP$ -ICDH) (Galiotou-Panayotou κ.α., 1997; Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Στην περίπτωση του περιορισμού της ενεργότητας της 6-PFK παρατηρείται συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών. Από την άλλη πλευρά, η μείωση της ενεργότητας των NAD -ICDH και $NADP$ -ICDH προκαλεί αναστολή στη λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, με το συσσωρευμένο στα μιτοχόνδρια κιτρικό οξύ να εξέρχεται του μιτοχονδρίου και να αποτελεί υπόστρωμα στο οποίο πραγματοποιείται η πιο κάτω, χαρακτηριστική της σύνθεσης λιπιδίων αντίδραση, όπου σε μεγάλα ποσά συντίθεται ακέτυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα των (κυρίως) ελαιογόνων μικροοργανισμών (Ratledge, 1994, 1997; Papanikolaou και Aggelis, 2011α):



Εικόνα 1.5.2 : Αντίδραση σύνθεσης λιπιδίων

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

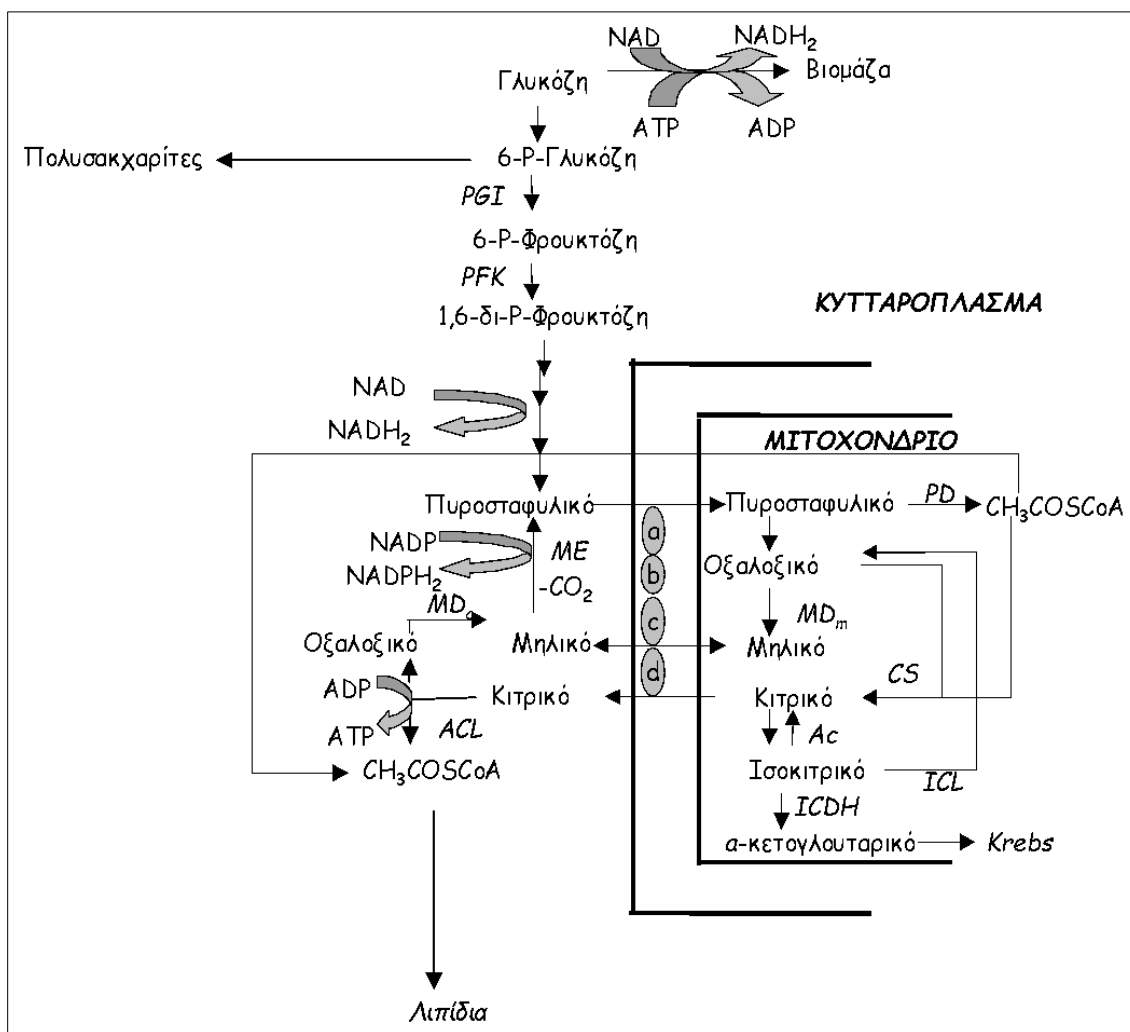


Η αντίδραση αυτή ενεργοποιείται με την παρουσία του κιτρικού οξέος για την ελαιογόνο ζύμη *Candida* sp. 107, αλλά όχι για τη μη-ελαιογόνο *Candida utilis*, ενώ με την απουσία του κιτρικού οξέος το ανωτέρω ένζυμο υπάρχει ως ανενεργός πρωτεΐνη με M.B. $2,4 \times 10^5$ daltons, ενώ η παρουσία του κιτρικού οξέος επάγει τη συσσωμάτωση των ενζυμικών μονομερών σε ένα πολυενζυμικό ενεργό σύστημα με M.B. $7-9 \times 10^6$ daltons (Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Στη συνέχεια, οι ακυλο-μεταφοράσες μεταφέρουν ακετυλο-ομάδες και μηλονυλο-ομάδες σε μια ακυλο-φέρουσα πρωτεΐνη (Acyl carrier protein-ACP). Έπειτα, το ενζυμικό σύστημα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (Fatty acid synthetase-FAS) προσθέτει διαδοχικά δυο άτομα άνθρακα στη μηλονυλο-ACP, έως ότου το μήκος της αλυσίδας φτάσει τα 16 άτομα άνθρακα.

Η τελική αντίδραση διαφέρει ανάλογα με το μικροοργανισμό {(Βλ. σχετικά Εικόνα 1.5.2), όπου η ροή άνθρακα με το ισομερές πάχος των βελών φαίνεται ισοσκελισμένη τόσο προς τα ενδοκυτταρικά λιπίδια, όσο και προς τα ενδοκυτταρικά πολυσακχαρίδια, όσο και προς τον κύκλο του Krebs. Ένζυμα: ACL: ATP-κιτρική λυάση, PGI: Ισομεράση της φωσφορογλυκόζης,

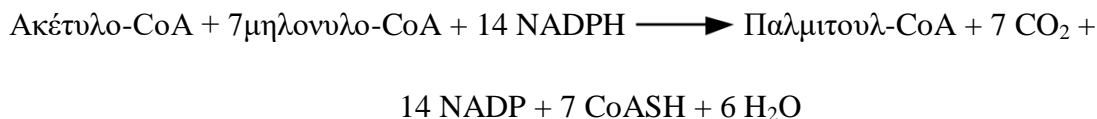
PFK: Φωσφοφρουκτοκινάση, ICDH: Ισοκιτρική αφυδρογονάση, PD: Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, CS: Κιτρική συνθάση, ICL: Ισοκιτρική λυάση (προσαρμογή σχημάτων από τους Zhong και Tang, 2004; Papanikolaou και Aggelis, 2011α).

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η βιοσυσσώρευση λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και η έκκριση κιτρικού οξέος κατά την καλλιέργεια τους σε γλυκόζη ή γλυκερόλη.



Σχήμα 1.5.2: Διάμεσος μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκερόλης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Παραγωγή κιτρικού οξέος και/ή μικροβιακού λίπους. a, b, c: Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτόπλασμα στο μιτοχόνδριο και του μηλικού οξέος αντιστρόφως. d: Σύστημα μεταφοράς του κιτρικού και του μηλικού οξέος μεταξύ κυτοπλάσματος και μιτοχονδρίου. TAGs: τριγλυκερίδια, EMP: Embden- Mayerhoff-Parnas (Papanikolaou 2008).

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



Τα διάφορα συμβαίνουντα (σύνθεση πολυσακχαριτών, σύνθεση λιπιδίων μέσω ACL για τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σύνθεση λιπιδίων μέσω απ' ευθείας συμπύκνωσης του ακέτυλο-CoA για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς) σε επίπεδο διάμεσου μεταβολισμού παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα της Εικόνας 1.5.2.

1.6 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (YAE/Olive-mill wastewater – OMWW)

1.6.1 Μέθοδοι παραγωγής ελαιολάδου

Η παραλαβή του ελαιολάδου πραγματοποιείται έπειτα από σύνθλιψη των καρπών με μηχανικά μέσα. Τα βασικά στάδια της διαδικασίας εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, είναι το σπάσιμο του καρπού, η μάλαξη της ελαιοζύμης και ο διαχωρισμός του ελαιολάδου μέσω πίεσης και φυγοκέντρησης (Galanakis, 2017) . Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Συγκομιδή του καρπού

Η συγκομιδή του ελαιόκαρπου πραγματοποιείται στο βέλτιστο στάδιο της ωρίμανσής του (στάδιο βιομηχανικής ωρίμανσης), με σκοπό να εξασφαλιστεί η υψηλότερη δυνατή ελαιοπεριεκτικότητα καθώς και η παραγωγή ελαιολάδου υψηλής ποιότητας. Επίσης για την εξασφάλιση της καλύτερης ποιότητας θα πρέπει να περιορίζονται οι τραυματισμοί κατά την μεταφορά του ελαιόκαρπου στο ελαιοτριβείο και να υπάρχει επαρκής αερισμός. Συνήθως η μεταφορά γίνεται σε πλαστικά τελάρα με οπές για τον καλλίτερο αερισμό (Salvador κ.α., 2001).

2. Αποφύλλωση – Πλύσιμο – Σπάσιμο

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείτε απομάκρυνση των φύλλων, κλαδιών και μίσχων καθώς σε περίπτωση παραμονής τους, παράγεται ελαιόλαδο με μεγάλη ποσότητα χλωροφύλλης, η οποία κατά την διάρκεια αποθήκευσης και παρουσία φωτός, επιδρά αρνητικά στην ποιότητα του ελαιολάδου καθώς συμβάλει στην οξειδωση του (Giuliani κ.α., 2001). Στη συνέχεια ακολουθεί πλύσιμο του καρπού για την απομάκρυνση ξένων υλών όπως σκόνη χώμα και φυτοφάρμακα. Έπειτα ο ελαιόκαρπος μεταφέρεται στον σπαστήρα, όπου πραγματοποιείται το σπάσιμο του σε μεγάλο αριθμό στροφών (Galanakis, 2017).

3. Μάλαξη

Η μάλαξη είναι το σημαντικότερο στάδιο της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου, καθώς σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείτε συνένωση των μικρών σταγονιδίων του ελαίου σε μεγαλύτερες σταγόνες, ώστε να διαχωριστεί πιο εύκολα από την υδατική φάση. Μέσω της κυκλοφορίας ζεστού νερού από τα διπλά τοιχώματα του μαλακτήρα επιτυγχάνεται αύξηση της θερμοκρασίας της ελαιοζύμης, η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να γίνει η εξαγωγή του ελαιολάδου από τα φυτικά κύτταρα. Η θερμοκρασία της ελαιοζύμης δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 30 °C και η διάρκεια της μάλαξης να μην ξεπερνά τα 90 λεπτά (Alonso κ.α., 1994). Τέλος η ελαιοζύμη δεν πρέπει να έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα γιατί έτσι χάνονται μια σειρά οργανοληπτικών συστατικών από τα οποία εξαρτώνται το άρωμα, η οσμή και η γεύση του ελαιολάδου (Galanakis, 2017).

4. Διαχωρισμός ελαιολάδου

Όταν έχει επιτευχθεί η μάλαξη, η ελαιοζύμη είναι έτοιμη για την φάση του διαχωρισμού του ελαιολάδου από αυτήν. Η παραπάνω διεργασία πραγματοποιούταν, παραδοσιακά, με την χρήση υδραυλικών πιεστηρίων. Μέσω της συμπίεσης της ελαιοζύμης γίνεται διαχωρισμός της υγρής φάσης, δηλαδή του ελαιολάδου, των φυτικών υγρών και των νερών έκπλυσης από την στερεή φάση. Τέτοιου είδους πιεστήρια μπορούν να κρατήσουν μέχρι 500 kg ελαιοπολτού ανά πίεση, ενώ η διεργασία διαρκεί έως και 2 ώρες. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μια ασυνεχής διεργασία, αφού ο διαχωρισμός της υγρής φάσης, προκειμένου να παραληφθεί το ελαιόλαδο, πραγματοποιείται σε επόμενο στάδιο με φυγοκέντριση σε κατακόρυφο διαχωριστήρα. Οι πιο

σύγχρονες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό του ελαιολάδου αφορούν τη χρήση φυγοκεντρικών συστημάτων διαχωρισμού δύο ή τριών φάσεων. Στα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού τριών φάσεων, ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη γίνεται μέσω φυγοκέντρισης σε οριζόντιους τριφασικούς φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες (decanters). Για την παραγωγή του ελαιολάδου (1η φάση), καταναλώνονται σημαντικές ποσότητες νερού και ως συνέπεια προκύπτουν ποσότητες υγρών αποβλήτων (2η φάση). Επιπλέον, παράγεται η ελαιοπυρήνα (3η φάση), η οποία αντιστοιχεί στα στερεά συστατικά του ελαιοκάρπου (Petraakis, 2006). Στα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού δύο φάσεων, τα συστατικά του ελαιοκάρπου τροφοδοτούνται στον φυγοκεντρικό διαχωριστήρα δύο φάσεων και διαχωρίζονται στο ελαιόλαδο (1η φάση) και στα υπόλοιπα συστατικά της ελιάς (πούλπα, φυτικά υγρά), που στο σύνολό τους αποτελούν τη διφασική ελαιοπυρήνα (2η φάση) (Galanakis, 2017).

1.6.2 Απόβλητα διεργασιών παραλαβής ελαιολάδου

Η εμπορική καλλιέργεια ελιάς και η βιομηχανία παραγωγής ελαιολάδου, παράγουν μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων, για παράδειγμα μόνο από το κλάδεμα των ελαιόδεντρων παράγονται 25 kg κλαδιών και φύλλων ανά δέντρο ετησίως. Παρόλα αυτά τα απόβλητα των διεργασιών παραλαβής του ελαιολάδου αποτελούν την κύρια περιβαλλοντική ανησυχία της βιομηχανίας λόγω του μεγάλου ρυπαντικού φορτίου που διαθέτουν. Η ποσότητα και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων αποβλήτων δεν είναι σταθερά, αλλά εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως τον τύπο του συστήματος και της διαδικασίας παραλαβής του ελαιολάδου, την ποικιλία και την σύσταση του ελαιοκάρπου καθώς και από τις λειτουργικές συνθήκες της μονάδας (προστιθέμενο νερό, θερμοκρασία, κ.λ.π.).

Στα στερεά απόβλητα ανήκουν ο ελαιοπυρήνας, τα κλαδιά, τα φύλλα και οι πέτρες. Υπολογίζεται ότι κατά τη διάρκεια της αποφύλλωσης παράγονται 3-5 kg ελαιόφυλλα από 100 kg ελαιοκάρπου στο ελαιοτριβείο. Ωστόσο τα παραπροϊόντα αυτά δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερο πρόβλημα στην διαχείριση τους. Αντίθετα τα υγρά απόβλητα ελαιουργίας (ΥΑΕ) παρουσιάζουν μεγάλα προβλήματα κατά την διαχείριση τους λόγω του μεγάλου ρυπαντικού φορτίου που διαθέτουν. Τα ΥΑΕ αποτελούν το κύριο παραγόμενο παραπροϊόν των τριφασικών συστημάτων διαχωρισμού του ελαιολάδου και των παραδοσιακών υδραυλικών πιεστηρίων και συνίστανται από τα φυτικά υγρά του ελαιοκάρπου και το νερό που χρησιμοποιείται στα διάφορα στάδια

διαχωρισμού του ελαιολάδου. Εκτός από τα ΥΑΕ τα τριφασικά συστήματα διαχωρισμού παράγουν και ένα στερεό απόβλητο το οποίο χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του πυρηνέλαιου, το οποίο είναι λάδι που προέρχεται από την επεξεργασία του πυρήνα και της ψίχας της ελιάς. Τέλος από τα συστήματα διαχωρισμού του ελαιολάδου δυο φάσεων παράγεται ένα ημίρρευτο απόβλητο το οποίο καλείται υγρή ελαιοπυρήνα. Το συγκεκριμένο απόβλητο διαθέτει έντονη οσμή και μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία, γεγονός που καθιστά τη μεταφορά και την επεξεργασία του ιδιαίτερα δύσκολη. Χρησιμοποιείται για την εξαγωγή λαδιού μέσω διαλυτών μετά από την ξήρανση του μέσω ηλιακής ακτινοβολίας.

1.6.3 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ)

Σύσταση

Η σύσταση των ΥΑΕ παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση και εξαρτάτε από διάφορους παράγοντες όπως την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης του ελαιόκαρπου, την ποσότητα προστιθέμενου νερού και την διαδικασία διαχωρισμού του ελαιολάδου. Χαρακτηρίζεται από σκούρο (καστανό – μαύρο) χρώμα και υψηλή οξύτητα ($\text{pH} \approx 5$). Πιο συγκεκριμένα τα ΥΑΕ περιέχουν 83-94% νερό, 4-16% οργανική ουσία και 0,4-2,5% ανόργανα άλατα (Galanakis, 2017). Η οργανική ουσία των ΥΑΕ αποτελείται από λάδι (1-14%), πολυσακχαρίτες (13-53%), πρωτεΐνες (8-16%), οργανικά οξέα (3-10%), πολυαλκοόλες (3-10%) και πολυφαινόλες (2-15%) (Fiestas Ros Ursinos, 1986; Martinez Nieto κ.α., 1994). Τα ανόργανα συστατικά αποτελούνται κυρίως από κάλιο (0,73 – 8,6 g/L), ασβέστιο (0,03 – 1,1 g/L) και νάτριο (0,05 – 0,8 g/L). Τέλος τα ΥΑΕ περιέχουν και μικροποσότητες ιχνοστοιχείων όπως σίδηρο, χαλκό και ψευδάργυρο (Galanakis, 2017).

Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερεύοντος μεταβολισμού του ελαιόδεντρου και είναι υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τη θρεπτική αξία του ελαιολάδου. Λόγω της υδατοδιαλυτότητάς τους, μεταφέρονται, ως επί τω πλείστων, στην υδατική φάση της διαδικασίας εκχύλισης του ελαιολάδου, δηλαδή στα ΥΑΕ. Στα ΥΑΕ ανιχνεύονται πάνω από 50 διαφορετικές φαινόλες μαζί με αλκοόλες, αλδεύδες και άλλες μικρομοριακές ενώσεις (Tomati

και Galli, 1992). Η ανάλυση φρέσκων υγρών αποβλήτων ελαιουργείου έδειξε ότι τα φαινολικά χωρίζονται σε 3 κατηγορίες (Hamdi, 1991):

1. Φαινολικές ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους, πάνω από 20.000, που είναι υπεύθυνες για το μαύρο χρώμα. Στην κατηγορία περιλαμβάνονται οι λιγνίνες και συστατικά αυτοοξειδωσης των συστατικών της δεύτερης κατηγορίας.
2. Συστατικά μοριακού βάρους μικρότερου από 20.000, που είναι υπεύθυνα για το κόκκινο χρώμα. Περιλαμβάνει τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες, των οποίων η συγκέντρωση φτάνει τα 12 g/L.
3. Περιλαμβάνει φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, που είναι υπεύθυνες για το υποκίτρινο χρώμα.

1.6.4 Μέθοδοι επεξεργασίας ΥΑΕ

Τα ΥΑΕ αποτελούν ένα από τα πιο ρυπογόνα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων, λόγω του μεγάλου οργανικού τους φορτίου καθώς και λόγω της παρουσίας ενός μεγάλου εύρους ρύπων όπως λιπαρά οξέα, φαινολικές ενώσεις και ταννίνες. Λόγο του υψηλού οργανικού φορτίου και της μεγάλης περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλή βιοαποικοδόμηση και υψηλή φυτοτοξικότητα. Τα ΥΑΕ απορρίπτονται συνήθως σε μεγάλες λιμνοδεξαμενές, όπου πραγματοποιείται εξάτμιση και ξήρανση του αποβλήτου μέσω ηλιακής ακτινοβολίας, αλλά και σε άλλους περιβαλλοντικούς αποδέκτες όπως ρυάκια, ποτάμια, λίμνες και εκτάσεις γης, προκαλώντας έντονες και δυσάρεστες οσμές, ρύπανση του εδάφους, αναστολή ανάπτυξης των φυτών καθώς και σοβαρή ρύπανση του φυσικού υδροφόρου ορίζοντα. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι τα ΥΑΕ πρέπει να επεξεργάζονται κατάλληλα ώστε να μην δημιουργούνται προβλήματα κατά την διάθεση τους στο περιβάλλον.

Οι μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων διακρίνονται σε φυσικές, φυσικοχημικές, θερμικές και βιολογικές. Παρακάτω παρουσιάζονται, αναφορικά, ορισμένες από τις μεθόδους αυτές.

Φυσικές Μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι επεξεργασίας των ΥΑΕ αποσκοπούν στον διαχωρισμό των διαφορετικών φάσεων του αποβλήτου μέσω διαφόρων μηχανικών διεργασιών.

1. Αραίωση

Η διεργασία της αραίωσης αποτελεί την απλούστερη μέθοδο ελάττωσης του οργανικού φορτίου των ΥΑΕ. Ως αραιωτικό μέσο χρησιμοποιείται νερό δεύτερης ποιότητας ή κάποιο άλλο παραπροϊόν της παραγωγικής διαδικασίας με χαμηλότερο οργανικό φορτίο όπως τα απόνερα που προκύπτουν από το πλύσιμο του ελαιόκαρπου. Μέσω της συγκεκριμένης διεργασίας πραγματοποιείται μείωση του ρυπαντικού φορτίου έτσι ώστε το απόβλητο να μπορέσει να οδηγηθεί σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων. Ωστόσο λόγω του υψηλού ρυπαντικού φορτίου των ΥΑΕ απαιτητέ μεγάλη αραίωση, τουλάχιστον 1:100, κάνοντας έτσι την διεργασία της αραίωσης δύσκολη να εφαρμοστεί σε περιοχές που διαθέτουν περιορισμένους υδάτινους πόρους (Boari και Mancini, 1990).

2. Ιζηματοποίηση/Καθίζηση

Η ιζηματοποίηση αποτελεί την συνηθέστερη φυσική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των ΥΑΕ. Μέσω αυτής της μεθόδου, με παραμονή δηλαδή του ΥΑΕ σε ηρεμία για περίπου 10 ημέρες, δημιουργούνται δυο υγρές στοιβάδες, μια υπερκείμενη υδάτινη στοιβάδα με χαμηλό COD και μια λασπώδη στοιβάδα υψηλού COD. Η λασπώδης στοιβάδα απομακρύνεται χρησιμοποιώντας ένα συμβατικό σύστημα άντλησης και οδηγείτε σε σύστημα ξήρανσης με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως στερεό καύσιμο ή ως λίπασμα σε διάφορες καλλιέργειες. Λόγω του ότι τα περισσότερα οργανικά συστατικά που περιέχονται στα ΥΑΕ βρίσκονται σε μορφή αιωρούμενων στερεών, μέσω απομάκρυνσης τους με διεργασίες καθίζησης προκύπτει σημαντική ελάττωση του COD και του BOD της διαλυτής φάσης του αποβλήτου (Al-Malah κ.α., 2000; Georgacakis και Dalis, 1993).

3. Φυγοκέντριση

Μέσω της φυγοκέντρωσης των ΥΑΕ δημιουργούνται τρεις στοιβάδες, μια επιφανειακή στοιβάδα η οποία περιέχει τα έλαια, μια ενδιάμεση υδάτινη στοιβάδα η οποία περιέχει τα υδατοδιαλυτά υλικά και μια λασπώδη στοιβάδα η οποία περιέχει τα αιωρούμενα στερεά και τα κολλοειδή υλικά. Οι Mitrakas κ.α. (1996) απέδειξαν ότι η φυγοκέντριση είναι μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος επεξεργασίας των ΥΑΕ καθώς μπορεί να ελαττώσει το αρχικό COD της υδάτινης στοιβάδας μέχρι και 70% και επίσης να πετύχει ανάκτηση των ελαίων κατά 30 – 50%. Ακόμη τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι καλύτερα όταν η διεργασία πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον (παρουσία H_2SO_4), όπου το COD μειώθηκε κατά 67,8% και η ανάκτηση των ελαίων ανήλθε στο 47%, ωστόσο τα παραλαμβανόμενα έλαια είναι κατώτερης ποιότητας καθώς σε χαμηλές τιμές pH αυτά υδρολύονται. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου λαμβάνεται περισσότερη και πιο συνεκτική λασπώδη ύλη σε σχέση με την μέθοδο της ιζηματοποίησης.

Φυσικοχημικές μέθοδοι

Στις διεργασίες αυτές χρησιμοποιούνται χημικά πρόσθετα με σκοπό την προσρόφηση των οργανικών συστατικών των ΥΑΕ ή τη χημική οξείδωσή τους.

1. Προσρόφηση

Η διεργασία της προσρόφησης αποτελεί μια φυσικοχημική μέθοδο επεξεργασίας των ΥΑΕ κατά την οποία τα διαλυτά οργανικά μόρια αποχωρίζονται την υγρή φάση και προσροφώνται στην επιφάνεια ενός στερεού, προσροφητικού μέσου. Ως προσροφητικό μέσο χρησιμοποιείται συνήθως ο ενεργός άνθρακας, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλή προσροφητική ικανότητα η οποία οφείλεται στην μεγάλη ειδική του επιφάνεια. Μέσω της προσρόφησης απομακρύνονται οι χρωστικές ουσίες, οι ουσίες που προκαλούν οσμές, ουσίες που βιοαποικοδομούνται δύσκολα καθώς και ουσίες που παρεμποδίζουν την διαδικασία βιοαποικοδόμησης (Paraskeva και Diamadopoulos, 2006).

2. Χημική οξείδωση

Κατά την διεργασία της χημικής οξείδωσης χρησιμοποιούνται διάφορα οξειδωτικά μέσα όπως οξυγόνο, παράγωγα οξυγόνου (όζον, υπεροξειδίο του υδρογόνου), χλώριο, παράγωγα χλωρίου και υπερμαγγανικό κάλιο καθώς και μίγματα των παραπάνω. Η χρήση του όζοντος ως οξειδωτικό μέσω προτιμάτε καθώς διαθέτει μεγάλη οξειδωτική ικανότητα. Μέσω αυτού διασπώνται οι διπλοί δεσμοί των φαινολικών ενώσεων και το απόβλητο καθίσταται πιο επιδεκτικό σε περαιτέρω βιολογική αποικοδόμηση (γίνεται λιγότερο τοξικό), χωρίς να παρατηρείται ουσιαστική ελάττωση στο COD. Επιπλέον, το όζον επιδρά στον αποχρωματισμό των αποβλήτων, καθώς τα χρώματα στα φυτικά εκχυλίσματα οφείλονται σε ενώσεις που περιέχουν διπλούς και τριπλούς δεσμούς άνθρακα (Niaounakis και Halvadakis, 2004).

Θερμικές μέθοδοι

Οι θερμικές μέθοδοι αποσκοπούν στην συμπίκνωση των ΥΑΕ, απομακρύνοντας το περιεχόμενο νερό μέσω τεχνητών πηγών παροχής θερμότητας ή μέσω φυσικών πηγών παροχής θερμικής ενέργειας όπως ο αέρας και η ηλιακή ακτινοβολία.

1. Φυσικο-θερμικές διεργασίες

Αυτή η κατηγορία αναφέρεται στις διεργασίες της συμπίκνωσης και της απόσταξης. Μέσω αυτών των διεργασιών το ρυπαντικό φορτίο του αποβλήτου δύναται να μειωθεί κατά ένα μεγάλο ποσοστό (μείωση κατά 60-75%). Παρόλα αυτά λόγω του ότι το συμπίκνωμα περιέχει εκτός από νερό διάφορες πτητικές ενώσεις, όπως αλκοόλες και πτητικά οξέα, χαρακτηρίζεται από υψηλή οξύτητα (pH 4 – 4,5) καθώς και από υψηλό BOD (>4 g/L) και COD (>3 g/L) τιμές που καθιστούν την περαιτέρω επεξεργασία του, πριν την απόρριψη ή επαναχρησιμοποίηση του, απαραίτητη. Επίσης η παραγόμενη συμπυκνωμένη «πάστα» χαρακτηρίζεται από υψηλό οργανικό φορτίο, με αποτέλεσμα η καύση της με σκοπό την παραγωγή θερμικής ενέργειας να παράγει σημαντικές ποσότητες αέριων ρύπων. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι συγκεκριμένες διεργασίες χαρακτηρίζονται από υψηλά κόστη, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης ενέργειας που απαιτούν καθώς και λόγω του υψηλού κόστους του εξοπλισμού ο οποίος πρέπει να είναι φτιαγμένος από υλικά τα οποία αντιστέκονται στην διάβρωση (Niaounakis και Halvadakis, 2004; Rozzi και Malpei, 1996).

2. Αναντίστρεπτες χημικο-θερμικές διεργασίες

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι διεργασίες της καύσης και της πυρόλυσης, οι οποίες είναι θερματικές τεχνικές και δεν επιτρέπουν την περαιτέρω επεξεργασία ή αξιοποίηση των ΥΑΕ. Είναι διεργασίες οι οποίες είναι δυνατόν να μειώσουν σημαντικά το ρυπαντικό φορτίο του αποβλήτου καθώς επίσης χρησιμοποιούνται και ως πηγές παροχής θερμικής ενέργειας. Ωστόσο και οι δύο διεργασίες χαρακτηρίζονται από υψηλά κόσθη, λόγω των προβλημάτων που δημιουργούν στο περιβάλλον με την εκπομπή τοξικών αέριων ρύπων, απαιτούν μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και ακριβά συστήματα καύσης/πυρόλυσης (Parakeva και Diamadopoulos, 2006).

Βιολογικές μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας των ΥΑΕ βασίζονται σε μικροοργανισμούς για την αποδόμηση των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν σε αυτά τα απόβλητα. Χωρίζονται σε αερόβιες και αναερόβιες διεργασίες, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Χαρακτηρίζονται ως διεργασίες φιλικές προς το περιβάλλον, αποδοτικές και αξιόπιστες. Παρόλα αυτά θα πρέπει να δίνεται προσοχή στην επιλογή των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των ΥΑΕ καθώς αυτά περιέχουν φαινολικές ενώσεις οι οποίες δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη τους. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μέσω αυτών των διεργασιών παράγονται προϊόντα του δευτερογενή μεταβολισμού των μικροοργανισμών τα οποία διαθέτουν εμπορική αξία και μπορούν να καλύψουν ένα μέρος της δαπάνης της διεργασίας (Parakeva και Diamadopoulos, 2006).

1. Αναερόβιες διεργασίες

Κατά την αναερόβια ζύμωση πραγματοποιείται μια σειρά μικροβιολογικών διεργασιών μέσω των οποίων γίνεται μετατροπή της οργανικής ύλης των αποβλήτων σε μεθάνιο (CH_4) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) απουσία οξυγόνου. Στις αναερόβιες διεργασίες χρησιμοποιούνται κύριος βακτήρια και περιλαμβάνουν τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο υδρολύονται οι σύνθετες οργανικές ενώσεις, όπως οι πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες, στα μονομερή τους (απλά σάκχαρα και φαινόλες, αντίστοιχα). Αυτά τα μόρια κατά το δεύτερο στάδιο της διεργασίας μετατρέπονται από οξεογόνα βακτήρια σε οργανικά οξέα, όπως οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ,

μεθανικό οξύ και αλκοόλες. Στο τελευταίο στάδιο της διεργασίας μεθανογενή βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από ευαισθησία στις χαμηλές τιμές pH και στις αλλαγές θερμοκρασίας, μετατρέπουν τα οργανικά οξέα σε βιοαέριο (ένα μίγμα με 60-80% μεθάνιο και άλλα αέρια, με κύριο το διοξείδιο του άνθρακα) (Sabbah κ.α., 2004). Η μέθοδος αυτή θεωρείται μια από τις πιο αποδοτικές μεθόδους επεξεργασίας των ΥΑΕ καθώς ενδείκνυται για την επεξεργασία αποβλήτων με υψηλό ρυπαντικό φορτίο, απαιτεί χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και παράγεται μεθάνιο το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί μετά από κατάλληλη επεξεργασία. Παρόλα αυτά θα πρέπει να δίνεται προσοχή, λόγω του ότι η συγκεκριμένη διεργασία επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η χημική σύσταση του αποβλήτου και η ποσότητα τοξικών ουσιών που περιέχονται σε αυτό. Λαμβάνει χώρα στη μεσόφιλη και θερμόφιλη φάση και έχει διάρκεια που κυμαίνεται μεταξύ 10 και 35 ημέρες (Niaounakis και Halvadakis, 2004; Rozzi και Malpei, 1996; Parakeva και Diamadopoulos, 2006).

2. Αερόβιες διεργασίες

Κατά τις αερόβιες διεργασίες χρησιμοποιούνται αερόβιοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι καταναλώνουν τα ανόργανα άλατα και τις πηγές άνθρακα του αποβλήτου ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξή τους, παρουσία οξυγόνου. Δρουν οξειδώνοντας τις οργανικές ενώσεις με αποτέλεσμα την μείωση του οργανικού φορτίου του απόβλητου καθώς επίσης παράγουν βιομάζα και χρήσιμα προϊόντα του δευτερογενή τους μεταβολισμού. Μειονέκτημα της διεργασίας αυτής είναι η απαίτηση σε συνεχή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών, ενώ εμφανίζει χαμηλή απόδοση σε απόβλητα με μεγάλη συγκέντρωση COD και φαινολικών ενώσεων. Επίσης, έχει μικρό ποσοστό αποχρωματισμού επειδή η κινητική απομάκρυνσης του αδρανούς κλάσματος είναι αργή. Οι αερόβιες τεχνολογίες περιλαμβάνουν τα βιόφιλτρα, συστήματα ενεργού ιλύος, βιόδισκους, οξειδωτικές τάφρους, αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και ελεγχόμενους υδροβιότοπους. Γενικά, λόγω μεγάλων ενεργειακών απαιτήσεων και αναγκών σε θρεπτικά συστατικά, αλλά και λόγω της μεγάλης παραγωγής βιολογικής λάσπης η οποία πρέπει να απομακρυνθεί από το σύστημα, η αερόβια βιολογικά επεξεργασία ΥΑΕ δεν προτιμάται συνήθως (Niaounakis και Halvadakis, 2004; Rozzi και Malpei, 1996; Parakeva και Diamadopoulos, 2006).

3. Χρήση βασιδιομυκήτων

Η καλλιέργεια βασιδιομυκήτων σε θρεπτικά μέσα στα οποία προστίθενται ΥΑΕ με σκοπό την μείωση του ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου (μείωση φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμός αποβλήτου) είναι μια διεργασία με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οι βασιδιομυκήτες λευκής σήψης είναι ικανοί να παράγουν λιγνολυτικά ένζυμα τα οποία μπορούν να αποδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα ΥΑΕ λόγω της παρόμοιας δομής τους με την λιγνίνη. Συγκεκριμένα οι Zerva κ.α. (2017), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού των στελεχών *P. citrinopileatus* LGAM 28684 και *I. lacteus* LGAM 238, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΑΕ (25%). Και τα δύο στελέχη έδωσαν πολύ καλά αποτελέσματα με το *P. citrinopileatus* να επιτυγχάνει μέγιστη μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά (86,4 %) και μέγιστο αποχρωματισμό κατά (79,1 %) και με το *I. lacteus citrinopileatus* να επιτυγχάνει μέγιστη μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά (86,4 %) και μέγιστο αποχρωματισμό κατά (86,3 %) μετά από ζύμωση με διάρκεια 22 ημέρες. Επίσης οι Ntougias κ.α. (2012), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού διαφόρων στελεχών του γένους *Ganoderma* και του γένους *Pleurotus*, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΑΕ (25%). Η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων μειώθηκε σημαντικά από όλα τα στελέχη του γένους *Ganoderma* (μείωση κατά 40,8 – 43,5% και 60,4 – 65,0%, μετά από 10 και 20 ημέρες ζύμωσης αντίστοιχα), ενώ τα καλύτερα αποτελέσματα αποχρωματισμού παρουσίασαν τα στελέχη *G. australe* και *G. camosum* με ποσοστά αποχρωματισμού 40,2% και 31,5% μετά από 20 ημέρες ζύμωσης. Από τα είδη του γένους *Pleurotus*, καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν τα στελέχη *P. ostreatus* και *P. eryngii* με ποσοστά μείωσης των φαινολικών ενώσεων κατά 62,5% και 73,9% αντίστοιχα, μετά από 20 ημέρες ζύμωσης και με ποσοστά αποχρωματισμού 44,0% και 64,8% αντίστοιχα, μετά από 30 ημέρες ζύμωσης. Ακόμη οι Fountoulakis κ.α. (2002), μελέτησαν την ικανότητα μείωσης των περιεχόμενων στα ΥΑΕ φαινολικών ενώσεων του στελέχους *P. ostreatus* LGAM P69 σε υγρές καλλιέργειες κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Το πρώτο περιείχε 50% ΥΑΕ και 50% νερό και αποστειρώθηκε στους 120 °C, το δεύτερο περιείχε 50% ΥΑΕ και 50% νερό και επεξεργάστηκε θερμικά στους 100 °C και το τρίτο περιείχε μόνο ΥΑΕ και επεξεργάστηκε θερμικά στους 100 °C. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι ο μύκητας *P. ostreatus* μείωσε την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων κατά 78,3% στο πρώτο θρεπτικό μέσο, κατά

66,7% στο δεύτερο και κατά 64,7% στο τρίτο. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι βασιδιομύκητες διαθέτουν μεγάλη ικανότητα απορρύπανσης των ΥΑΕ και συνεπώς η καλλιέργεια τους με σκοπό την επεξεργασία και αποτοξίνωση των ΥΑΕ είναι μια διεργασία η οποία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και θετικές προοπτικές ως μέθοδος βιολογικής επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό Υλικό

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα εδώδιμα μανιτάρια *Agrocybe aegerita*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju* και *Flammulina velutipes*, τα οποία ανήκουν στην κλάση των βασιδιομυκήτων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα στελέχη που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1, τα οποία υπάρχουν στην τράπεζα καλλιέργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. Όλες οι καθαρές καλλιέργειες των στελεχών έχουν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Darmstadt, Germany) και διατηρούνται με την μορφή εμβολίου μέσα σε αποστειρωμένο νερό στους 4 °C. Σε κάθε νέο πείραμα πραγματοποιείται ανανέωση των στελεχών σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο (GPYSA) που περιέχει καθαρή γλυκόζη [D(+)]glucose, Alpha Aesar, Karlsruhe, Germany], εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Fluka, Steinheim, Germany) και σε μικρές συγκεντρώσεις μέταλλα και ιχνοστοιχεία (Πίνακας 2.2). Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης στους 25 (± 1) °C. Η ανανέωση των στελεχών πραγματοποιείται έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι πάντα ηλικίας 7-10 ημερών.

Πίνακας 2.1 Στελέχη εδώδιμων μυκήτων που δοκιμάστηκαν στο παρόν έργο.

ΜΥΚΗΤΑΣ	AMRL	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>Agrocybe aegerita</i>	101	A
<i>Agrocybe aegerita</i>	104	E
<i>Lentinula edodes</i>	125	E
<i>Lentinula edodes</i>	126	E
<i>Pleurotus sapidus</i>	156-1	A
<i>Pleurotus sapidus</i>	156-2	A
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	197	A
<i>Flammulina velutipes</i>	271	E

A: Αυτοφύες στέλεχος

E: Εμπορικό στέλεχος

Πίνακας 2.2 : Συγκεντρώσεις συστατικών του θρεπτικού μέσου GPYSA που χρησιμοποιήθηκε για την ανανέωση των στελεχών καθώς και στο πείραμα γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των μυκήτων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1

ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ GPYSA	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΣΕ (g/L)
Γλυκόζη	30,0
Εκχύλισμα ζύμης	1,0
Άγαρ	20,0
KH ₂ PO ₄	7,0
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,15
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,06
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρού απόβλητου ελαιουργίας (ΥΑΕ)

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υγρού απόβλητου ελαιουργίας που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3). Ο προσδιορισμός του pH έγινε με την συσκευή Jenway 3020 pH meter (Essex, UK), ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller, 1959), ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, ο προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης και ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Bradford, όπως αυτές περιγράφονται παρακάτω.

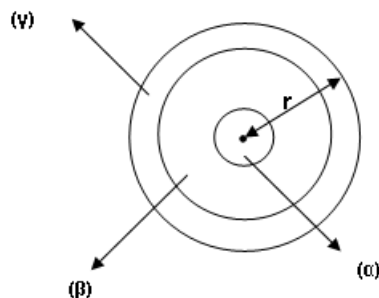
Πίνακας 2.3 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υγρού απόβλητου ελαιουργίας που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ΥΑΕ	
Ολικά Σάκχαρα	30 g/L
Φαινολικές ενώσεις	10 g/L
Ελεύθερες αμινομάδες	0.705 g/L
Πρωτεΐνες	0.7 g/L
pH	4.80

2.3 Μέτρηση της ταχύτητας γραμμικής αύξησης μυκηλίου

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η ταχύτητα ανάπτυξης των στελεχών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο GPYSA (Πίνακας 2.2), καθώς και σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο GPYSA στο οποίο έγινε προθήκη ΥΑΕ, σε αναλογίες 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (v/v) με σκοπό τα θρεπτικά μέσα αυτά να περιέχουν φαινολικές ενώσεις με τις παρακάτω συγκεντρώσεις, 0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L, 2,5 g/L, 3 g/L, 3,5 g/L, 4 g/L, 4,5 g/L, 5 g/L. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C (1,1 atm) για 20 min και στην συνέχεια αφού απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έγινε η πλήρωση των τρυβλίων. Ο εμβολιασμός των τρυβλίων με τα στελέχη έγινε με την τοποθέτηση ενός εμβολίου διαμέτρου 9mm στο κέντρο κάθε τρυβλίου. Τα εμβόλια των μυκήτων ελήφθησαν από προϋπάρχουσες, καθαρές καλλιέργειες, νεαρής ηλικίας, των παραπάνω στελεχών. Αφού εμβολιάστηκαν όλα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης, σε θερμοκρασία 25±1 °C. Συνολικά εμβολιάστηκαν από 3 τρυβλία για κάθε στέλεχος.

Οι μετρήσεις ξεκίνησαν από την στιγμή που το μέτωπο ανάπτυξης των μυκηλίων έγινε 10 mm και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν ανά 48 ώρες. Η καταγραφή του ρυθμού της μυκηλιακής αύξησης έγινε με μέτρηση της αύξησης της μέσης διαμέτρου της αποικίας κατά μήκος δυο κάθετων αξόνων (Εικόνα 2.3) από το κέντρο του εμβολίου και μέχρις ότου η αποικία κάλυψε την επιφάνεια του τρυβλίου (90mm). Η γραμμική ταχύτητα αύξησης K_r (mm/day) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο $r = r_0 + K_r t$, όπου r_0 και r είναι η ακτίνα της αποικίας σε χρόνους 0 και t αντίστοιχα.



Εικόνα 2.3: Τυπική απεικόνιση της ζώνης αύξησης μυκηλιακής αποικίας, (α) περιοχή που αυτολύεται βαθμιαία, (β) τμήμα που δεν συμμετέχει ή συμμετέχει ελάχιστα στην αύξηση και (γ) περιφερειακή ζώνη (w), όπου η μυκηλιακή μάζα αυξάνει εκθετικά, r = ακτίνα αποικίας

2.4 Πειράματα ζυμώσεων βυθού σε φιάλες

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκαν τα στελέχη των εδώδιμων μυκήτων *L. edodes*, AMRL 126, *P. sapidus*, AMRL 156-2, *P. sajor-caju*, AMRL 197 και *F. velutipes*, AMRL 271, ως προς την κινητική παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, καθώς και ως προς την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού των παραπάνω στελεχών, σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ΥΑΕ (υγρό απόβλητο ελαιουργείου), σε καλλιέργειες βυθού κλειστού τύπου οι οποίες δεν αναδεύονταν.

Αρχικά, παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό μέσο GPYSA με σύσταση όπως αυτή που περιγράφεται στον Πίνακα 2.2 (χωρίς προσθήκη άγαρ) καθώς και υγρό θρεπτικό μέσο GPYSA στο οποίο έγινε προσθήκη ΥΑΕ σε αναλογίες 15%, 35% (ν/ν) με σκοπό τα θρεπτικά αυτά μέσα να περιέχουν φαινολικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις 1,5 g/L και 3,5 g/L. Τα παραπάνω θρεπτικά μέσα πληρώθηκαν έως όγκου 30 ml σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 ml, οι οποίες πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους $120 \pm 0,5$ °C για 20 λεπτά. Όταν η θερμοκρασία των φιαλών έφτασε αυτή του περιβάλλοντος, εμβολιάστηκαν με εμβόλιο σε σχήμα ροδέλας διαμέτρου 9 mm με το αντίστοιχο στέλεχος του κάθε μύκητα. Τα εμβόλια των μυκήτων ελήφθησαν από προϋπάρχουσες, νεαρής ηλικίας, καθαρές καλλιέργειες. Τέλος οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 26 ± 1 °C.

2.5 Χημικές αναλύσεις

2.5.1 Συλλογή βιομάζας

Η βιομάζα συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση υπό κενό και με τη χρήση φίλτρων (Whatman No2, Kent, England). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια τύπου MacCartey, καταγράφηκε το νωπό βάρος της βιομάζας με ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB, Darmstadt, Germany). Μετά τη συλλογή βιομάζας ακολούθησε λυοφιλίωση. Η προ ζυγισμένη νωπή βιομάζα καταψύχθηκε για 48 ώρες και μεταφέρθηκε στο λυοφιλιοποιητή (HetoLyolab 3000). Η διαδικασία της λυοφιλίωσης ολοκληρώθηκε σε 48 ώρες, ενώ μετά καταγράφηκε το ξηρό πλέον βάρος της βιομάζας στο ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

2.5.2 Προσδιορισμός pH

Η μέτρηση του pH έγινε αρχικά αμέσως μετά την αποστείρωση του θρεπτικού υλικού και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος της καλλιέργειας, αμέσως μετά την παραλαβή της μυκηλιακής βιομάζας. Ο προσδιορισμός του pH έγινε με την συσκευή Jenway 3020 pH meter (Essex, UK).

2.5.3 Προσδιορισμός σακχάρων

Ο προσδιορισμός των μη καταναλωθέντων αναγόντων σακχάρων από τους μύκητες, δηλαδή της γλυκόζης, στο θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-αμίνο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και η ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου

Για την παρασκευή του αντιδραστήριου DNS ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Σε 500 ml απιονισμένο νερό προστίθενται 200 ml διαλύματος NaOH 2 N, στη συνέχεια κάτω από συνθήκες ήπιας θέρμανσης πραγματοποιείται αργή διάλυση 10 g 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος. Κατόπιν, προστίθενται 300 g τρυγικού καλιονάτριου ($\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και το μίγμα συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Το αντιδραστήριο έχει

έντονο πορτοκαλί χρώμα και είναι σταθερό για πολλές μέρες σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες σκότους.

Σε 0,5 ml δείγματος προστέθηκε 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS και πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο 100 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια ψήχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 5 ml απιονισμένου νερού, και μετά από καλή ανάδευση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείτε 0,5 ml απιονισμένο νερό αντί για δείγμα. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με σύμφωνα με την εξίσωση $y = 1.951x$ όπου y η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων σε (g/L) και x η τιμή της απορρόφησης.

2.5.4 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων

Τα ολικά φαινολικά συστατικά προσδιορίζονται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου υπεριώδους – ορατού (UV-vis), με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή (οξείδωση φαινολικών συστατικών δείγματος) διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin-Ciocalteu reagent) σε φωσφορομολυβδενικό / φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος και σε αλκαλικό περιβάλλον.

Εφαρμογή της μεθόδου

Μετά από κατάλληλες αραιώσεις λαμβάνεται ποσότητα δείγματος 0,2 ml και αναμιγνύεται με 10,8 ml απιονισμένου νερού, 8 ml διαλύματος Na_2CO_3 (75 g/L) και 1 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια το μείγμα αναδεύεται και διατηρείται σε συνθήκες σκότους για δυο ώρες. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθείται για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος, το οποίο χρησιμοποιείται για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, με την διαφορά ότι προστίθενται 0,2 ml απιονισμένου νερού αντί δείγματος. Τέλος λαμβάνεται η απορρόφηση κάθε δείγματος στα 750 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος σύμφωνα με την εξίσωση $y = 2.1423x + 0.0798$ όπου y η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων σε (g/L) και x η τιμή της απορρόφησης.

2.5.5 Αποχρωματισμός

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας αποχρωματισμού ποσότητα 1 ml δείγματος αναμιγνύεται με ποσότητα 29 ml απιονισμένου νερού. Μετά από καλή ανάδευση λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης κάθε δείγματος στα 395 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Με την εφαρμογή του παρακάτω τύπου, % Αποχρωματισμός= $[(A_0-A_1)/A_0] \times 100$, όπου A_0 η απορρόφηση του μηδενικού σημείου της ζύμωσης και A_1 η απορρόφηση του εκάστοτε σημείου της ζύμωσης, προσδιορίζεται το ποσοστό αποχρωματισμού.

2.5.6 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, FreeAminoNitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης.

Παρασκευή αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent): Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από: 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g KH_2PO_4 , διαλυμένα σε 1 L απιονισμένου νερού. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του αντιδραστηρίου το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,60 και 6,80. Ως εκ τούτου, όποτε κρίνεται αναγκαίο το pH διορθώνεται, ώστε να κυμαίνεται εντός του προαναφερθέντος εύρους. Η διόρθωση γίνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 στο διάλυμα. Το αντιδραστήριο χρώσης αποθηκεύεται σε μπουκάλι Duran σε θερμοκρασία 4°C.

Αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution reagent): Αρχικά 2 g KIO_3 διαλύονται σε 616 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθως, 384 ml καθαρής αιθανόλης προστίθενται στο διάλυμα, το οποίο έχει τελικό όγκο 1L.

Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution): Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με διάλυση 0,1072 g γλυκίνης σε 100 ml απιονισμένου νερού και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution): Για να εξασφαλιστεί συγκέντρωση FAN 2 mg/L, διαλύεται 1 ml αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης σε 100 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

Εφαρμογή της μεθόδου:

Αρχικά 2 ml αραιωμένου δείγματος μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πλαστικό καπάκι. Παρασκευάστηκαν επίσης ένα πρότυπο δείγμα, με προσθήκη 2 ml πρότυπου διαλύματος γλυκίνης σε δοκιμαστικό σωλήνα και ένα τυφλό δείγμα με προσθήκη 2 ml απιονισμένου νερού σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα 1 ml του αντιδραστηρίου χρώσης μεταφέρθηκε σε κάθε έναν από τους παραπάνω δοκιμαστικού σωλήνες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 ± 1 °C για 16 min ακριβώς. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψύχθηκαν σε υδατόλουτρο (20 ± 1 °C) για περίπου 20 min. Ακολούθως, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 5 ml αντιδραστηρίου αραιώσης και τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm με φασματοφωτόμετρο, αφού πρώτα μηδενίστηκε με το τυφλό διάλυμα. Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) υπολογίστηκε με σύμφωνα με την εξίσωση $y = 4.7969x - 0.0194$ όπου y η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων σε g/L και x η τιμή της απορρόφησης.

2.5.7 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Bradford. Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει η χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 να δεσμεύεται στα μόρια των πρωτεϊνών. Η χρωστική αυτή, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση και σε όξινο περιβάλλον, απορροφά στα 465 nm και το χρώμα της είναι καστανό. Η δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυανού χρώματος και τη μεταβολή του μεγίστου απορρόφησης στα 595 nm, όπου και μετράται φωτομετρικά.

Εφαρμογή της μεθόδου

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα, γίνεται ανάμιξη του κάθε δείγματος, (αραιωμένου στα 2 ml με απιονισμένο νερό), με 2 ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Ο υπολογισμός της

συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη, (BSA).

2.5.8 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών

Ο προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Liang κ.α. (2010) και Diamantopoulou κ.α. (2014). Συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρής βιομάζας 100 mg εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας 20 ml 2,5 N HCL (Merck) στους 100 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε ρύθμιση του pH του εκχυλίσματος με 2,5 N NaOH (Merck) και ο τελικός όγκος προσαρμόστηκε στα 50 ml. Τα ολικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν ποσοτικά με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller, 1954) και οι ενδοπολυσακχαρίτες εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γλυκόζης.

2.5.9 Μέτρηση ενδοκυτταρικού λίπους

Στα σημεία της κινητικής όπου συλλέχθηκε η βιομάζα προσδιορίστηκε ποσοτικά το παραχθέν ενδοκυτταρικό λίπος και υπολογίστηκε σε g/L καλλιέργειας και % κ.β (g λιπιδίων/g ξηρής βιομάζας x 100). Αυτό έγινε με εκχύλιση του λίπους, όπως περιγράφεται παρακάτω:

Εφαρμογή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του ενδοκυτταρικού λίπους των μυκήτων, μετά την ζύγιση της ξηρής βιομάζας, προστέθηκε ποσότητα ορισμένων ml μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)-μεθανόλης (methanol) σε αναλογία 2:1 (Folch κ.α., 1957) ικανών να καλύψουν την υπάρχουσα βιομάζα. Τα γυάλινα φιαλίδια σφραγίστηκαν για την αποφυγή εξατμίσεως του διαλύτη και διατηρήθηκαν σε σκοτεινό σημείο ώστε να αποφευχθεί οξείδωση του λίπους για 7 ημέρες τουλάχιστον. Με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών εκχειλίστηκε το συνολικό μικροβιακό λίπος, όπως τα αποθηκευτικά και δομικά λιπίδια. Κατόπιν η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών διηθήθηκε μέσω χάρτινου ηθμού (Whatman No2, Kent, England). Το διήθημα συλλέχτηκε σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολούθησε εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Stuart RE300DB) για την απομάκρυνση διαλυτών. Στην φιάλη εξάτμισης παρέμεινε το μικροβιακό λίπος, το οποίο ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB, Darmstadt, Germany) και υπολογίστηκε σε g/L και g/g επί ξηρό βάρος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μέτρηση ταχύτητας γραμμικής αύξησης μυκηλίου

Η ταχύτητα μυκηλιακής αύξησης καταγράφηκε σε οκτώ διαφορετικά στελέχη των μυκήτων *A. aegerita* (AMRL 101, AMRL 104), *L. edodes* (AMRL 125, AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (GPYSA) και σε τρυβλία στα οποία εκτός από το θρεπτικό υπόστρωμα (GPYSA) προστέθηκε και υγρό απόβλητο ελαιουργίας σε συγκεντρώσεις 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (v/v). Σκοπός του πειράματος της μέτρησης της Κr είναι να επιλεγθούν τα στελέχη με την μεγαλύτερη ταχύτητα γραμμικής αύξησης, καθώς και τα θρεπτικά υποστρώματα που ευνοούν περισσότερο τη μυκηλιακή αύξηση ώστε να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα ζυμώσεων βυθού σε φιάλες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1, σύμφωνα με τον οποίο από τα οκτώ εξεταζόμενα στελέχη, τα στελέχη του μύκητα *A. aegerita* (AMRL 101, AMRL 104) ήταν αυτά που εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές ταχύτητας γραμμικής αύξησης (Κr) με το AMRL 101 να εμφανίζει τιμές μεταξύ 2,05-3,32 mm/day και τις χαμηλότερες τιμές να παρουσιάζονται στα θρεπτικά μέσα με συγκέντρωση ΥΑΕ από 20% και πάνω. Το στέλεχος AMRL 104 εμφάνισε ίδια εικόνα με το AMRL 101 αλλά με λίγο υψηλότερες τιμές οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 2,27-3,57 mm/day. Μεταξύ των στελεχών του μύκητα *L. edodes* (AMRL 125, AMRL 126) και τα δυο στελέχη εμφάνισαν παρόμοιες τιμές ταχύτητας, με το στέλεχος AMRL 126 να εμφανίζει γενικά λίγο υψηλότερες τιμές (2,21-5,22 mm/day), σε σχέση με το AMRL 125 (1,55-4,76 mm/day) και με τα δυο στελέχη να εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές (Κr) στα θρεπτικά μέσα με ΥΑΕ σε συγκέντρωση 40% και πάνω. Μεταξύ των στελεχών του μύκητα *P. sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2), το στέλεχος AMRL 156-1 εμφάνισε τιμές που κυμαίνονταν μεταξύ 2,86-4,90 mm/day και το στέλεχος AMRL 156-2 εμφάνισε λίγο υψηλότερες τιμές οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 3,83-5,12 mm/day, με το AMRL 156-2 να εμφανίζει γενικά λίγο υψηλότερες τιμές (σε σχέση με το AMRL 156-1) ειδικά στα θρεπτικά μέσα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΥΑΕ (από 35% και πάνω), ενώ αντίθετα το AMRL 156-1 εμφάνισε τις χαμηλότερες του τιμές σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Με βάση αυτή την παρατήρηση προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος AMRL 156-2 παρουσιάζει μεγαλύτερη ανεκτικότητα στις υψηλές συγκεντρώσεις ΥΑΕ στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας. Τα στελέχη *P. sajor-*

caju AMRL 197 και *F. velutipes* AMRL 271 εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές (Kr) σε σχέση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα στελέχη, με το *P. sajor-caju* να εμφανίζει τιμές (4,05-6,45 mm/day) και με το *F. velutipes* να εμφανίζει τιμές (4,02-6,60 mm/day). Επίσης και τα δυο στελέχη εμφάνισαν μεγάλη ανεκτικότητα στην παρουσία των ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας καθώς είχαν ικανοποιητικές τιμές βιομάζας στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν μέχρι και 40% ΥΑΕ ενώ οι τιμές της ταχύτητας γραμμικής αύξησης μειώθηκαν σημαντικά μόνο στα θρεπτικά υποστρώματα με 45% και 50% ΥΑΕ.

Πίνακας 3.1: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης (Kr, mm/d) των μακρομυκήτων *A. aegerita*, *L. edodes*, *P. sapidus*, *P. sajor-caju*, *F. velutipes*, σε στερεό θρεπτικό μέσο με προσθήκη ΥΑΕ (0-50%) στους 25 (± 1) °C

Kr (mm/day)											
Μακρομύκητες/ Συγκέντρωση ΥΑΕ (v/v)	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%
<i>Agrocybe aegerita</i> AMRL 101	3.20 \pm 0.13	3.32 \pm 0.05	3.11 \pm 0.18	2.87 \pm 0.10	2.54 \pm 0.31	2.69 \pm 0.05	2.86 \pm 0.15	3.12 \pm 0.04	2.63 \pm 0.15	2.33 \pm 0.16	2.05 \pm 0.11
<i>Agrocybe aegerita</i> AMRL 104	3.11 \pm 0.36	3.40 \pm 0.03	3.57 \pm 0.25	3.48 \pm 0.11	3.18 \pm 0.07	2.81 \pm 0.09	2.98 \pm 0.03	3.00 \pm 0.04	2.67 \pm 0.06	2.30 \pm 0.03	2.27 \pm 0.05
<i>Lentinula edodes</i> AMRL 125	3.63 \pm 0.13	4.76 \pm 0.11	3.83 \pm 0.22	4.04 \pm 0.68	4.59 \pm 0.32	2.02 \pm 0.14	3.33 \pm 0.29	3.59 \pm 0.09	2.80 \pm 0.51	1.80 \pm 0.03	1.55 \pm 0.04
<i>Lentinula edodes</i> AMRL 126	3.84 \pm 0.21	4.26 \pm 0.27	5.22 \pm 0.27	4.79 \pm 0.05	4.59 \pm 0.30	2.90 \pm 0.32	3.52 \pm 0.33	3.68 \pm 0.04	3.17 \pm 0.37	2.21 \pm 0.10	2.31 \pm 0.33
<i>Pleurotus sapidus</i> AMRL 156-1	2.86 \pm 0.20	4.96 \pm 0.02	4.89 \pm 0.14	4.90 \pm 0.06	4.40 \pm 0.55	3.83 \pm 0.04	3.87 \pm 0.03	3.89 \pm 0.03	3.75 \pm 0.06	3.76 \pm 0.21	3.79 \pm 0.13
<i>Pleurotus sapidus</i> AMRL 156-2	4.58 \pm 0.25	4.49 \pm 0.03	4.42 \pm 0.06	4.47 \pm 0.05	4.72 \pm 0.01	3.83 \pm 0.07	3.84 \pm 0.12	3.90 \pm 0.07	3.88 \pm 0.03	4.88 \pm 0.24	5.12 \pm 0.23
<i>Pleurotus sajor-caju</i> AMRL 197	4.05 \pm 1.22	6.45 \pm 0.30	6.36 \pm 0.15	6.10 \pm 0.03	6.28 \pm 0.07	5.06 \pm 0.12	6.31 \pm 0.93	5.45 \pm 0.08	5.08 \pm 0.08	4.26 \pm 0.08	4.25 \pm 0.10
<i>Flamulina velutipes</i> AMRL 271	6.60 \pm 0.07	6.28 \pm 0.46	6.44 \pm 0.03	6.18 \pm 0.48	5.86 \pm 0.48	3.52 \pm 0.10	4.73 \pm 0.04	4.72 \pm 0.07	4.87 \pm 0.52	4.07 \pm 0.06	4.02 \pm 0.06

3.2 Κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης

Τα τέσσερα στελέχη των μυκήτων *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης (GPYS, μάρτυρας), καθώς και σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης (GPYS) στο οποίο έγινε προθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 15% και 35% με σκοπό τα θρεπτικά αυτά μέσα να περιέχουν φαινολικές ενώσεις με συγκεντρώσεις 1,5 g/L και 3,5 g/L αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες ήταν βυθού, κλειστού τύπου και σε μη αναδεδυόμενη (στατική) κατάσταση στους 26 (± 1) °C, με διάρκεια 33 ημέρες για τα στελέχη *P. sapidus* και *F. velutipes*, 40 ημέρες για το στέλεχος *P. sajor-caju* και 44 ημέρες για το στέλεχος *L. edodes* και έγιναν με σκοπό τον προσδιορισμό: της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της εναπομείνουσας ποσότητας σακχάρων στο θρεπτικό μέσο (S, g/L), του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους (L, g/L), των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L) καθώς και την επίδραση του ΥΑΕ στην φυσιολογική ανάπτυξη και συμπεριφορά των εξεταζόμενων στελεχών. Επιπλέον, γινόταν μέτρηση του pH του θρεπτικού μέσου κάθε φορά που μετρούνταν και η βιομάζα της καλλιέργειας κάθε στελέχους.

Τα συνολικά συγκεφαλαιωτικά αποτελέσματα για τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L), την αντίστοιχη κατανάλωση γλυκόζης (Glc cons, g/L) και την επίδραση του περιεχόμενου ΥΑΕ (%) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.2.1, Πίνακας 3.2.2, Πίνακας 3.2.3, Πίνακας 3.2.4), για κάθε ένα από τα μελετώμενα στελέχη ξεχωριστά. Επίσης στους ίδιους Πίνακες παρουσιάζονται οι τιμές του συντελεστή απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς το καταναλωθέν σάκχαρο ($Y_{X/S}$), ο οποίος εκφράζει την βιομετατρεψιμότητα του σακχάρου σε βιομάζα και υπολογίστηκε τόσο για την ημέρα παραγωγής της μέγιστης βιομάζας, όσο και για τις ημέρες της μέγιστης παραγωγής λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, τον συντελεστή $Y_{L/X}$ ο οποίος εκφράζει το λόγο των παραχθέντων λιπιδίων προς την παραχθείσα βιομάζα και τον συντελεστή $Y_{IPS/X}$ ο οποίος εκφράζει το λόγο των παραχθέντων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραχθείσα βιομάζα. Ακόμη παρατίθεται και τα διαγράμματα της κινητικής παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης τα οποία παρουσιάζουν την πορεία ανάπτυξης και την πορεία κατανάλωσης του υποστρώματος για κάθε στέλεχος ξεχωριστά.

Πίνακας 3.2.1: Συνολικά αποτελέσματα της μέγιστης παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών και της αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης του *L. edodes* (AMRL 126) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%) για 44 ημέρες στους 26 (± 1) °C

ΥΑΕ (%)		T (days)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)	Y _{IPS/S} (g/g)
0	δ,ε	33	8.84	13.41	1.18	2.44	0.66	0.13	0.27	0.18
	α,β,γ	44	10.47	24.40	1.02	4.13	0.43	0.07	0.39	0.17
15	γ,δ,ε	33	14.87	25.49	1.00	5.46	0.58	0.07	0.37	0.21
	α	40	16.15	26.95	*ΔΜ	*ΔΜ	0.60	*ΔΜ	*ΔΜ	*ΔΜ
	β,δ	44	15.03	28.40	1.02	3.46	0.53	0.07	0.23	0.12
35	ε	33	7.81	11.20	0.41	2.49	0.70	0.05	0.32	0.22
	α,β,γ,δ	44	16.79	25.11	0.71	4.52	0.67	0.04	0.27	0.21

α: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

β: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (g/L)

γ: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (g/L)

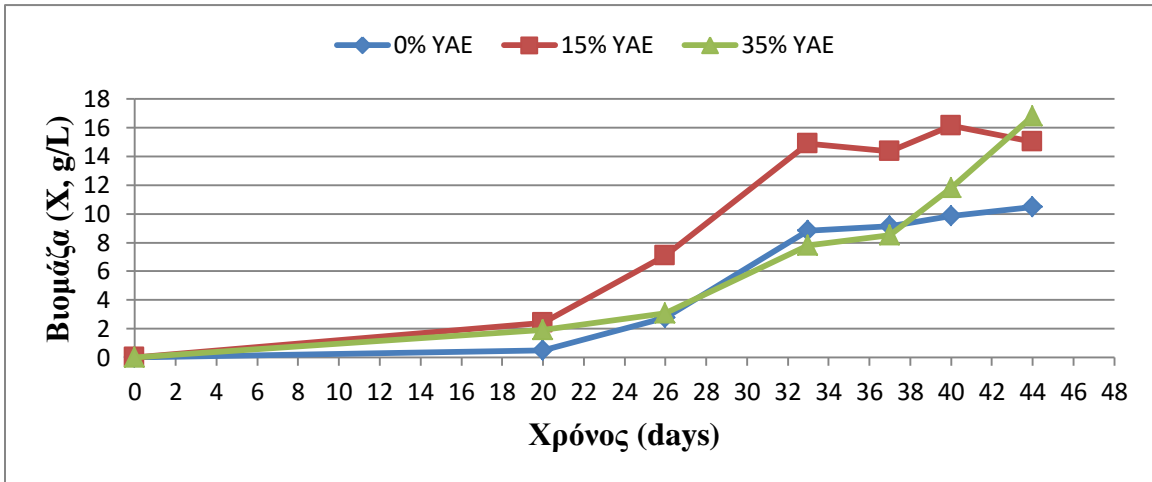
δ: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας (g/g)

ε: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας (g/g)

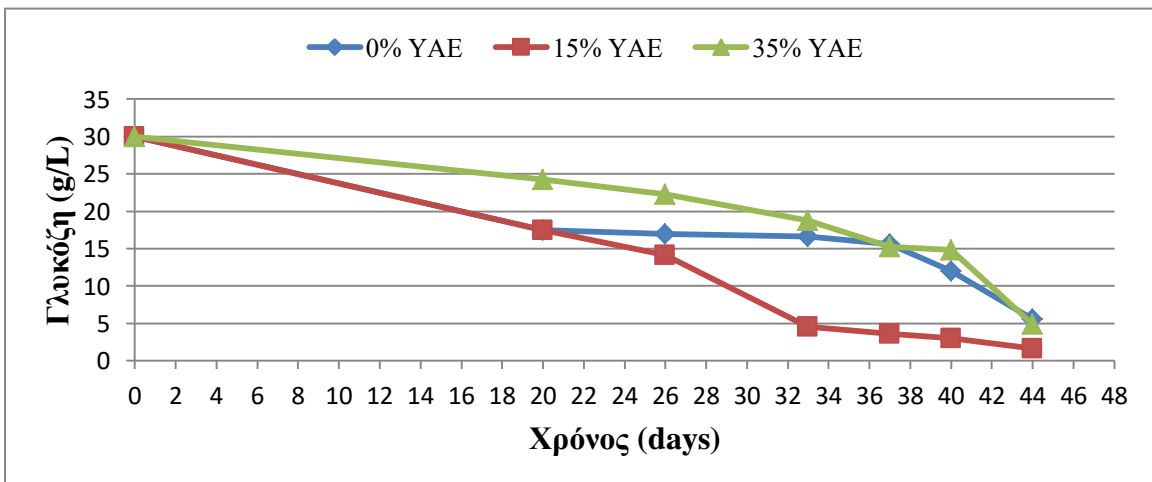
*ΔΜ: δεν μετρήθηκε

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.1 για το στέλεχος *L. edodes* (AMRL 126) η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (16,79 g/L) παρατηρήθηκε την 44η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, ο συντελεστής Y_{X/S} παρουσίασε την μέγιστη τιμή του (0,70 g/g) την 33η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (1,02 g/L) παρατηρήθηκε την 44η ημέρα στον μάρτυρα καθώς επίσης και στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ, ενώ η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (5,46 g/L) παρατηρήθηκε την 33η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ. Η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{L/X} (0,13 g/g) ή το ποσοστό λιπιδίων % κ.β (13%) παρατηρήθηκε την 33η ημέρα στο θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{IPS/X} (0,39 g/g) το ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών % κ.β (39%) παρατηρήθηκε την 44η ημέρα στο ίδιο θρεπτικό μέσο και η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{IPS/S} (0,22 g/g) παρατηρήθηκε την 33η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ. Όσον αφορά το pH αυτό κυμάνθηκε για το συγκεκριμένο στέλεχος από 2,83 έως 4,26.

Στη συνέχεια ακολουθούν Διαγράμματα (Διάγραμμα 3.2.1, Διάγραμμα 3.2.2) που παρουσιάζουν την κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης στα διάφορα θρεπτικά μέσα για το στέλεχος *L. edodes*.



Διάγραμμα 3.2.1: Κινητική παραγωγή βιομάζας του στελέχους *L. edodes* (AMRL 126), συναρτήσεως του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.2.2: Κινητική κατανάλωση γλυκόζης του στελέχους *L. edodes* (AMRL 126), συναρτήσεως του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα καθίσταται σαφές ότι η προσθήκη ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είχε θετική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας καθώς στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ οι μέγιστες τιμές της παραγόμενης βιομάζας ήταν 16,15 g/L και 16,79 g/L αντίστοιχα, ενώ στο θρεπτικό μέσο στο οποίο δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν μικρότερη (10,47 g/L). Όσον αφορά στην κατανάλωση της πηγής άνθρακα (γλυκόζης) κατά την καλλιέργεια του *L. edodes* φαίνεται ότι καταναλώθηκε σχεδόν όλη η αρχική ποσότητα γλυκόζης του θρεπτικού μέσου με 15% ΥΑΕ, με ποσοστό της τάξης του 5,3% να μένει ανεκμετάλλευτο και ότι το μανιτάρι κατανάλωσε μεγάλο μέρος της γλυκόζης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του και στα άλλα δύο θρεπτικά μέσα με ποσοστά της τάξης του 18,6% και 16,3% να μένουν ανεκμετάλλευτα στον μάρτυρα και στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2.2: Συνολικά αποτελέσματα της μέγιστης παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών και της αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης του *P. sapidus* (AMRL 156-2) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%) για 33 ημέρες στους 26 (±1) °C

ΥΑΕ (%)		T (days)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)	Y _{IPS/S} (g/g)
0	β,δ	20	4.94	21.40	0.48	1.87	0.23	0.09	0.37	0.09
	α	30	5.29	21.88	*ΔΜ	*ΔΜ	0.24	*ΔΜ	*ΔΜ	*ΔΜ
	γ,ε	33	5.15	21.96	0.40	2.02	0.23	0.07	0.38	0.09
15	β,δ	20	7.00	15.84	0.57	2.09	0.44	0.08	0.29	0.13
	α,γ,ε	33	11.07	26.68	0.35	4.00	0.41	0.03	0.36	0.15
35	α	30	15.19	25.81	*ΔΜ	*ΔΜ	0.58	*ΔΜ	*ΔΜ	*ΔΜ
	β,γ,δ,ε	33	13.29	28.00	0.48	3.92	0.47	0.03	0.29	0.14

α: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

β: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (g/L)

γ: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (g/L)

δ: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας (g/g)

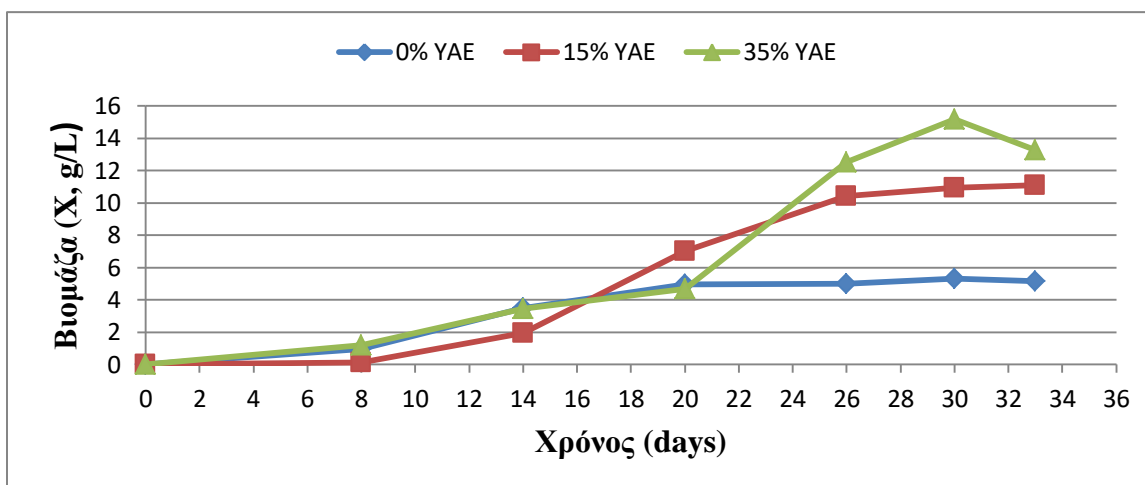
ε: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας (g/g)

*ΔΜ: δεν μετρήθηκε

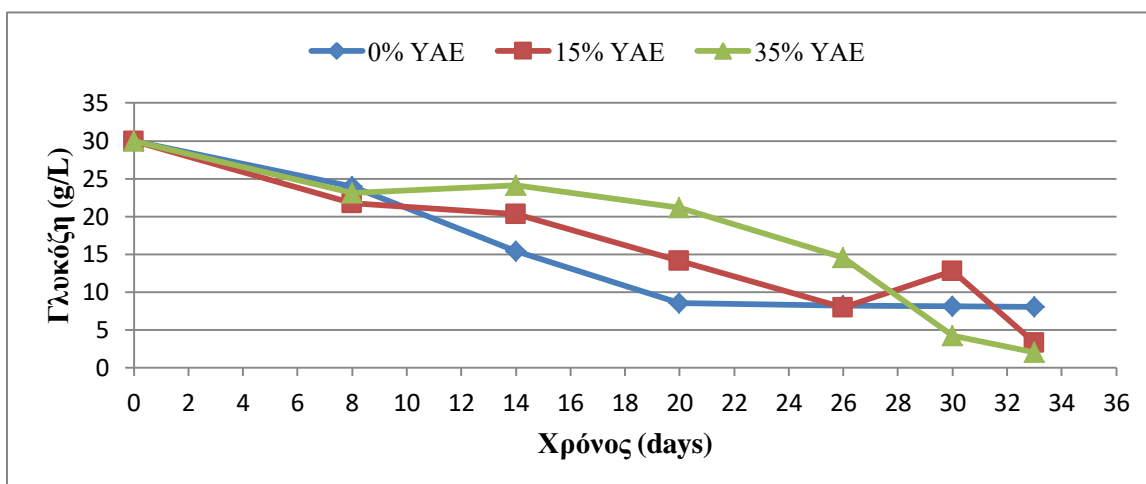
Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.2 για το στέλεχος *P. sapidus* (AMRL 156-2) η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (15,19 g/L) παρατηρήθηκε την 30η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, στο ίδιο

σημείο παρατηρήθηκε και η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{X/S}$ (0,58 g/g), επίσης η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (4,00 g/L) παρατηρήθηκε στο θρεπτικό μέσο με 15% YAE την 33η ημέρα, ενώ η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (0,57 g/L) παρατηρήθηκε την 20η ημέρα στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{L/X}$ (0,09 g/g) ή το ποσοστό λιπιδίων % κ.β. (9%) παρατηρήθηκε την 20η ημέρα στο θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη YAE, η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{IPS/X}$ (0,38 g/g) ή το ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών % κ.β. (38%) παρατηρήθηκε την 33η ημέρα στο ίδιο θρεπτικό μέσο και η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{IPS/S}$ (0,19 g/g) παρατηρήθηκε την 33η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% YAE. Όσον αφορά στο pH αυτό κυμάνθηκε για το συγκεκριμένο στέλεχος από 3,35 έως 5,65.

Στη συνέχεια ακολουθούν Διαγράμματα (Διάγραμμα 3.2.3, Διάγραμμα 3.2.4) που παρουσιάζουν την κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης στα διάφορα θρεπτικά μέσα για το στέλεχος *P. sapidus* (AMRL 156-2).



Διάγραμμα 3.2.3: Κινητική παραγωγής βιομάζας του στελέχους *P. sapidus* (AMRL 156-2), συναρτήσεως του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.2.4: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης του στελέχους *P. sapidus* (AMRL 156-2), συναρτήσει του χρόνου σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα καθίσταται σαφές ότι η προσθήκη YAE στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είχε θετική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας καθώς στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% YAE οι μέγιστες τιμές της παραγόμενης βιομάζας ήταν 11,07 g/L και 15,19 g/L αντίστοιχα, ενώ στο θρεπτικό μέσο στο οποίο δεν έγινε προθήκη YAE η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν μικρότερη (5,29 g/L). Όσον αφορά στην κατανάλωση της πηγής άνθρακα (γλυκόζης) κατά την καλλιέργεια του *P. sapidus* φαίνεται ότι στην υψηλότερη συγκέντρωση YAE (35%) καταναλώθηκε η περισσότερη ποσότητα γλυκόζης με ποσοστό της τάξης 6,6% να μένει ανεκμετάλλευτο και ότι το μανιτάρι κατανάλωσε μεγάλο μέρος της αρχικής ποσότητας γλυκόζης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του και στα άλλα δύο θρεπτικά μέσα με ποσοστά της τάξης του 26,8% και 11,06% να μένουν ανεκμετάλλευτα στον μάρτυρα και στο θρεπτικό μέσο με 15% YAE αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2.3: Συνολικά αποτελέσματα της μέγιστης παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών και της αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης του *P. sajor-caju* (AMRL 197) σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%) για 40 ημέρες στους 26 (\pm 1) °C

ΥΑΕ (%)		T (days)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)	Y _{IPS/S} (g/g)
0	δ	20	2.40	17.89	0.33	0.61	0.13	0.14	0.25	0.03
	α,β,γ,ε	40	6.35	21.46	0.45	2.50	0.30	0.07	0.39	0.12
15	β,δ	20	5.77	13.09	0.51	2.08	0.44	0.09	0.36	0.16
	α	26	7.70	14.60	*ΔΜ	*ΔΜ	0.53	*ΔΜ	*ΔΜ	*ΔΜ
	γ,ε	40	6.31	17.67	0.45	2.66	0.36	0.07	0.42	0.15
35	α,β,γ,δ,ε	40	9.59	14.45	0.65	3.42	0.66	0.07	0.36	0.24

α: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

β: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (g/L)

γ: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (g/L)

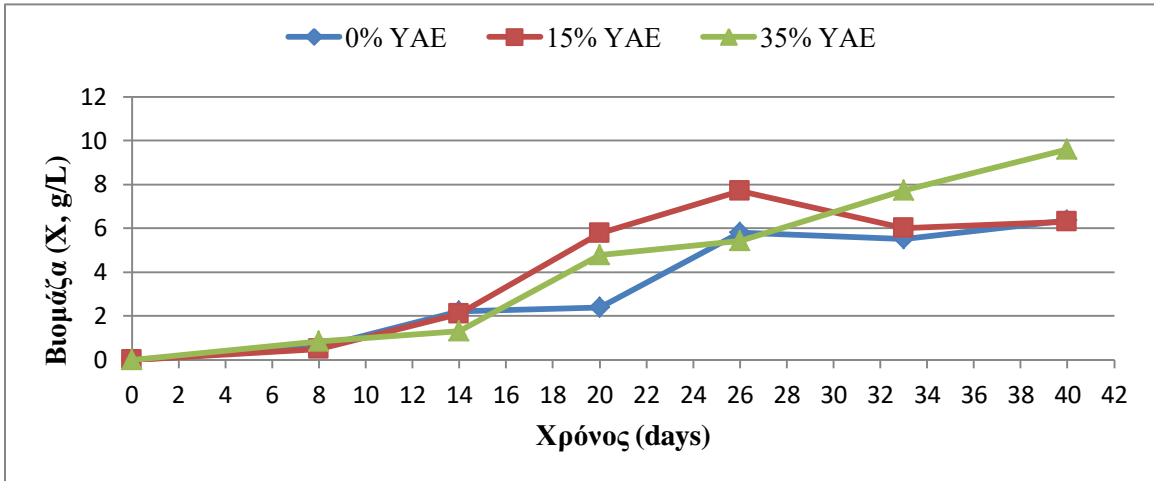
δ: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας (g/g)

ε: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας (g/g)

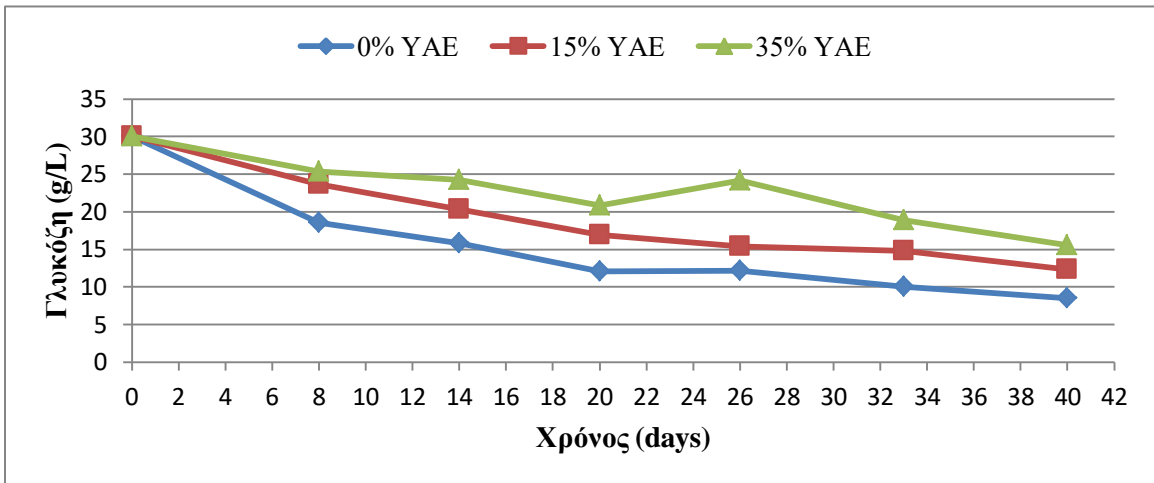
*ΔΜ: δεν μετρήθηκε

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.3 για το στέλεχος *P. sajor-caju* (AMRL 197) η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (9,59 g/L) παρατηρήθηκε την 40η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, επίσης στο ίδιο σημείο παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (0,65 g/L), η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (3,42 g/L) και η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,66 g/g). Η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{L/X} (0,14 g/g) ή το ποσοστό λιπιδίων % κ.β. (14%) παρατηρήθηκε την 20η ημέρα στο θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{IPS/X} (0,42 g/g) ή το ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών % κ.β. (42%) παρατηρήθηκε την 40η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ και η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{IPS/S} (0,24 g/g) παρατηρήθηκε την 40η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ. Όσον αφορά το pH αυτό κυμάνθηκε για το συγκεκριμένο στέλεχος από 3,30 έως 5,66.

Στη συνέχεια ακολουθούν Διαγράμματα (Διάγραμμα 3.2.5, Διάγραμμα 3.2.6) που παρουσιάζουν την κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης στα διάφορα θρεπτικά μέσα για το στέλεχος *P. sajor-caju* (AMRL 197).



Διάγραμμα 3.2.5: Κινητική παραγωγής βιομάζας του στελέχους *P. sajor-caju* (AMRL 197), συναρτήσει του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.2.6: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης του στελέχους *P. sajor-caju* (AMRL 197), συναρτήσει του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα παρατηρείται ότι η προσθήκη ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας όχι μόνο δεν επηρέασε αλλά ευνόησε την παραγωγή βιομάζας, καθώς στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ η μέγιστη τιμή της παραγόμενης βιομάζας ήταν 7,70 g/L ενώ στο μάρτυρα ήταν 6,35 g/L. Επιπλέον, στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ παρατηρήθηκε η μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας (9,59 g/L). Όσον αφορά στην κατανάλωση της πηγής άνθρακα (γλυκόζης) κατά την καλλιέργεια του *P. sajor-caju* φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης καταναλώθηκε κατά την καλλιέργεια του στον μάρτυρα με ποσοστό της τάξης του 28,46% να μένει ανεκμετάλλευτο, ενώ κατά την καλλιέργεια στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ τα ποσοστά μη καταναλωθείσας γλυκόζης ήταν 41,1% και 51,83% αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2.4: Συνολικά αποτελέσματα της μέγιστης παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών και της αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης του *F. velutipes* (AMRL 271) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%) για 33 ημέρες στους 26 (± 1) °C

ΥΑΕ (%)		T (days)	X (g/L)	Glc cons (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)	Y _{IPS/S} (g/g)
0	β,δ	20	3.54	17.77	0.59	1.19	0.20	0.17	0.34	0.07
	α	30	4.71	18.29	*ΔΜ	*ΔΜ	0.26	*ΔΜ	*ΔΜ	*ΔΜ
	γ,ε	33	4.09	22.11	0.31	1.81	0.18	0.08	0.44	0.08
15	α,β,γ,δ	20	11.75	24.11	1.23	3.22	0.49	0.10	0.27	0.13
	ε	33	5.47	30.00	0.38	1.78	0.18	0.07	0.33	0.06
35	β,δ,ε	20	4.41	15.61	0.66	1.18	0.28	0.15	0.27	0.08
	α	26	16.14	25.70	*ΔΜ	*ΔΜ	0.63	*ΔΜ	*ΔΜ	*ΔΜ
	γ	33	12.45	29.78	0.39	3.03	0.42	0.03	0.24	0.10

α: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγόμενη βιομάζα (g/L)

β: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (g/L)

γ: Τιμές που αντιστοιχούν στη μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (g/L)

δ: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας (g/g)

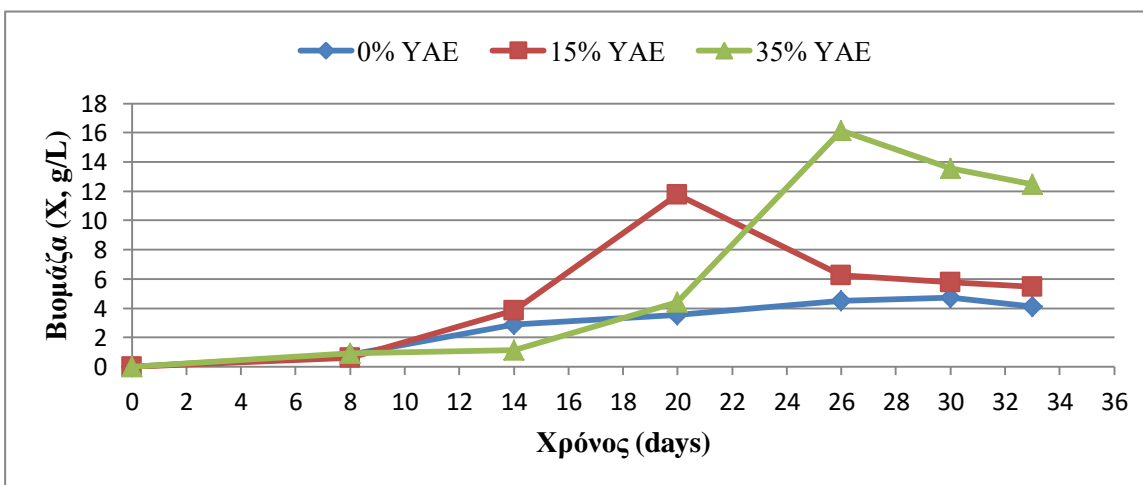
ε: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας (g/g)

*ΔΜ: δεν μετρήθηκε

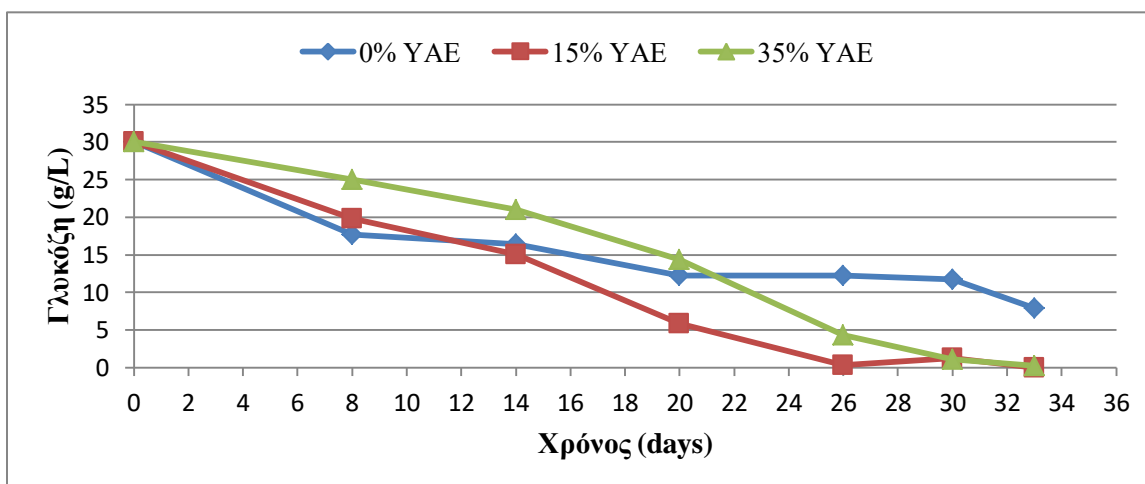
Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2.4 για το στέλεχος *F. velutipes* (AMRL 271) η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (16,14 g/L) παρατηρήθηκε την 26η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, επίσης στο ίδιο σημείο παρατηρήθηκε η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,63 g/g). Η μέγιστη

παραγωγή λιπιδίων (1,23 g/L) και ενδοπολυσακχαριτών (3,22 g/L) παρατηρήθηκε την 20η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ. Η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{L/X}$ (0,17 g/g) ή του ποσοστού λιπιδίων % κ.β. (17%) παρατηρήθηκε την 20η ημέρα στο θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{IPS/X}$ (0,44 g/g) ή το ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών % κ.β. (44%) παρατηρήθηκε την 33η ημέρα στο ίδιο θρεπτικό μέσο και η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{IPS/S}$ (0,13 g/g) παρατηρήθηκε την 20η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ.. Όσον αφορά στο pH αυτό κυμάνθηκε για το συγκεκριμένο στέλεχος από 3,15 έως 5,62.

Στη συνέχεια ακολουθούν Διαγράμματα (Διάγραμμα 3.2.7, Διάγραμμα 3.2.8) που παρουσιάζουν την κινητική παραγωγής βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης στα διάφορα θρεπτικά μέσα για το στέλεχος *F. velutipes* (AMRL 271).



Διάγραμμα 3.2.7: Κινητική παραγωγής βιομάζας του στελέχους *F. velutipes* (AMRL 271), συναρτήσει του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.2.8: Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης του στελέχους *F. velutipes* (AMRL 271), συναρτήσει του χρόνου σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα καθίσταται σαφές ότι η προσθήκη YAE στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είχε θετική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας, καθώς στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% YAE οι μέγιστες τιμές της παραγόμενης βιομάζας ήταν 11,75 g/L και 16,14 g/L αντίστοιχα, ενώ στο θρεπτικό μέσο στο οποίο δεν έγινε προσθήκη YAE η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν μικρότερη (4,71 g/L). Επίσης στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% YAE μετά από την επίτευξη της μέγιστης τιμής παρατηρείται μια έντονη μείωση της παραγόμενης βιομάζας. Όσον αφορά στην κατανάλωση της πηγής άνθρακα (γλυκόζης) κατά την καλλιέργεια του *F. velutipes* στον μάρτυρα ένα ποσοστό της τάξης του 26,3% παρέμεινε ανεκμετάλλευτο, ενώ κατά την διάρκεια ανάπτυξης του στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% YAE η αρχική ποσότητα γλυκόζης καταναλώθηκε ολοκληρωτικά

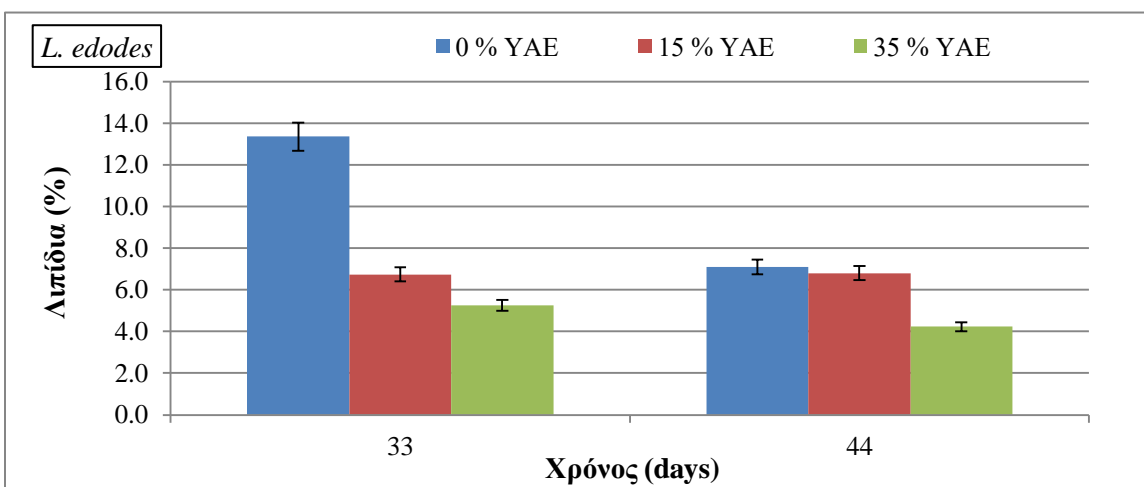
3.3 Παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους

Κατά την καλλιέργεια των τεσσάρων στελεχών των μακρομυκήτων *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) γινόταν παραλαβή και ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους σε δυο σημεία της κινητικής τους (33η και 44η ημέρα για το *L. edodes*, 20η και 33η ημέρα για τα *P. sapidus* και *F. velutipes*, 20η και 40η ημέρα για το *P. sajor-caju*). Τα αποτελέσματα του πειράματος δίνονται στον Πίνακα 3.3.1 όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων που παράχθηκαν κατά την διάρκεια της καλλιέργειας στα τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα (θρεπτικό μέσο χωρίς προσθήκη ΥΑΕ, θρεπτικό μέσο. με 15% ΥΑΕ και θρεπτικό μέσο. με 35% ΥΑΕ) και εκφράζονται σε g/L και σε % επί ξ.β. (g λιπιδίων/g ξηρής βιομάζας x100).

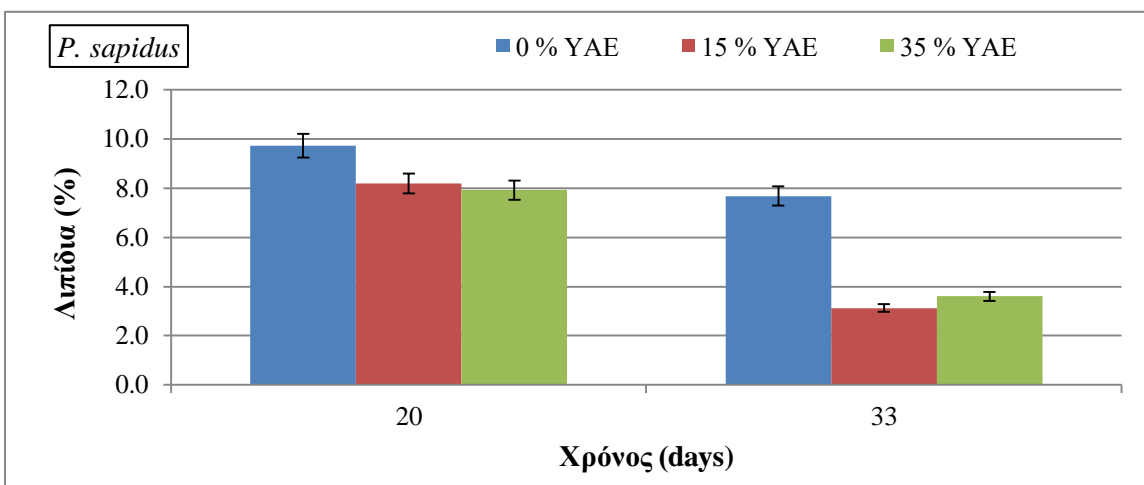
Πίνακας 3.3.1: Παραγωγή ολικών λιπιδίων (g/L και % κ.β. επί ξηρού) σε επιλεγμένες ημέρες ζύμωσης των μακρομυκήτων (*L. edodes* AMRL 126, *P. sapidus* AMRL 156-2, *P. sajor-caju* AMRL 197, *F. velutipes* AMRL 271) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%) στους 26 (±1) °C

Μακρομύκητες	Ημέρες	0% ΥΑΕ		15% ΥΑΕ		35% ΥΑΕ	
		Λιπίδια (g/L)	Λιπίδια (% κ.β.)	Λιπίδια (g/L)	Λιπίδια (% κ.β.)	Λιπίδια (g/L)	Λιπίδια (% κ.β.)
<i>L. edodes</i> AMRL 126	33	1.18 ± 0.04	13.35 ± 0.22	1.00 ± 0.17	6.74 ± 0.27	0.41 ± 0.04	5.26 ± 0.24
	44	0.74 ± 0.06	7.11 ± 0.34	1.02 ± 0.08	6.79 ± 0.31	0.71 ± 0.05	4.23 ± 0.26
<i>P. sapidus</i> AMRL 156-2	20	0.48 ± 0.02	9.72 ± 0.16	0.57 ± 0.12	8.19 ± 0.08	0.19 ± 0.01	7.92 ± 0.08
	33	0.40 ± 0.03	7.68 ± 0.09	0.35 ± 0.06	3.12 ± 0.03	0.48 ± 0.05	3.60 ± 0.02
<i>P. sajor-caju</i> AMRL 197	20	0.33 ± 0.05	13.61 ± 0.34	0.51 ± 0.14	8.83 ± 0.07	0.27 ± 0.04	5.60 ± 0.19
	40	0.45 ± 0.01	7.16 ± 0.29	0.45 ± 0.12	7.13 ± 0.06	0.65 ± 0.08	6.73 ± 0.12
<i>F. velutipes</i> AMRL 271	20	0.59 ± 0.04	16.68 ± 0.26	1.23 ± 0.07	10.49 ± 0.31	0.66 ± 0.03	14.87 ± 0.36
	33	0.31 ± 0.02	7.65 ± 0.13	0.38 ± 0.02	6.90 ± 0.19	0.39 ± 0.01	3.16 ± 0.11

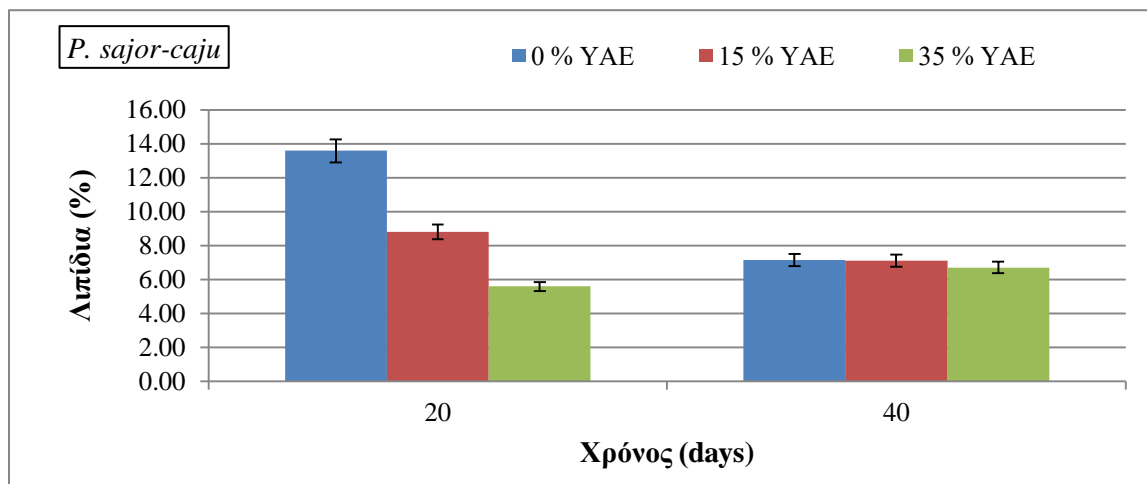
Οι τιμές των ολικών λιπιδίων που παράχθηκαν από τα τέσσερα στελέχη κυμάνθηκαν από 0,19 g/L έως και 1,23 g/L. Το στέλεχος *F. velutipes* παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων 1,23 g/L την 20η ημέρα καλλιέργειας του, στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ. Επίσης το ίδιο στέλεχος παρουσίασε ικανοποιητικές τιμές και στα άλλα δυο θρεπτικά μέσα με τιμές 0,59 g/L και 0,66 g/L στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ και στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα κατά την 20η ημέρα καλλιέργειας του, ενώ οι τιμές που αντιστοιχούν στην 33η ημέρα καλλιέργειας του ήταν μικρότερες σε σχέση με της 20ης ημέρας, σε όλα τα θρεπτικά μέσα. Ακολούθησε το στέλεχος *L. edodes* με την δεύτερη μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων 1,18 g/L την 33η ημέρα καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ, επίσης ικανοποιητικές ήταν και οι ποσότητες που παρήγαγε το συγκεκριμένο στέλεχος και στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ, 1,00 g/L και 1,02 g/L την 33η και 44η ημέρα αντίστοιχα, ενώ στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ οι παραγόμενες ποσότητες λιπιδίων ήταν μικρότερες, 0,41 g/L και 0,71 g/L την 33η και 44η ημέρα αντίστοιχα. Εν συνεχεία τα στελέχη *P. sapidus* και *P. sajor-caju* παρήγαγαν παρόμοιες τιμές ποσότητας λιπιδίων με το *P. sapidus* να παρουσιάζει μέγιστη τιμή 0,57 g/L την 20η ημέρα καλλιέργειας του στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ και ελάχιστη τιμή 0,19 g/L την 20η ημέρα καλλιέργειας του στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, η οποία ήταν και η μικρότερη τιμή μεταξύ όλων των στελεχών, και με το *P. sajor-caju* να εμφανίζει μέγιστη τιμή παραγόμενων λιπιδίων 0,65 g/L την 40η ημέρα καλλιέργειας του στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ και ελάχιστη τιμή 0,27 g/L την 20η ημέρα καλλιέργειας στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Όσον αφορά στο % λίπος επί ξηρού, τις μέγιστες τιμές εμφάνισε το στέλεχος *F. velutipes* με 16,68% κ.β. και 14,87% κ.β., κατά την 20η ημέρα καλλιέργειας του, στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ και στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα, επίσης το στέλεχος *P. sajor-caju* εμφάνισε την τρίτη μεγαλύτερη τιμή (13,61% κ.β.) την 20η ημέρα καλλιέργειας του στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ, ενώ την χαμηλότερη τιμή (3,12% κ.β.) εμφάνισε το στέλεχος *P. sapidus* την 33η ημέρα καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ. Στη συνέχεια παρατίθενται διαγράμματα που παρουσιάζουν το % λίπος επί ξηρού στα διάφορα θρεπτικά μέσα για κάθε στέλεχος ξεχωριστά.



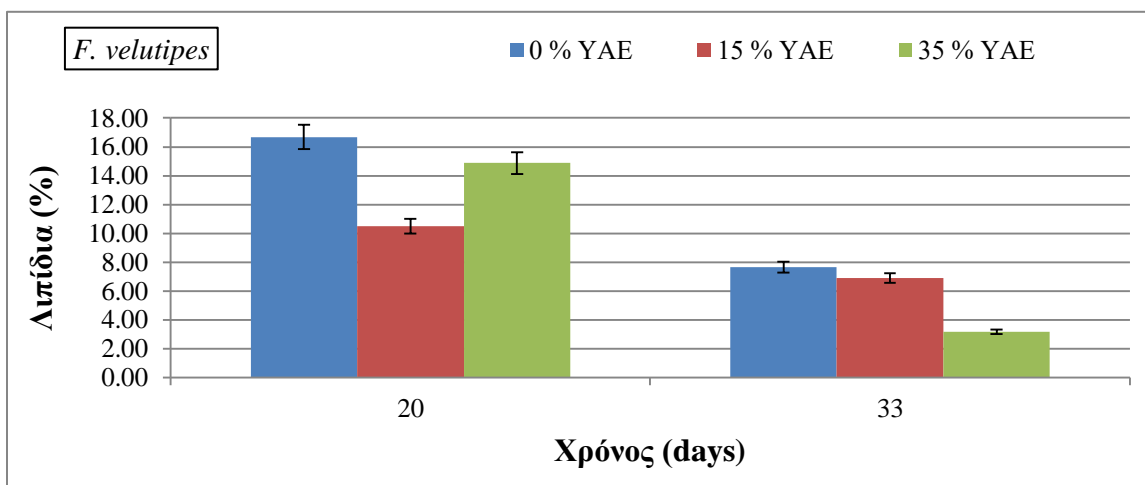
Διάγραμμα 3.3.1: Παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (% κ.β.) του στελέχους *L. edodes* AMRL 126 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%) στους 26 (± 1) °C



Διάγραμμα 3.3.2: Παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (% κ.β.) του στελέχους *P. sipidus* AMRL 156-2 συναρτήσει του χρόνου σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.3.3: Παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (% κ.β.) του στελέχους *P. sajor-caju* AMRL 197 συναρτήσσει του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.3.4: Παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (% κ.β.) του στελέχους *F. velutipes* AMRL 271 συναρτήσσει του χρόνου σε μη αναδευόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 3.3.1, Διάγραμμα 3.3.2, Διάγραμμα 3.3.3, Διάγραμμα 3.3.4) καθίσταται σαφές ότι η προσθήκη του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είχε αρνητική επίδραση στην παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ως % επί ξ.β, καθώς για όλα τα στελέχη και όλα τα σημεία δοκιμής η παραγωγή λίπους ήταν πιο αυξημένη στο μάρτυρα σε σχέση με τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό των παραγόμενων λιπιδίων από την 20^η/33^η στη 44^η ημέρα καλλιέργειας για όλους τους μακρομύκητες που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς προσθήκη ΥΑΕ. Όσον αφορά στην επίδραση της συγκέντρωσης των ΥΑΕ, για το στέλεχος *L. edodes* η παραγωγή λιπιδίων ήταν λίγο πιο αυξημένη στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ (6.74-6.79% κ.β.) σε σχέση με το θρεπτικό μέσο με 35% (4,23-5,26% κ.β.) και στα δύο σημεία της δοκιμής, επίσης δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά μεταξύ των τιμών στα δύο σημεία δοκιμής για τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ, ενώ στον μάρτυρα παρατηρείται σημαντική μείωση μεταξύ των τιμών, 13,35% και 7,11% την 33^η και 44^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα. Το στέλεχος *P. sapidus* δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών παραγωγής λιπιδίων στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ, όμως παρουσίασε σημαντική μείωση μεταξύ των τιμών των δύο σημείων δοκιμής, καθώς κατά την καλλιέργειά του στον μάρτυρα οι τιμές των λιπιδίων ήταν 9,72% κ.β. και 7,58% κ.β., κατά την καλλιέργεια του στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ οι τιμές των λιπιδίων ήταν 8,19% κ.β. και 3,12% κ.β. και κατά την καλλιέργειά στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ οι τιμές ήταν 7,92% κ.β. και 3,60% κ.β. (20^η και την 33^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα). Το στέλεχος *P. sajor-caju* εμφάνισε ιδιαίτερα υψηλή τιμή στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ (13,61% κ.β.), μικρότερη παραγωγή λίπους (8,83% κ.β.) εμφάνισε σε 15% ΥΑΕ και ακόμα πιο μικρή σε 35% ΥΑΕ (5,60% κ.β.) κατά την 20^η ημέρα καλλιέργειας. Κατά την 40^η ημέρα καλλιέργειας ωστόσο δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών. Επιπρόσθετα, μείωση εμφάνισαν οι τιμές μεταξύ των δυο σημείων δοκιμής καθώς κατά την καλλιέργεια του μανιταριού την 20^η και την 40^η ημέρα οι τιμές παραγωγής λιπιδίων στον μάρτυρα ήταν 13,61% κ.β. και 7,16% κ.β. αντίστοιχα, στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ ήταν 8,83% κ.β. και 7,13% κ.β. αντίστοιχα και στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ ήταν 5,60% κ.β. και 6,73% κ.β. αντίστοιχα. Τέλος το στέλεχος *F. velutipes* εμφάνισε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των παραγόμενων λιπιδίων τόσο μεταξύ των διαφορετικών θρεπτικών μέσων όσο και μεταξύ των δυο σημείων δοκιμής. Συγκεκριμένα, κατά την καλλιέργεια του στον μάρτυρα οι τιμές ήταν 16,68% κ.β. και 7,65% κ.β. την 20^η και τη 33^η ημέρα αντίστοιχα, κατά την καλλιέργεια του στο

θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ οι τιμές ήταν 10,49% κ.β. και 6,90% κ.β. την 20^η και τη 33^η ημέρα αντίστοιχα και κατά την καλλιέργειά του στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ οι τιμές ήταν 14,87% κ.β. και 3,16% κ.β. την 20^η και τη 33^η ημέρα αντίστοιχα.

3.4 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Κατά την καλλιέργεια των τεσσάρων στελεχών των μακρομυκήτων *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) γινόταν παραλαβή και ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών παραγόμενων πολυσακχαριτών σε δυο σημεία της κινητικής τους (33η και 44η ημέρα για το *L. edodes*, 20η και 33η ημέρα για τα *P. sapidus* και *F. velutipes*, 20η και 40η ημέρα για το *P. sajor-caju*). Τα αποτελέσματα του πειράματος δίνονται στον Πίνακα 3.4.1 όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των ενδοπολυσακχαριτών που παράχθηκαν κατά την διάρκεια της καλλιέργειας στα τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα (θρεπτικό μέσο χωρίς προσθήκη ΥΑΕ, θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ και θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ) και εκφράζονται σε g/L και σε % επί ξ.β. (g ενδοπολυσακχαριτών/g ξηρής βιομάζας x 100).

Πίνακας 3.4.1: Παραγωγή ολικών ενδοπολυσακχαριτών (g/L και % κ.β. επί ξηρού) σε επιλεγμένες ημέρες ζύμωσης των μακρομυκήτων (*L. edodes* AMRL 126, *P. sapidus* AMRL 156-2, *P. sajor-caju* AMRL 197, *F. velutipes* AMRL 271) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειας με προσθήκη ΥΑΕ (0, 15, 35%) στους 26 (±1) °C

ΣΤΕΛΕΧΗ	Ημέρες	0% ΥΑΕ		15% ΥΑΕ		35% ΥΑΕ	
		IPS (g/L)	IPS (% κ.β)	IPS (g/L)	IPS (% κ.β)	IPS (g/L)	IPS (% κ.β)
<i>L. edodes</i> AMRL 126	33	2.44 ± 0.03	27.58 ± 0.27	5.46 ± 0.07	36.69 ± 0.50	2.49 ± 0.08	31.89 ± 1.08
	44	4.13 ± 0.02	39.45 ± 0.16	3.46 ± 0.08	22.99 ± 0.52	4.52 ± 0.03	26.94 ± 0.14
<i>P. sapidus</i> AMRL 156-2	20	1.87 ± 0.01	37.82 ± 0.19	2.09 ± 0.03	29.90 ± 0.48	1.06 ± 0.01	22.62 ± 0.30
	33	2.02 ± 0.03	38.10 ± 0.48	4.00 ± 0.01	36.08 ± 0.10	3.92 ± 0.10	29.52 ± 0.57
<i>P. sajor-caju</i> AMRL 197	20	0.61 ± 0.00	25.48 ± 0.01	2.08 ± 0.15	36.05 ± 2.66	1.26 ± 0.01	26.35 ± 0.17
	40	2.50 ± 0.02	39.36 ± 0.32	2.66 ± 0.03	42.21 ± 0.45	3.42 ± 0.04	35.72 ± 0.42
<i>F. velutipes</i> AMRL 271	20	1.19 ± 0.03	33.64 ± 0.75	3.22 ± 0.04	27.43 ± 0.35	1.18 ± 0.06	26.80 ± 1.09
	33	1.81 ± 0.10	44.13 ± 0.16	1.78 ± 0.06	32.51 ± 1.09	3.92 ± 0.00	24.30 ± 0.04

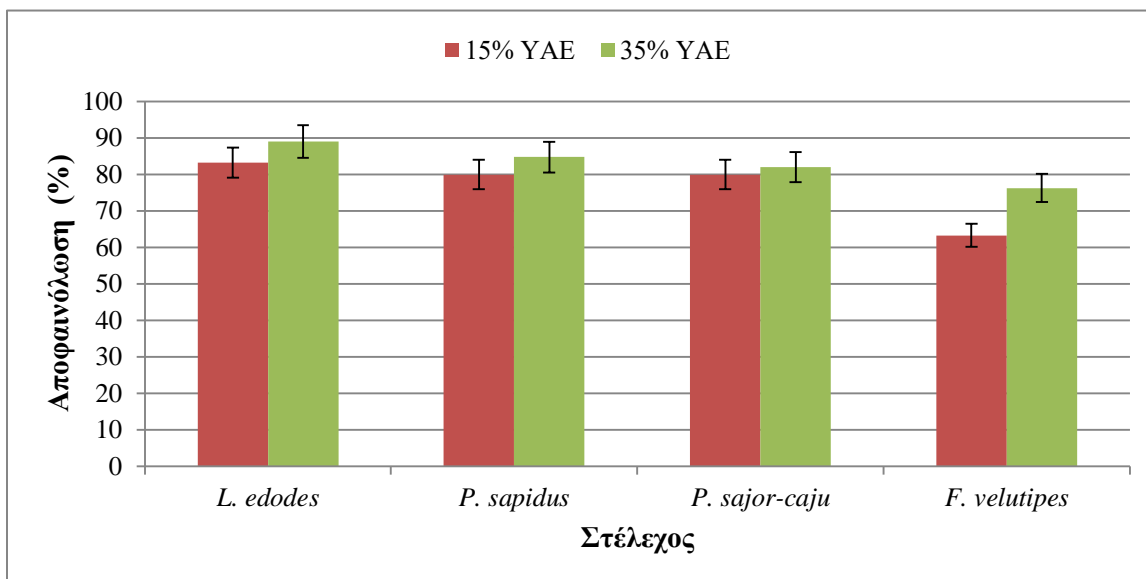
Οι τιμές των ολικών ενδοπολυσακχαριτών που παράχθηκαν από τα τέσσερα είδη μακρομυκήτων κυμάνθηκαν από 0,61 g/L έως 5,46 g/L. Γενικά και τα τέσσερα εξεταζόμενα στελέχη εμφάνισαν μεγαλύτερη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (g/L) κατά την καλλιέργειά τους στα θρεπτικά μέσα στα οποία έγινε προσθήκη ΥΑΕ σε σχέση με τον μάρτυρα, γεγονός το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί ως απόλυτα φυσιολογικό καθώς και τα τέσσερα στελέχη παρήγαγαν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες βιομάζας κατά την καλλιέργεια τους στα θρεπτικά μέσα με προσθήκη ΥΑΕ. Επιπρόσθετα οι μύκητες *L. edodes* και *F. velutipes* παρήγαγαν τις μεγαλύτερες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών κατά την καλλιέργειά τους στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ στο πρώτο σημείο δοκιμής, 33^η και 20^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα, ενώ κατά την καλλιέργεια τους σε 35% ΥΑΕ, τις μεγαλύτερες τιμές τις εμφάνισαν στο δεύτερο σημείο δοκιμής, την 44^η και 33^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα. Αντίθετα, οι μύκητες *P. sapidus* και *P. sajor-caju* παρήγαγαν τις μεγαλύτερες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών κατά την καλλιέργεια τους στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, στο δεύτερο σημείο δοκιμής, 33^η και 40^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα. Συγκεκριμένα το στέλεχος *L. edodes* παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών 5,46 g/L την 33η ημέρα καλλιέργειάς του σε 15% ΥΑΕ. Επίσης, το συγκεκριμένο είδος παρήγαγε και την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή 4,52 g/L την 44η ημέρα καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ. Ο μακρομύκητας *P. sapidus* εμφάνισε μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών 4,00 g/L στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ την 33^η ημέρα καλλιέργειας, ενώ ελάχιστη τιμή 1,06 g/L εμφάνισε σε 35% ΥΑΕ την 20^η ημέρα καλλιέργειας. Τα είδη *P. sajor-caju* και *F. velutipes* παρήγαγαν παρόμοιες τιμές ποσότητας ενδοπολυσακχαριτών με το *P. sajor-caju* να εμφανίζει την μέγιστη τιμή 3,42 g/L την 40^η ημέρα καλλιέργειας του στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ και την ελάχιστη τιμή 0,61 g/L, η οποία ήταν και η χαμηλότερη τιμή μεταξύ όλων των στελεχών και των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, την 20η ημέρα καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ και με το *F. velutipes* να εμφανίζει μέγιστη τιμή 3,22 g/L την 20^η ημέρα καλλιέργειας σε 15% ΥΑΕ και την ελάχιστη τιμή 1,18 g/L την ίδια ημέρα καλλιέργειας αλλά στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ.

Όσον αφορά στο % ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρού βάρους, όλα τα μελετώμενα στελέχη εμφάνισαν τις μεγαλύτερες τιμές κατά την καλλιέργειά τους στον μάρτυρα, με εξαίρεση το στέλεχος *P. sajor-caju* το οποίο εμφάνισε ελαφρώς πιο αυξημένη τιμή (42,21% κ.β.) κατά την καλλιέργειά του στο θεραπευτικό μέσο με 15% ΥΑΕ σε σχέση με τον μάρτυρα (39,36% κ.β.). Επίσης, όλα τα στελέχη εμφάνισαν τις μεγαλύτερες τιμές για όλα τα διαφορετικά θεραπευτικά μέσα στο δεύτερο σημείο δοκιμής, δηλαδή παρουσιάστηκε αύξηση στη τιμή των παραγόμενων πολυσακχαριτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Εξαιρέση αποτέλεσαν ο μακρομύκητας *L. edodes* ο οποίος κατά την καλλιέργειά του στα θεραπευτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές στο πρώτο σημείο δοκιμής (33^η ημέρα) και ο *F. velutipes* ο οποίος κατά την καλλιέργειά του στο θεραπευτικό μέσο με 35% εμφάνισε μεγαλύτερη τιμή επίσης στο πρώτο σημείο δοκιμής (20^η ημέρα καλλιέργειας). Συγκεκριμένα, την μέγιστη τιμή 44,13% κ.β. εμφάνισε ο *F. velutipes* την 33^η ημέρα καλλιέργειας στο θεραπευτικό μέσο που δεν έγινε προθήκη ΥΑΕ, ενώ την ελάχιστη τιμή 22,62% κ.β. εμφάνισε το μακρομύκητας *P. sapidus* κατά την 20^η ημέρα καλλιέργειας τους σε 35% ΥΑΕ. Την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή (42,21% κ.β.) εμφάνισε ο *P. sajor-caju* κατά την καλλιέργεια του στο θεραπευτικό μέσο με 15% ΥΑΕ ενώ τα μανιτάρια *L. edodes* και *P. sapidus* εμφάνισαν τις μέγιστες τιμές τους, 39,45% κ.β. και 38,10% κ.β. αντίστοιχα, κατά την καλλιέργειά τους στον μάρτυρα στο δεύτερο σημείο δοκιμής (44^η και 33^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα).

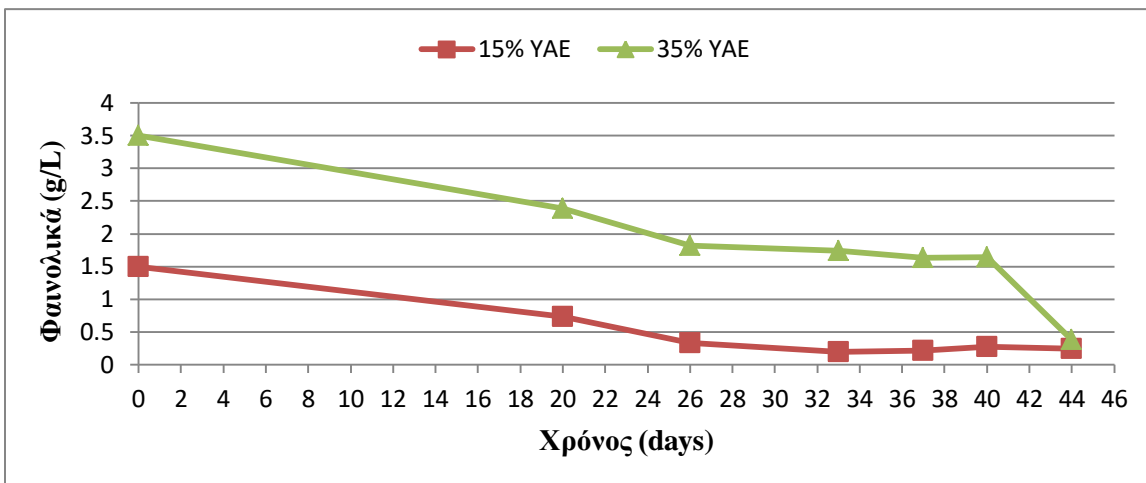
3.5 Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας

Κατά την καλλιέργεια των τεσσάρων στελεχών των μακρομυκήτων *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) γινόταν παραλαβή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας με σκοπό τον προσδιορισμό της μείωσης των φαινολικών ενώσεων και του αποχρωματισμού στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας στο οποίο έγινε προηγηθεί προθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 15% και 35%.

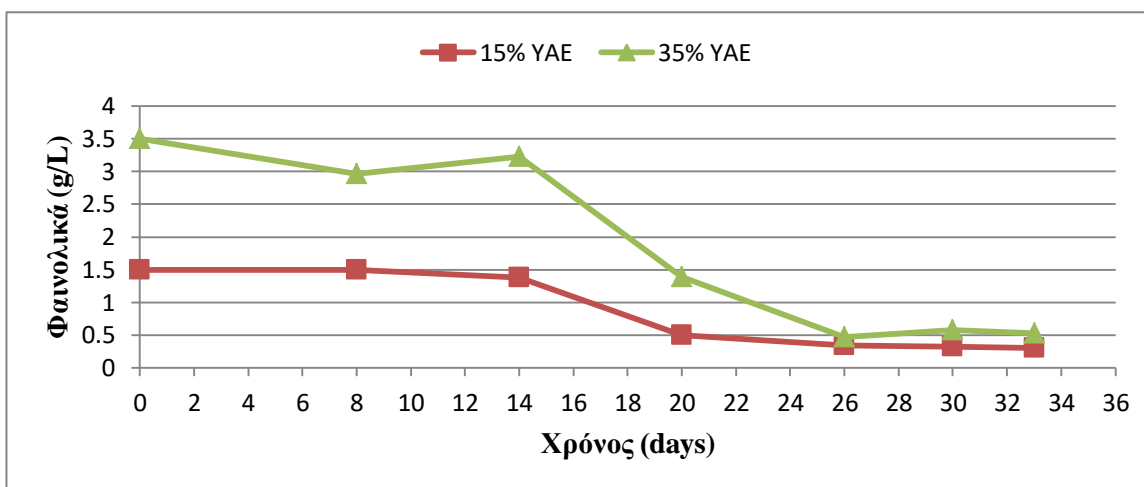
Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα που παρουσιάζουν την μείωση του φαινολικού φορτίου και τα % ποσοστά αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μετά το τέλος της ζύμωσης με τα ΥΑΕ, για κάθε είδος ξεχωριστά, καθώς και διάγραμμα που παρουσιάζει την τελική αποφαινόλωση (%) και αποχρωματισμό για όλα τα μελετώμενα στελέχη.



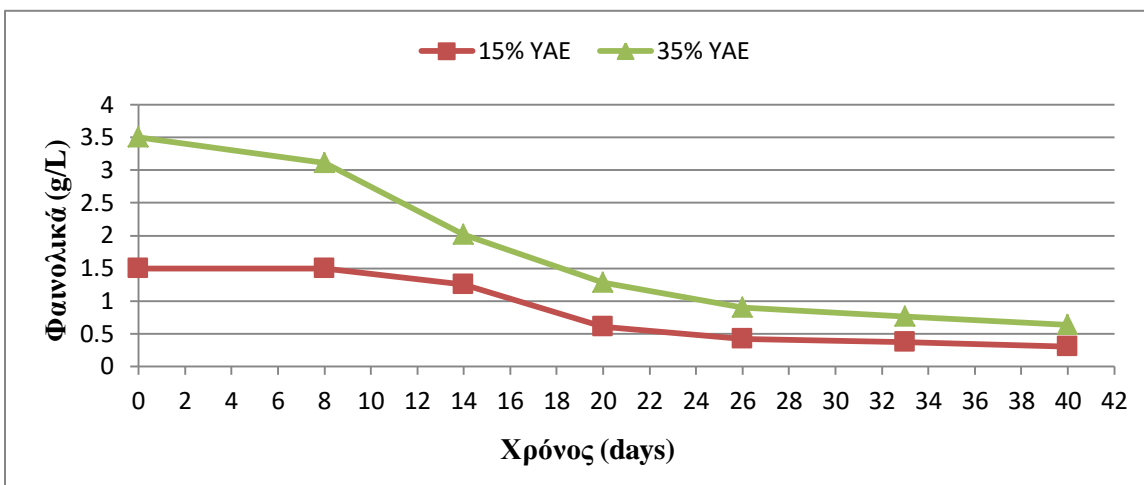
Διάγραμμα 3.5.1: Ποσοστό (%) αποφαινόλωσης μετά από ζύμωση των μακρομυκήτων *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) σε 15 και 35% ΥΑΕ (1,5 και 3,5 g/L φαινολικές ενώσεις αντίστοιχα)



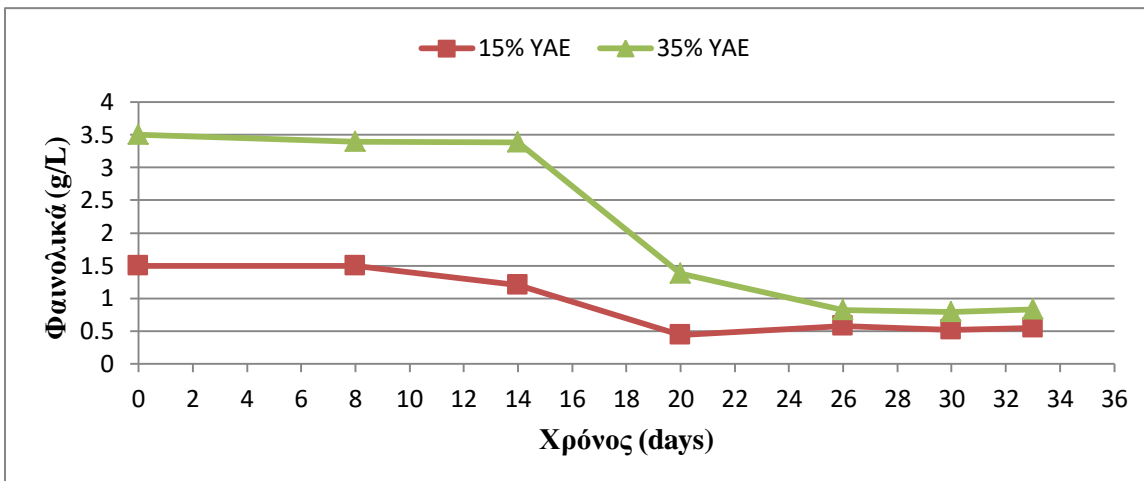
Διάγραμμα 3.5.2: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) του στελέχους *L. edodes* AMRL 126 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.5.3: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) του στελέχους *P. sapidus* AMRL 156-2 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

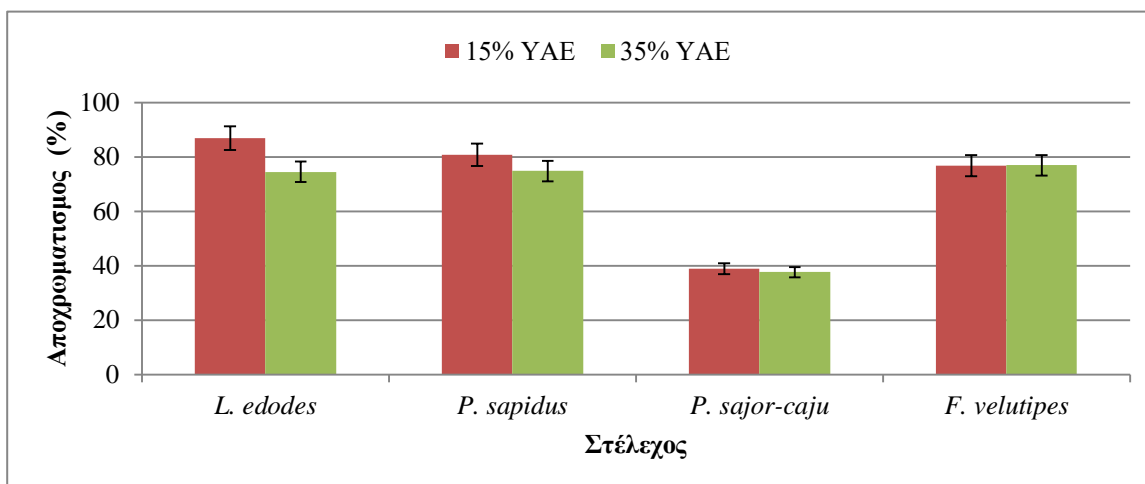


Διάγραμμα 3.5.4: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) του στελέχους *P. sajor-caju* AMRL 197 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

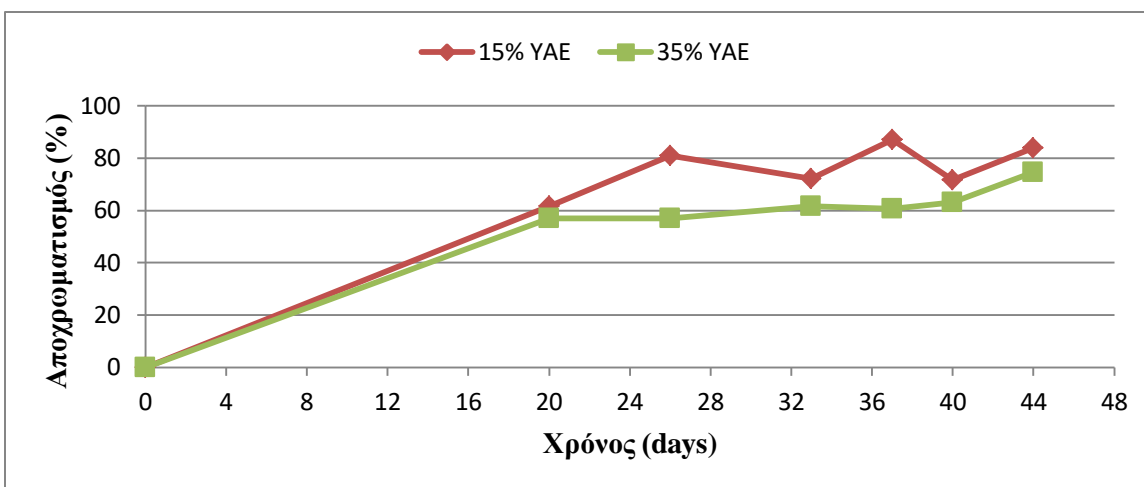


Διάγραμμα 3.5.5: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) του στελέχους *F. velutipes* AMRL 271 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

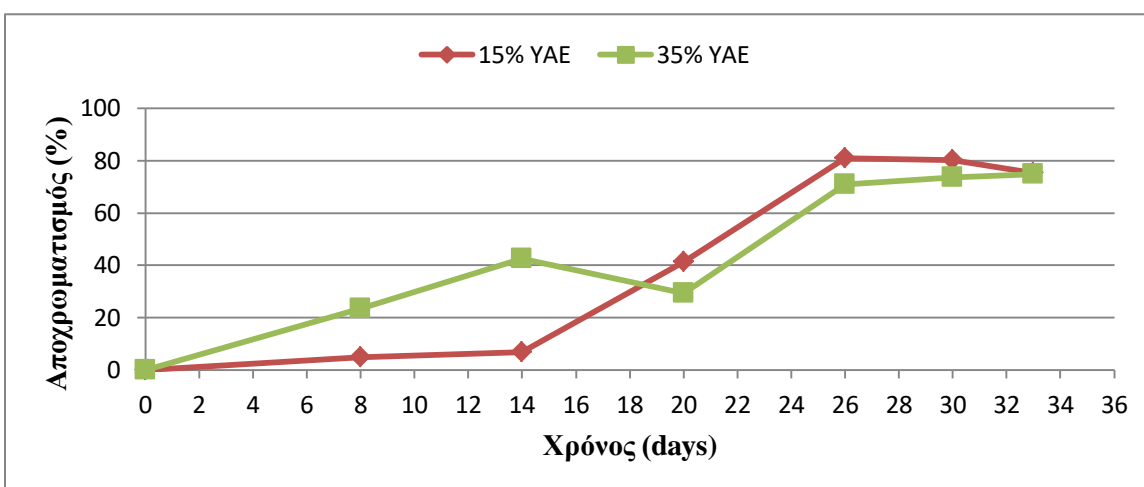
Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα (Διάγραμμα 3.5.1, Διάγραμμα 3.5.2, Διάγραμμα 3.5.3, Διάγραμμα 3.5.4, Διάγραμμα 3.5.5), παρατηρείται ότι μεγαλύτερη αποφαινόλωση επιτεύχθηκε από όλους τους μακρομύκητες στο υπόστρωμα με 35% ΥΑΕ από ό,τι στο 15%. Στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωσης πέτυχε ο μακρομύκητας *L. edodes* με μείωση των φαινολικών ενώσεων από 3,5 g/L σε 0,38 g/L (89,1% αποφαινόλωση), ακολούθησε ο *P. sapidus* με μείωση από 3,5 g/L σε 0,53 g/L (84,8% αποφαινόλωση), στη συνέχεια ο *P. sajor-caju* με μείωση από 3,5 g/L σε 0,63 g/L (82% αποφαινόλωση) και τέλος ο *F. velutipes* με μείωση των φαινολικών ενώσεων από 3,5 g/L σε 0,83 g/L (76,3% αποφαινόλωση). Ακόμα, στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωσης πέτυχε το στέλεχος *L. edodes* με μείωση των φαινολικών ενώσεων από 1,5 g/L σε 0,25 g/L (83,3% αποφαινόλωση), ακλούθησαν τα είδη *P. sapidus* και *P. sajor-caju* με μείωση από 1,5 g/L σε 0,30 g/L (80% αποφαινόλωση) και τέλος το *F. velutipes* με μείωση των φαινολικών ενώσεων από 1,5 g/L σε 0,55 g/L (63,3% αποφαινόλωση).



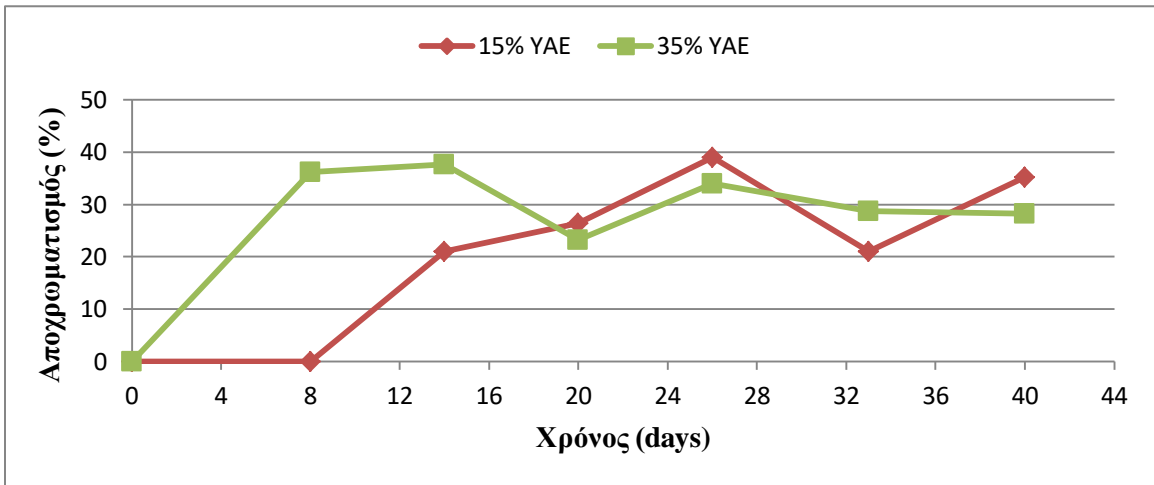
Διάγραμμα 3.5.6: Ποσοστό (%) αποχρωματισμού μετά από ζύμωση των μακρομυκήτων *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) σε 15 και 35% ΥΑΕ



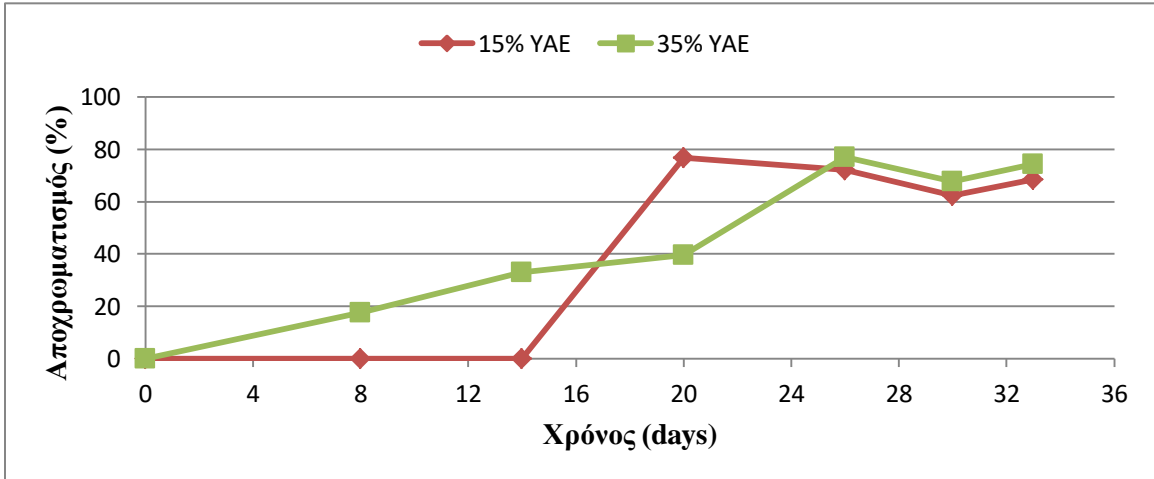
Διάγραμμα 3.5.7: Κινητική αποχρωματισμού (%) του στελέχους *L. edodes* AMRL 126 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.5.8: Κινητική αποχρωματισμού (%) του στελέχους *P. sapidus* AMRL 156-2 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.5.9: Κινητική αποχρωματισμού (%) του στελέχους *P. sajor-caju* AMRL 197 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)



Διάγραμμα 3.5.10: Κινητική αποχρωματισμού (%) του στελέχους *F. velutipes* AMRL 271 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες μετά από προσθήκη YAE (0, 15, 35%)

Με βάση τα παραπάνω Διαγράμματα (Διάγραμμα 3.5.6, Διάγραμμα 3.5.7, Διάγραμμα 3.5.8, Διάγραμμα 3.5.9, Διάγραμμα 3.5.10), ότι μεγαλύτερος αποχρωματισμός επιτεύχθει από όλους τους μακρομύκητες στο υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ, με εξαίρεση τον μύκητα *F. velutipes* για τον οποίο δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των μέγιστων τιμών αποχρωματισμού στα υποστρώματα με 15% και 35% ΥΑΕ. Συγκεκριμένα στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού 87,01% πέτυχε μακρομύκητας *L. edodes*, ακολούθησε ο *P. sapidus* με ποσοστό αποχρωματισμού 80,84%, στη συνέχεια ο *F. velutipes* με ποσοστό αποχρωματισμού 76,77% και τέλος το στέλεχος *P. sajor-caju* με ποσοστό αποχρωματισμού 38,96%. Στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού 76,98% πέτυχε το στέλεχος *F. velutipes*, ακολούθησε το στέλεχος *P. sapidus* με ποσοστό αποχρωματισμού 74,86%, στη συνέχεια το στέλεχος *L. edodes* με ποσοστό αποχρωματισμού 74,56% και τέλος το στέλεχος *P. sajor-caju* με ποσοστό αποχρωματισμού 37,71%.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εξετάστηκαν τα στελέχη των ανώτερων μυκήτων *Agrocybe aegerita* (AMRL 101, AMRL 104), *Lentinula edodes* (AMRL 125, AMRL 126), *Pleurotus sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2), *Pleurotus sajor-caju* (AMRL 197), και *Flamulina velutipes* (AMRL 271) κατά την καλλιέργεια τους σε στερεό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη καθώς και σε στερεό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη στο οποίο έγινε και προθήκη υγρού απόβλητου ελαιουργείου (ΥΑΕ) σε διάφορες συγκεντρώσεις, με σκοπό την παρατήρηση της ταχύτητας γραμμικής αύξησης του μυκηλίου τους και την επιλογή των ταχύτερων στελεχών καθώς και των συγκεντρώσεων ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας που ευνόησαν περισσότερο την κυτταρική αύξηση. Στη συνέχεια ακολούθησε καλλιέργεια των επιλεγμένων στελεχών (*Lentinula edodes* AMRL 126, *Pleurotus sapidus* AMRL 156-2, *Pleurotus sajor-caju* AMRL 197 και *Flamulina velutipes* AMRL 271) σε υγρό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη καθώς και σε υγρό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη στο οποίο επίσης έγινε προθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 15% και 35%, σε μη αναδεδυμένη κατάσταση με σκοπό την μελέτη της κινητικής παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης γλυκόζης, παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους και παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών καθώς και αν η προσθήκη του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας επηρεάζει τις παραπάνω κινητικές. Τέλος μελετήθηκε και η ικανότητα των μελετώμενων στελεχών να αποχρωματίσουν και να μειώσουν το φαινολικό φορτίο του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.

Μέτρηση ταχύτητας γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των στελεχών *Agrocybe aegerita*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Flamulina velutipes* σε στερεά υποστρώματα με διάφορες συγκεντρώσεις ΥΑΕ.

Η ταχύτητα μυκηλιακής αύξησης καταγράφηκε σε οκτώ διαφορετικά στελέχη των μυκήτων *A. aegerita* (AMRL 101, AMRL 104), *L. edodes* (AMRL 125, AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (GPYSA) και σε τρυβλία στα οποία εκτός από το θρεπτικό υπόστρωμα (GPYSA) προστέθηκε και υγρό απόβλητο ελαιουργίας σε συγκεντρώσεις 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (v/v). Από τα οκτώ εξεταζόμενα στελέχη, τα στελέχη του μύκητα *A. aegerita* (AMRL 101, AMRL 104) ήταν αυτά

που εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές ταχύτητας γραμμικής αύξησης (Kr) με το AMRL 101 να εμφανίζει τιμές (2,05-3,32 mm/day) με τις χαμηλότερες τιμές να παρουσιάζονται στα θρεπτικά μέσα με συγκέντρωση ΥΑΕ από 20% και πάνω και με το AMRL 104 να εμφανίζει ίδια εικόνα με το AMRL 101 αλλά με λίγο υψηλότερες τιμές (2,27-3,57 mm/day). Λόγω του ότι τα στελέχη του μύκητα *A. aegerita* εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές (Kr) απορρίφθηκαν στο να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα ζυμώσεων βυθού. Μεταξύ των στελεχών του μύκητα *L. edodes* (AMRL 125, AMRL 126), και τα δύο στελέχη εμφάνισαν παρόμοιες τιμές ταχύτητας, με το στέλεχος AMRL 126 να εμφανίζει γενικά λίγο υψηλότερες τιμές (2,21-5,22 mm/day), σε σχέση με το AMRL 125 (1,55-4,76 mm/day) και με τα δύο στελέχη να εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές (Kr) στα θρεπτικά μέσα με ΥΑΕ σε συγκέντρωση 40% και πάνω. Τα στελέχη του μύκητα *P. sapidus* (AMRL 156-1, AMRL 156-2) εμφάνισαν παρόμοιες τιμές ταχύτητας γραμμικής αύξησης, (2,86-4,90 mm/day) για το AMRL 156-1 και (3,83-5,12 mm/day) για το AMRL 156-2, με το AMRL 156-2 να εμφανίζει γενικά λίγο υψηλότερες τιμές (σε σχέση με το AMRL 156-1) ειδικά στα θρεπτικά μέσα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΥΑΕ (από 35% και πάνω) ενώ αντίθετα το AMRL 156-1 εμφάνισε τις χαμηλότερες του τιμές σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Με βάση αυτή την παρατήρηση προκύπτει το συμπέρασμα ότι το στέλεχος AMRL 156-2 παρουσιάζει μεγαλύτερη ανεκτικότητα στις υψηλές συγκεντρώσεις ΥΑΕ στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας. Τα στελέχη *P. sajor-caju* AMRL 197 και *F. velutipes* AMRL 271 εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές (Kr) σε σχέση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα στελέχη, με το *P. sajor-caju* να εμφανίζει τιμές (4,05-6,45 mm/day) και με το *F. velutipes* να εμφανίζει τιμές (4,02-6,60 mm/day). Επίσης και τα δύο στελέχη εμφάνισαν μεγάλη ανεκτικότητα στην παρουσία των ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας καθώς είχαν ικανοποιητικές τιμές στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν μέχρι και 40% ΥΑΕ ενώ οι τιμές της ταχύτητας γραμμικής αύξησης μειώθηκαν πιο αισθητά μόνο στα θρεπτικά υποστρώματα με 45% και 50% ΥΑΕ.

Οι τιμές ταχύτητας γραμμικής αύξησης (Kr) που εμφάνισαν τα παραπάνω μελετώμενα στελέχη μπορούν να χαρακτηριστούν σε γενικές γραμμές ικανοποιητικές καθώς σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Lakhtar κ.α. (2010), οι οποίοι μελέτησαν πολλά στελέχη του μακρομύκητα *L. edodes* σε στερεή καλλιέργεια με θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις από 0% μέχρι και 100% (v/v), μόνο ένα στέλεχος εμφάνισε υψηλές τιμές Kr (10,72 και 4,97 mm/day) σε θρεπτικά υποστρώματα με 10% και 20% ΥΑΕ αντίστοιχα, ενώ οι

χαμηλότερες τιμές που παρατηρήθηκαν ήταν (1,38 και 0,46 mm/day) στα ίδια θρεπτικά μέσα. Επίσης στη συγκεκριμένη μελέτη αναφέρεται ότι κανένα στέλεχος δεν αναπτύχθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ από 40% και πάνω, σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη κατά την οποία όλα τα εξεταζόμενα στελέχη αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά στα θρεπτικά υποστρώματα με ΥΑΕ από 40% και πάνω. Επίσης οι Zervakis κ.α., 1996, κατά την καλλιέργεια των μυκήτων *P. eryngii* και *P. pulmonarius* σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 25%, 50%, 75% και 100% (v/v), ανέφεραν τιμές Κr 4,7 mm/day, 4,3 mm/day, 3.5 mm/day και 3.4 mm/day για το στέλεχος *P. eryngii* και 6,8 mm/day, 5,9 mm/day, 5,0 mm/day και 6,9 mm/day για το στέλεχος *P. pulmonarius*, στα θρεπτικά υποστρώματα με ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 25%, 50%, 75% και 100% αντίστοιχα.

Κινητική παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης γλυκόζης, συγκέντρωσης λιπιδίων και συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών των *L. edodes* (AMRL 126), *P. sapidus* (AMRL 156-2), *P. sajor-caju* (AMRL 197) και *F. velutipes* (AMRL 271) σε μη αναδευόμενες συνθήκες

Παραγωγή βιομάζας: Η παραγωγή βιομάζας εξαρτάται ως ένα βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξης των μακρομυκήτων, δηλαδή το pH του θρεπτικού μέσου, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ανάπτυξής τους, τον αερισμό και την ανάδευση (Paragianni, 2004). Όμως το σημαντικότερο ρόλο στον τρόπο εκμετάλλευσης του υποστρώματος και στην αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων, παίζουν το στέλεχος του μικροοργανισμού, το είδος του υποστρώματος και κυρίως η διαθέσιμη πηγή άνθρακα και αζώτου. Είναι γνωστό ότι στις υγρές καλλιέργειες μπορεί να παραχθούν μεγάλες ποσότητες μυκηλίου σε σύντομη χρονική περίοδο (Litchfield και Overbeck, 1965; Taguchi κ.α., 1968; Viccini κ.α., 2003; Lee κ.α., 2004). Στις περισσότερες μελέτες, ο συνήθης τρόπος ανάπτυξης των εδώδιμων μυκήτων σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα για παραλαβή μυκηλιακής βιομάζας και διαφόρων μεταβολικών (ενζύμων, πολυσακχαριτών, λιπιδίων) είναι χρησιμοποιώντας απλές πηγές άνθρακα με κυρίαρχη πηγή τη γλυκόζη (Higashiyama κ.α. 2002; Gern κ.α., 2008; Xu κ.α., 2008; Fernandes κ.α., 2011; Komura κ.α., 2010; Kim κ.α., 2010) ενώ ως πηγή αζώτου προτιμώνται συνήθως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης (Chang και Steinkraus, 1982; Higashiyama κ.α. 2002; Fernandes κ.α., 2011; Meng κ.α., 2010; Feng κ.α., 2010; Komura κ.α., 2010; Kim κ.α., 2010).

Στην παρούσα μελέτη ως κύρια πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη και ως κύρια πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα ζύμης, επίσης στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας έγινε προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 15% και 35% με σκοπό να διερευνηθεί αν και κατά πόσο η παρουσία του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας επηρεάζει την ανάπτυξη και την φυσιολογική συμπεριφορά των μελετώμενων στελεχών. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι όλα τα στελέχη εμφάνισαν υψηλή παραγωγή βιομάζας στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ, παρόλο που τα ΥΑΕ είναι ιδιαίτερα τοξικά. Η αυξημένη παραγωγή βιομάζας των εξεταζόμενων στελεχών πιθανός οφείλετε στο γεγονός ότι τα ΥΑΕ πέρα από την υψηλή τοξικότητα τους περιέχουν επίσης και διάφορα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία) τα οποία προφανώς προάγουν την κυτταρική αύξηση. Στα υποστρώματα που μελετήθηκαν, σε μη αναδεδυόμενη κατάσταση, τις μεγαλύτερες τιμές βιομάζας εμφάνισαν όλα τα στελέχη στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις τιμές της ταχύτητας γραμμικής αύξησης (Kg, mm/day) όπου οι μελετώμενοι μύκητες εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές στο θρεπτικό υπόστρωμα με 15% ΥΑΕ. Άρα τα δύο αυτά μεγέθη δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Το στέλεχος *L. edodes* παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας (16,79 g/L,) με $Y_{X/S}$ (0,67 g/g), ακολούθησαν τα στελέχη *F. velutipes* (16,14 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,63 g/g), *P. sapidus* (15,19 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,58 g/g) και *P. sajor-caju* (9,59 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,66 g/g). Στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας για όλα τα στελέχη ήταν λίγο μικρότερη, συγκεκριμένα για το *L. edodes* ήταν (16,15 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,60 g/g), για το *P. sapidus* ήταν (11,07 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,41 g/g), για το *F. velutipes* ήταν (11,75 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,49 g/g) και για το *P. sajor-caju* ήταν (7,70 g/L) με $Y_{X/S}$ (0,53 g/g), ενώ στο θρεπτικό μέσο στο οποίο δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ οι μέγιστες τιμές βιομάζας ήταν πιο χαμηλές με το *L. edodes* να παράγει 10,47 g/L με $Y_{X/S}$ (0,43 g/g), το *P. sapidus* παρήγαγε 5,29 g/L με $Y_{X/S}$ (0,24 g/g), το *F. velutipes* παρήγαγε 4,71 g/L με $Y_{X/S}$ (0,26 g/g) και το *P. sajor-caju* παρήγαγε 6,35 g/L με $Y_{X/S}$ (0,30 g/g).

Αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει για τους μύκητες της παρούσας μελέτης σε καλλιέργειες βυθού κατέγραψαν σε ορισμένες περιπτώσεις παρεμφερή αποτελέσματα, ενώ σε άλλες υπήρχε σημαντική διακύμανση μεταξύ των τιμών. Συγκεκριμένα, αναφορικά με του μύκητες του γένους *Pleurotus*, οι Gern κ.α., (2008) κατέγραψαν σε καλλιέργεια βυθού διάρκειας 8-14 ημερών του *P. ostreatus* σε αναδεδυόμενες φιάλες (120 g/m) και σε υπόστρωμα γλυκόζης 40 g/L με εκχύλισμα καλαμποκιού (20 g/L), πολύ υψηλή παραγωγή βιομάζας (26,64 g/L), τιμή σημαντικά πιο

αυξημένη σε σχέση με τις τιμές των στελεχών του γένους *Pleurotus* που μελετήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία (*P. sapidus* 5,29 g/L και *P. sajor-caju* 6,35 g/L). Αντίθετα, οι Ardon κ.α. (1996) ανέφεραν για τον ίδιο μύκητα σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας (4,8 g/L) σε υπόστρωμα γλυκόζης (5 g/L) και εκχυλίσματος από στέλεχος βαμβακιού. Επιπρόσθετα οι Diamantopoulou κ.α., (2012) κατά την καλλιέργεια των στελεχών *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*, σε ζυμώσεις βυθού διάρκειας 16 ημερών με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, κατέγραψαν τιμές παραγωγής βιομάζας, υπό συνθήκες ανάδευσης (120 rpm), 16,9 g/L και 16,2 g/L αντίστοιχα και υπό στατικές συνθήκες 4,2 g/L και 8,8 g/L αντίστοιχα. Ακόμη οι Confortin κ.α. (2008) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *P. sajor-caju* σε μηχανικώς αναδευόμενους βιοαντιδραστήρες ενεργού όγκου 5 L χρησιμοποιώντας διάφορα σάκχαρα ως υλικό εκκίνησης της ζύμωσης (γλυκόζη, σακχαρόζη, κ.λ.π.) κατέγραψαν τιμές βιομάζας που κυμαίνονταν μεταξύ 5,9 και 8,2 g/L.

Οι Maziero κ.α. (1999) ανέφεραν ότι κατά την καλλιέργεια των μυκήτων *F. velutipes* και *L. edodes* σε υπόστρωμα γλυκόζης (39 g/L), για 14 ημέρες σε ανακινούμενες φιάλες, οι τιμές της βιομάζας ήταν 8,28 g/L και 4,70 g/L αντίστοιχα, τιμές υψηλότερες για το στέλεχος *F. velutipes* και χαμηλότερες για το *L. edodes*, σε σχέση με τις τιμές της παρούσας μελέτης (4,71 g/L και 10,74 g/L, αντίστοιχα). Επίσης, οι Lomberh κ.α. (2002) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* σε αναδευόμενες φιάλες (διάρκειας 10 ημερών) κατέγραψαν μυκηλιακή βιομάζα 6,1 g/L, τιμή εξίσου υψηλή. Οι Diamantopoulou κ.α. (2012, 2014) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. velutipes* κατέγραψαν εξίσου υψηλές τιμές, καθώς ο μύκητας *F. velutipes* κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, σε στατικές συνθήκες και σε συνθήκες ανάδευσης εμφάνισε τιμές παραγόμενης βιομάζας 12,08 και 19,70 g/L αντίστοιχα, ενώ κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* στις ίδιες συνθήκες εμφάνισε σχετικά χαμηλές τιμές 1,8 και 3,6 g/L αντίστοιχα. Ακόμη οι Shin κ.α. (2007) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. velutipes* σε μηχανικώς αναδευόμενους βιοαντιδραστήρες κατέγραψαν ιδιαίτερα χαμηλή τιμή παραγόμενης βιομάζας (~3,2 g/L), τιμή χαμηλότερη από αυτή της παρούσας μελέτης. Από την μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει έλλειψη σε δεδομένα που αφορούν την παραγωγή βιομάζας σε ζυμώσεις εδωδιμων μυκήτων σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν ΥΑΕ. Συγκεκριμένα οι D'Annibale κ.α. (2003) κατά την καλλιέργεια του μύκητα *L. edodes* σε αποστειρωμένο και μη αραιωμένο ΥΑΕ κατέγραψαν παραγωγή βιομάζας (~5 g/L) στα τελευταία

στάδια της ζύμωσης. Σε αντίστοιχα αποτελέσματα οδηγήθηκαν και οι Foundoulakis κ.α. (2002), οι οποίοι κατά την καλλιέργεια του μύκητα *P. ostreatus*, σε θερμικά επεξεργασμένο, μη αραιωμένο ΥΑΕ και σε αποστειρωμένο, αραιωμένο 50% (v/v) ΥΑΕ, κατέγραψαν τιμές παραγόμενης βιομάζας ~5,5 g/L και ~5 g/L αντίστοιχα, επίσης στο τέλος της ζύμωσης.

Κατανάλωση υποστρώματος: Όσον αφορά στην κατανάλωση υποστρώματος, όλα τα στελέχη εμφάνισαν παρόμοια εικόνα κατανάλωσης γλυκόζης, με μεγαλύτερη κατανάλωση να παρατηρείται στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ και μικρότερη σε αυτό που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, γεγονός που δικαιολογείται καθώς η παραγωγή βιομάζας, για όλα τα στελέχη, ήταν πιο αυξημένη στα θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ΥΑΕ σε σχέση με αυτό στο οποίο δεν έγινε προσθήκη. Εξαιρέση αποτέλεσε μόνο το στέλεχος *P. sajor-caju* το οποίο εμφάνισε μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης το θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ (28,46%, ακατανάλωτη γλυκόζη), ενώ στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ τα ποσοστά ακατανάλωτης γλυκόζης ήταν 41,1% και 51,83% αντίστοιχα. Επίσης το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν εκείνο που κατανάλωσε τις μικρότερες ποσότητες γλυκόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα, γεγονός που ταυτίζεται και με την πορεία ανάπτυξης του, καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος παρήγαγε μικρότερες ποσότητες βιομάζας σε σχέση με τα υπόλοιπα. Το στέλεχος *F. velutipes* ήταν εκείνο που κατανάλωσε όλη την ποσότητα γλυκόζης στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ, γεγονός που ταυτίζεται με την πορεία ανάπτυξης του, καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε πτώση την παραγόμενης βιομάζας μετά την ολοκληρωτική κατανάλωση της γλυκόζης του υποστρώματος, επίσης για το ίδιο στέλεχος, στο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε ΥΑΕ ένα ποσοστό της τάξης του 26,3% παρέμεινε ανεκμετάλλευτο. Το στέλεχος *P. sapidus* επίσης κατανάλωσε μεγάλο μέρος της γλυκόζης του θρεπτικού μέσου με ποσοστά 26,8%, 11,06% και 6,56%, στα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ, με 15% ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα, να παραμένουν ανεκμετάλλευτα. Τέλος το στέλεχος *L. edodes* παρουσίασε και αυτό μεγάλη κατανάλωση της γλυκόζης του υποστρώματος, με ποσοστά 18,66%, 5,33% και 16,3%, στα τα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ, με 15% ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα, να παραμένουν ανεκμετάλλευτα. Από την μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει έλλειψη σε δεδομένα που αφορούν την κατανάλωση υποστρώματος σε ζυμώσεις εδώδιμων μυκήτων σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν ΥΑΕ, ώστε να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Προσδιορισμός ολικών λιπιδίων: Η μελέτη των λιπιδίων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι στη μελέτη της φυσιολογίας και της βιοχημείας των μικροοργανισμών λόγω των πολλαπλών και πολύ σημαντικών ρόλων που παίζουν στις λειτουργίες του μικροβιακού κυττάρου. Ειδικότερα, τα λιπίδια των μυκήτων αποτελούν δομικούς λίθους των μεμβρανών και του κυτταρικού τοιχώματος, αποθησαυριστικά μόρια και σε κάποιες περιπτώσεις εξωκυτταρικά προϊόντα (Losel, 1988; Aggelis, 2009). Γενικά, το σύνολο των ολικών λιπιδίων των ανώτερων μυκήτων ποικίλει βάσει του είδους από 0,6 έως 18,4% (κ.β.) επί ξηρού (Miric κ.α., 1985; Losel, 1988; Hong κ.α., 1988; Hiroi & Tsuyuki, 1988; Chang & Miles, 2004). Σύμφωνα με τον Aggelis (2009) τα λιπίδια των μυκήτων θεωρητικά φτάνουν μέχρι το 25% επί ξηρό βάρος. Όταν πρόκειται όμως για ελαιογόνους μύκητες, το ποσοστιαίο λίπους ξεπερνάει το 20 – 25% του βάρους επί ξηρού (Ratledge, 1989α). Επίσης, συγκεντρώσεις λιπιδίων μεγαλύτερες των 10 g/L θεωρούνται ιδιαίτερα ικανοποιητικές (Ratledge, 1994).

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η παραγωγή λιπιδίων των τεσσάρων ειδών μανιταριών, σε δύο σημεία της κινητικής τους (33^η και 44^η ημέρα για το *L. edodes*, 20^η και 33^η ημέρα για τα *P. sapidus* και *F. velutipes*, 20^η και 40^η ημέρα για το *P. sajor-caju*). Ο μακρομύκητας *F. velutipes* ήταν εκείνο που εμφάνισε την μεγαλύτερη τιμή παραγωγής λιπιδίων (1,23 g/L) στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ, ενώ χαμηλότερες τιμές (0,59 g/L και 0,66 g/L) εμφάνισε στα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα, επίσης το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές παραγωγής λιπιδίων σε όλα τα θρεπτικά μέσα κατά την 20^η ημέρα καλλιέργειας του. Ο μακρομύκητας *L. edodes* ήταν εκείνο που παρήγαγε την δεύτερη μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων (1,18 g/L) στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ κατά την 33^η ημέρα καλλιέργειας, επίσης ικανοποιητικές ήταν και οι ποσότητες που παρήγαγε το συγκεκριμένο στέλεχος και στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ, 1,02 g/L και 0,71 g/L αντίστοιχα, κατά την 44^η ημέρα καλλιέργειας του. Ακολουθεί ο *P. sajor-caju* με τιμές παραγόμενου λίπους 0,65 g/L στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ την 40^η ημέρα καλλιέργειας του, 0,51 g/L στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ την 20^η ημέρα καλλιέργειας του και 0,45 g/L στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ την 40^η ημέρα καλλιέργειας. Τέλος το στέλεχος *P. sapidus* εμφάνισε παρόμοιες τιμές με το *P. sajor-caju*, με τιμή παραγόμενου λίπους 0,48 g/L να εμφανίζεται στα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ την 20^η και την 33^η ημέρα καλλιέργειας αντίστοιχα, ενώ στο θρεπτικό μέσο με

15% ΥΑΕ η τιμή ήταν λίγο μεγαλύτερη (0,57 g/L) κατά την 20^η ημέρα καλλιέργειας. Γενικά οι ποσότητες των παραγόμενων λιπιδίων των εξεταζόμενων στελεχών μπορούν να θεωρηθούν ως χαμηλές, γεγονός που συνάδει βέβαια με την μη ελαιογόνο φύση τους.

Σε ό,τι αφορά το (%) λίπος επί ξηρού βάρους, όλα τα στελέχη παρουσίασαν την ίδια εικόνα, με μεγαλύτερα ποσοστά να εμφανίζονται στο πρώτο σημείο δοκιμής σε σχέση με το δεύτερο. Παρατηρείται δηλαδή υψηλή συγκέντρωση του μύκητα σε λίπος (% κ.β. επί ξηρής μάζας) σε αρχικό στάδιο της ζύμωσης, ενώ όσο η βιοδιεργασία συνεχίζεται και αυξάνεται η μυκηλιακή βιομάζα παρατηρείται ανακατανάλωση των μικροβιακών λιπιδίων, με αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των λιπιδίων ως % κ.β. επί ξηρής βιομάζας. Αντίστοιχη μείωση στη συγκέντρωση των λιπιδίων έχει αναφερθεί και από τους Nair (1989; 1990) για τον μύκητα *P. sajor-caju*, καθώς και από τους Diamantopoulou κ.α. (2014), όπου κατά την καλλιέργεια των μυκήτων *A. aegerita*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *M. esculenta*, *P. pulmonarius*, παρατήρησαν σημαντικά πιο αυξημένες τιμές λιπιδίων ως % κ.β. στα πρώιμα στάδια της ζύμωσης (8η-12η ημέρα) σε σχέση με το τελικό στάδιο της διεργασίας (24^η ημέρα). Επίσης όλα τα στελέχη εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά, κατά την καλλιέργεια τους στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ, σε σχέση με τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ. Μπορεί μεν η παραγωγή λιπιδίων (g/L) να ήταν μεγαλύτερη στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ, λόγω του ότι η παραγωγή βιομάζας ήταν μεγαλύτερη, σε σχέση με το θρεπτικό μέσο που δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, όμως το % ποσοστό περιεχόμενου ενδοκυτταρικού λίπους στην βιομάζα ήταν σημαντικά μικρότερο κατά την καλλιέργεια στα θρεπτικά μέσα με ΥΑΕ απ' ότι στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ. Ενδεικτικά οι μέγιστες τιμές του % λίπους κ.β. στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ ήταν για το *F. velutipes* (16,68%), για το *P. sajor-caju* (14,61%), για το *L. edodes* (13,35%) και για το *P. sapidus* (9,72%), ενώ στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ οι μέγιστες τιμές ήταν μικρότερες και κυμαίνονταν μεταξύ 5,26-8,83%, με κάποια στελέχη να εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ και άλλα στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, με μικρές όμως διαφορές μεταξύ τους. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το στέλεχος *F. velutipes*, το οποίο εμφάνισε υψηλές τιμές (10,49% και 14,87%) και στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ αντίστοιχα.

Οι παραπάνω τιμές μπορούν να χαρακτηρισθούν ως απόλυτα φυσιολογικές καθώς με βάση την διεθνή βιβλιογραφία εδώδιμοι και φαρμακευτικοί μύκητες όπως οι *P. ostreatus*, *P.*

pulmonarius, *P. cornucopiae*, *P. sajor-caju*, *Stropharia aeruginosa*, *Phellinus* spp., *F. velutipes*, *Boletus* spp., *L. edodes*, *M. esculenta*, *G. frondosa*, *V. bombycina* κ.λ.π., κατά την μυκηλιακή ανάπτυξη τους έχουν αναφερθεί ότι περιέχουν λιπίδια σε ποσότητες $\leq 10\%$ κ.β., επί ξηρού βάρους (Nair κ.α., 1990; Dembitsky κ.α., 1992; Cheung, 1997; Bessalova κ.α., 2002; Dimou κ.α., 2002; Pedneault κ.α., 2006, 2007; André κ.α., 2010). Ακόμη συνολικά λιπίδια σε μεγαλύτερες ποσότητες (14,2-16,3% κ.β.), έχουν αναφερθεί για τα μυκήλια των μανιταριών *Polyporus hirsutus* και *Calvatia caelata* (Sumner, 1973), ενώ ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες έχουν αναφερθεί για τα μυκήλια των μακρομυκήτων *G. frondosa* (~25%, κ.β. -Tsai κ.α., 2006), *G. tsugae* (~22%, κ.β. -Tseng κ.α., 2005) και *L. edodes* (~20%, κ.β. -Feofilova κ.α., 1998). Οι Diamantopoulou κ.α. (2014), κατά την καλλιέργεια των μυκήτων *A. aegerita*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *M. esculenta*, *P. pulmonarius*, σε στατικές και αναδεδυόμενες (120 rpm) συνθήκες, με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, επίσης αναφέρουν ιδιαίτερα αυξημένες τιμές βιοσυσσώρευσης μικροβιακών λιπιδίων, οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 10 και 20% για τις στατικές καλλιέργειες και μεταξύ 13% και 22% για τις αναδεδυόμενες, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να παρουσιάζουν τα στελέχη *M. esculenta* και *A. aegerita*. Τέλος η συγκέντρωση των λιπιδίων στο καρπόσωμα των περισσότερων ειδών μανιταριών δεν ξεπερνά το 8% κ.β. (Chang και Miles, 2004). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι: *A. bisporus* (1,7-1,8%, κ.β.), *Auricularia* sp. (8,3%, κ.β.), *F. velutipes* (1,9%, κ.β.), *L. edodes* (4,9-8%, κ.β.), *P. ostreatus* (1,6-2,2%, κ.β.), *V. volvacea* (2,4%, κ.β.), *V. diplasia* (2,6%, κ.β.).

Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών: Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, μελετήθηκε επίσης και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών των τεσσάρων ειδών μακρομυκήτων, σε δύο σημεία της κινητικής τους (33^η και 44^η ημέρα για τον *L. edodes*, 20^η και 33^η ημέρα για τους *P. sapidus* και *F. velutipes*, 20^η και 40^η ημέρα για τον *P. sajor-caju*). Το στέλεχος *L. edodes* ήταν εκείνος που παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (5,46 g/L), στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ, την 33^η ημέρα καλλιέργειας του, επίσης μεγάλη παραγωγή (4,52 g/L), την 44^η ημέρα καλλιέργειας, εμφάνισε και στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, ενώ στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ η παραγωγή ήταν μικρότερη (4,13 g/L). Το στέλεχος *P. sapidus* εμφάνισε επίσης υψηλή τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (4,00 g/L), στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ, μεγάλη τιμή (3,92 g/L) εμφάνισε και στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, ενώ στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ η

τιμή ήταν μικρότερη (2,02 g/L). Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών σε όλα τα θρεπτικά μέσα κατά την 33^η ημέρα καλλιέργειάς του. Ακολουθεί το στέλεχος *P. sajor-caju*, με τιμές παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών 3,42 g/L στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ, 2,66 g/L σε 15% ΥΑΕ και 2,50 g/L στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ, το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε τις μέγιστες τιμές παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών την 40η ημέρα καλλιέργειας του. Τέλος ο μακρομύκητας *F. velutipes* παρουσίασε παρόμοιες τιμές με τον *P. sajor-caju*, με μέγιστη τιμή 3,22 g/L, στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ την 20^η ημέρα καλλιέργειας του και τιμές 3,03 g/L και 1,81 g/L, στα θρεπτικά μέσα με 35% ΥΑΕ και χωρίς ΥΑΕ αντίστοιχα, την 33^η ημέρα καλλιέργειάς του. Γενικά όλα τα στελέχη παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ σε σχέση με αυτό στο οποίο δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, γεγονός που δικαιολογείται καθώς στα θρεπτικά μέσα με ΥΑΕ η παραγωγή βιομάζας ήταν σημαντικά πιο αυξημένη. Όσον αφορά στο (%) ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρού βάρους, όλα τα στελέχη εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά κατά την καλλιέργειά τους στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ, σε σχέση με αυτά που περιείχαν ΥΑΕ και πάλι όμως οι διαφορές στις τιμές ήταν μικρές. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε ο μακρομύκητας *P. sajor-caju*, όπου εμφάνισε μεγαλύτερη τιμή στο θρεπτικό μέσο με 15% και λίγο μικρότερη στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ. Επίσης, σχεδόν όλοι οι μύκητες εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά την δεύτερη ημέρα δοκιμής σε σχέση με την πρώτη, με εξαίρεση να αποτελούν ο *L. edodes*, ο οποίος εμφάνισε μεγαλύτερα ποσοστά την πρώτη ημέρα της μέτρησης, στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ και το στέλεχος *F. velutipes* το οποίο εμφάνισε μεγαλύτερη τιμή την πρώτη ημέρα μέτρησης στο θρεπτικό μέσο με 35% ΥΑΕ. Το στέλεχος *F. velutipes* ήταν εκείνο που εμφάνισε το μεγαλύτερο (%) ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών κ.β. (44,13%) στο θρεπτικό μέσο χωρίς ΥΑΕ, ενώ στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ οι τιμές ήταν λίγο μικρότερες 32,51% και 26,80% αντίστοιχα. Την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή (42,21%) εμφάνισε το στέλεχος *P. sajor-caju* στο θρεπτικό μέσο με 15% ΥΑΕ, ενώ στα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ οι τιμές ήταν 39,36% και 35,72% αντίστοιχα. Ακολούθησε το στέλεχος *L. edodes* με τιμές 39,45%, 36,69% και 31,89% κ.β., στα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ, με 15% ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα. Τέλος το στέλεχος *P. saipidus* είχε τιμές 38,10%, 36,08% και 29,52%, στα θρεπτικά μέσα χωρίς ΥΑΕ, με 15% ΥΑΕ και με 35% ΥΑΕ αντίστοιχα. Γενικά οι διαφορές μεταξύ των τιμών δεν είναι μεγάλες καθώς

όλοι οι μακρομύκητες εμφάνισαν παρόμοιες τιμές τόσο μεταξύ τους όσο και μεταξύ των διαφορετικών θρεπτικών μέσων.

Τα αποτελέσματα παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών της παρούσας πτυχιακής μελέτης μπορούν να θεωρηθούν ως πολύ ικανοποιητικά καθώς όλα τα μελετώμενα στελέχη παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών σε σχέση με αυτές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα σε πείραμα των Fang κ.α., 2002, κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *G. lucidum* σε σύστημα ανακινούμενων φιαλών με πηγή άνθρακα την γλυκόζη, ο μύκητας παρήγαγε μέγιστες τιμές ενδοπολυσακχαριτών της τάξης των ~1,2 g/L (11%, κ.β.). Οι Tang και Zhong (2002), επίσης κατά την μελέτη του ίδιου στελέχους *G. lucidum* σε καλλιέργειας με πηγή άνθρακα την λακτόζη ανέφεραν μέγιστες τιμές παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών της τάξης των ~2,5 g/L (14.65%, κ.β.). Οι Zhou κ.α. (2009) κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *G. umbellate* κατέγραψαν μέγιστες τιμές ενδοπολυσακχαριτών (3,83 g/L) σε υπόστρωμα γλυκόζης, οι οποίες ήταν πολύ μεγαλύτερες από αυτές των υποστρωμάτων φρουκτόζης και σακχαρόζης. Επιπρόσθετα οι Diamantopoulou κ.α. (2014) κατά την καλλιέργεια στελεχών των μυκήτων *A. aegerita*, *P. pulmonarius*, *F. velutipes*, *M. esculenta* και *G. applanatum*, σε ανακινούμενες και στατικές φιάλες, με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, κατέγραψαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα τα στελέχη *A. aegerita*, *F. velutipes* και *P. pulmonarius* εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές (5,8, 6,7 και 10,9 g/L, με ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας 55,23, 51,4 και 48,4 %, κ.β., αντίστοιχα), κατά την καλλιέργεια τους υπό συνθήκες ανάδευσης, ενώ τα στελέχη *M. esculenta* και *G. applanatum* εμφάνισαν ελαφρώς πιο χαμηλές τιμές (3,86 και 6,3 g/L, με ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας 30,4 και 40,9 %, κ.β., αντίστοιχα) κατά την ανάπτυξη τους σε στατικές συνθήκες. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού % ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς βιομάζας, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με τις μεγαλύτερες τιμές να εμφανίζονται σε αρχικά στάδια της ζύμωσης σε σχέση με το τέλος αυτής.

Τέλος έχουν αναφερθεί αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις πολυσακχαριτών και στα καρποσώματα των μακρομυκήτων, π.χ. 61-64%, κ.β. σε *P. ostreatus*, *P. cystidiosus* και *L. edodes* (Yang κ.α., 2001), 46,6-81,8%, κ.β. σε *P. ostreatus* (Bano και Rajarathanam, 1988; Chang και Miles, 2004), 50,7%, κ.β. σε *P. cystidiosus*, 57,4%, κ.β. σε *Volvariella diplasia*,

73,1%, κ.β. σε *F. velutipes* και 67,5-78%, κ.β. σε *L. edodes* (Chang & Miles, 2004), 44,0-74,3% κ.β. σε διάφορα αυτοφυή και εδώδιμα μανιτάρια (Crisan και Sands, 1978).

Αποφαινόλωση και αποχρωματισμός: Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η ικανότητα των εξεταζόμενων στελεχών να μειώσουν την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (αποφαινόλωση) καθώς και να αποχρωματίσουν το περιεχόμενο υγρό απόβλητο ελαιουργείου (ΥΑΕ) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Όλα τα στελέχη εμφάνισαν μεγάλη ικανότητα μείωσης του φαινολικού φορτίου του αποβλήτου και στα δύο θρεπτικά μέσα τα οποία περιείχαν ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 15% και 35%. Συγκεκριμένα τα ποσοστά μείωσης των φαινολικών ενώσεων και στα δυο θρεπτικά μέσα για κάθε στέλεχος ήταν (οι παρακάτω τιμές αναφέρονται στα θρεπτικά μέσα με 15% και 35% ΥΑΕ αντίστοιχα): *L. edodes* (83,3% και 89,1%), *P. sapidus* (80% και 84,8%), *P. sajor-caju* (80% και 82%) και *F. velutipes* (63,3% και 76,3%). Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω ποσοστά όλα τα στελέχη μείωσαν σημαντικά την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων με μόνο το στέλεχος *F. velutipes* να εμφανίζει λίγο μικρότερη ικανότητα αποφαινόλωσης σε σχέση με υπόλοιπα. Όσον αφορά στην ικανότητα των στελεχών να αποχρωματίσουν το περιεχόμενο ΥΑΕ στα θρεπτικά μέσα της καλλιέργειας, οι μέγιστες τιμές αποχρωματισμού ήταν οι εξής: *L. edodes* (87,01% και 74,56%), *P. sapidus* (80,84% και 74,86%), *P. sajor-caju* (38,96% και 37,71%) και *F. velutipes* (76,77% και 76,98%). Όλα τα στελέχη εμφάνισαν μεγάλη ικανότητα αποχρωματισμού του αποβλήτου και μόνο το στέλεχος *P. sajor-caju* δεν κατάφερε να αποχρωματίσει το απόβλητο σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο τα υπόλοιπα. Παρόλα αυτά ακόμα και οι τιμές του στελέχους *P. sajor-caju*, που ήταν οι μικρότερες, θεωρούνται ικανοποιητικές.

Η καλλιέργεια βασιδιομυκήτων σε θρεπτικά μέσα στα οποία προστίθενται ΥΑΕ με σκοπό την μείωση του ρυπαντικού φορτίου του αποβλήτου (μείωση φαινολικών ενώσεων και αποχρωματισμός αποβλήτου) είναι μια διεργασία με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οι βασιδιομήκυτες λευκής σήψης είναι ικανοί να παράγουν λιγνολυτικά ένζυμα τα οποία μπορούν να αποδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα ΥΑΕ λόγω της παρόμοιας δομής τους με την λιγνίνη. Συγκεκριμένα οι Zerva κ.α. (2017), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού των στελεχών *P.citrinopileatus* LGAM 28684 και *I. lacteus* LGAM 238, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΑΕ (25%). Και τα δύο στελέχη έδωσαν πολύ καλά αποτελέσματα με το *P.citrinopileatus* να επιτυγχάνει μέγιστη

μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά (86,4%) και μέγιστο αποχρωματισμό κατά (79.1%) και με το *I. lacteus citrinopileatus* να επιτυγχάνει μέγιστη μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά (86,4%) και μέγιστο αποχρωματισμό κατά (86,3%) μετά από ζύμωση με διάρκεια 22 ημέρες. Επίσης οι Ntougias κ.α. (2012), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού διαφόρων στελεχών του γένους *Ganoderma* και του γένους *Pleurotus*, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΑΕ (25%). Η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων μειώθηκε σημαντικά από όλα τα στελέχη του γένους *Ganoderma* (μείωση κατά 40,8 – 43,5% και 60,4 – 65,0%, μετά από 10 και 20 ημέρες ζύμωσης αντίστοιχα) ενώ τα καλύτερα αποτελέσματα αποχρωματισμού παρουσίασαν τα στελέχη *G. australe* και *G. camosum* με ποσοστά αποχρωματισμού 40,2% και 31,5% μετά από 20 ημέρες ζύμωσης. Από τα είδη του γένους *Pleurotus*, καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν τα στελέχη *P. ostreatus* και *P. eryngii* με ποσοστά μείωσης των φαινολικών ενώσεων κατά 62,5% και 73,9% αντίστοιχα, μετά από 20 ημέρες ζύμωσης και με ποσοστά αποχρωματισμού 44,0% και 64,8% αντίστοιχα, μετά από 30 ημέρες ζύμωσης. Ακόμη οι Fountoulakis κ.α. (2002), μελέτησαν την ικανότητα μείωσης των περιεχόμενων στα ΥΑΕ φαινολικών ενώσεων του στελέχους *P. ostreatus* LGAM P69 σε υγρές καλλιέργειες κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Το πρώτο περιείχε 50% ΥΑΕ και 50% νερό και αποστειρώθηκε στους 120 °C, το δεύτερο περιείχε 50% ΥΑΕ και 50% νερό και επεξεργάστηκε θερμικά στους 100 °C και το τρίτο περιείχε μόνο ΥΑΕ και επεξεργάστηκε θερμικά στους 100 °C. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι ο μύκητας *P. ostreatus* μείωσε την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων κατά 78,3% στο πρώτο θρεπτικό μέσο, κατά 66,7% στο δεύτερο και κατά 64,7% στο τρίτο. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι βασιδιομύκητες διαθέτουν μεγάλη ικανότητα απορρύπανσης των ΥΑΕ και συνεπώς η καλλιέργεια τους με σκοπό την επεξεργασία και αποτοξίνωση των ΥΑΕ είναι μια διεργασία η οποία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και θετικές προοπτικές ως μέθοδος βιολογικής επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης προκρίπτεται το συμπέρασμα ότι οι μακρομύκητες *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes* και *Flammulina velutipes* είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν υγρά απόβλητα ελαιουργίου (ΥΑΕ) και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις (35%), καθώς η παρουσία του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας επέδρασε θετικά στην φυσιολογική ανάπτυξη των μυκήτων, οι οποίοι παρουσίασαν σημαντικά πιο αυξημένη παραγωγή βιομάζας κατά την καλλιέργειά τους σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ΥΑΕ σε σχέση με αυτό στο οποίο δεν έγινε προσθήκη. Αντιθέτως, αρνητικό ρόλο έπαιξε η παρουσία των ΥΑΕ στην παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων καθώς σε όλα τα μελετώμενα στελέχη παρατηρήθηκε μικρότερη βιοσυσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (% κ.β.) στα θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ΥΑΕ σε σχέση με αυτό στο οποίο δεν έγινε προσθήκη. Επίσης η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από την παρουσία των ΥΑΕ στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, με τα μελετώμενα στελέχη να εμφανίζουν λίγο μικρότερες τιμές παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ, χωρίς όμως οι διαφορές μεταξύ των τιμών να είναι σημαντικές. Τέλος, όλοι οι μακρομύκητες παρουσίασαν μεγάλη ικανότητα αποφαινώσεως (~75-89%) του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μειώνοντας σημαντικά το φαινολικό φορτίο καθώς και την ένταση του χρώματος του αποβλήτου (~75-87%), γεγονός που καθιστά την χρήση μακρομυκήτων ως μια εναλλακτική μέθοδο βιολογικής επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας με ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλης διατροφικής αξίας προϊόντων (βιομάζα, πολυσακχαρίτες, λιπίδια).

Βιβλιογραφία

- Aggelis G., (2009). Microbial conversions of raw gucerol. In: *Nova Biomedical* (eds N. York), Nova Science Publishers INC, New York
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tzagou, V., 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. doi:10.1016/s0043-1354(03)00313-0
- Al-Malah, K., Azzam, M. O., & Abu-Lail, N. I. (2000). Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separation and Purification Technology*, 20(2-3), 225-234. doi:10.1016/s1383-5866(00)00114-3
- Alonso, M. V., Aparico, R., Calvente, J. J., & Morales, M. T. (1994). Good control practices underlined by an on-line fuzzy control database. *Grasas Aceites*, 45, 75-81.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: Production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 407-416. doi:10.1016/j.indcrop.2009.12.011
- Bagci, E., Bruehl, L., Aitzetmuller, K., & Altan, Y. (2003). A chemotaxo-nomic approach to the fatty acid and tocochromanol content of *Cannabis sativa L.* (*Cannabaceae*). *Turkish Journal of Botany*, 27, 141-147.
- Bano, Z., Rajarathnam, S., & Steinkraus, K. H. (1988). *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27(2), 87-158. doi:10.1080/10408398809527480
- Bespalova, L. A., Makarov, O. E., Antonyuk, L. P., & Ignatov, V. V. (2002). Lipogenesis in the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* cultivated on different media. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 4(38), 349-354.
- Block, S. S., Tsao, G., & Han, L. (1958). Mushroom cultivation, production of mushrooms from sawdust. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(12), 923-927. doi:10.1021/jf60094a009
- Boari, G., & Mancini, I. M. (1990). Combined treatments of urban and olive omill effluents in Apulia, Italy. *Water Science and Technology*, 22(9), 235-240. doi:10.2166/wst.1990.0087
- Breene, W. M. (1990). Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53(10), 883-894. doi:10.4315/0362-028x-53.10.883
- Burla, G., Garzillo, A., Luna, M., Cardelli, L. E., & Schiesser, A. (1992). Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *Bioresource Technology*, 42(2), 89-94. doi:10.1016/0960-8524(92)90066-7
- Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1-14. doi:10.1016/s1389-1723(99)80001-2
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (2nd ed.). CRC Press.
- Chang, S. C., & Teinkraus, K. H. (1982). Lignocellulolytic enzymes produced by *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), 440-446.
- Chavant, L., Wolf, C., Fonvieille, J., & Dargent, R. (1981). Deviation from the usual relationships between the temperature, the growth rate, the fatty acid composition and the lipid microviscosity of four different fungi (*Mucor mucedo*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Achlya bisexualis*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101(3), 912-920. doi:10.1016/0006-291x(81)91836-2
- Chen A.W., 2002. Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst (Reishi) in North America (3). *MushWorld Cultivation*

- Cheung, P. (1997). Chemical evaluation of some lesser known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soy milk waste. *Food Chemistry*, 60(1), 61-65. doi:10.1016/s0308-8146(96)00310-x
- Cheung, P. C. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. doi:10.1002/9780470367285.ch3
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., & Fukuoka, F. (1970). Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature*, 222(5194), 687-688. doi:10.1038/222687a0
- Crisan, E.V. and Sands, A. (1978). Nutritional value. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (S.T. Chang and W.A. Hayes eds.), Academic Press, New York.
- Davies, J., & Holdsworth, J. (1992). Synthesis of lipids in yeasts, biochemistry, physiology and production. *Advances in Lipid Research*, 1, 119-159.
- Delmas, J. (1989). *Les champignons et leur culture*. Paris: Flammarion.
- Dembitsky, V. M., Shubina, E. E., & Kashin, A. G. (1992). Phospholipid and fatty acid composition of some Basidiomycetes. *Phytochemistry*, 31(3), 845-849. doi:10.1016/0031-9422(92)80026-b
- Dijkstra F.Y., 1976. Submerged cultures of mushrooms as sources of protein and flavor compounds. Doctoral Thesis. Drunkkerij J. H. Pasmans's-Gravenhage, Delft, pp99-105
- Dimou, D. M., Georgala, A., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2002). Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus spp.* and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106(8), 925-929. doi:10.1017/s0953756202006184
- Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., Dewitt, D. L., & Nair, M. G. (2008). Health- beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Food Chemistry*, 108(1), 97-102. doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.049
- Donoghue, J. D., & Denison, W. C. (1995). Shiitake Cultivation: Gas phase during incubation influences productivity. *Mycologia*, 87(2), 239. doi:10.2307/3760909
- Dyal, S. D., & Narine, S. S. (2005). Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International*, 38(4), 445-467. doi:10.1016/j.foodres.2004.11.002
- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M., & Marabottini, R. (2004). *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: Impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 54(7), 887-894. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.010
- Erwin, J. (1973). Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*, 41-143. doi:10.1016/b978-0-12-242050-4.50008-2
- Fang, Q., & Zhong, J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10(1), 61-65. doi:10.1016/s1369-703x(01)00158-9
- Feng, Y., Li, W., Wu, X., Cheng, J., & Ma, S. (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 104-112. doi:10.1016/j.bej.2009.12.002
- Feofilova, E. P., Gornova, I. B., Memorskaya, A. S., & Garibova, L. V. (1998). Lipid composition of fruiting bodies and submerged mycelium from *Lentinus edodes*. *Mikrobiologiya*, 67, 655-659.
- Fernandes, M. B., Habu, S., Lima, M. A., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2010). Influence of drying methods over in vitro antitumoral effects of exopolysaccharides produced by *Agaricus blazei* LPB 03 on submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(3), 253-261. doi:10.1007/s00449-010-0467-x
- Fiestas Ros De Ursinos, J. A., & Padilla, R. B. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas Y Aceites*, 43(2), 101-106. doi:10.3989/gya.1992.v43.i2.1182

- Fountoulakis, M., Dokianakis, S., Kornaros, M., Aggelis, G., & Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *WaterResearch*, 36(19), 4735-4744. doi:10.1016/s0043-1354(02)00184-7
- Furue, H., & Kitoh, I. (1981). Phase 111-study on Lentinan. *Japanese Journal of Cancer Chemotherapy*, 8, 944-960.
- Galanakis, C. M. (2017). *Olive mill waste: Recent advances for sustainable management*. London: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Galiotou-Panayotou, M., Kapantai, M., & Kalantzi, O. (1997). Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4), 425-429. doi:10.1007/s002530050951
- Georgacakis, D., & Dalis, D. (1993). Controlled anaerobic digestion of settled olive-oil wastewater. *Bioresource Technology*, 46(3), 221-226. doi:10.1016/0960-8524(93)90124-t
- Gern, R. M., Wisbeck, E., Rampinelli, J. R., Ninow, J. L., & Furlan, S. A. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, 99(1), 76-82. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.059
- Gilbert, C. (1985). Carnitine acetyltransferase activity in oleaginous yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 27(3), 273-275. doi:10.1016/0378-1097(85)90066-7
- Ginterova, A. (1973). Nitrogen fixation by higher fungi. *Biologia (Bratislava)*, 28, 199-202.
- Giuliani, A., Cerretani, L., & Citchelli, A. (2001). Chlopophyllis in olive and in olive oil: Chemistry and occurrences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 36-42.
- Hamdi, M. (1991). Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mil. *Bioresource Technology*, 36(2), 173-178. doi:10.1016/0960-8524(91)90176-k
- Han, Y., Yeng, W., Chen, L., & Chang, S. (1981). Physiology and ecology of *Lentinula edodes*. (*Berk.*). *Mushroom Science*, 11, 623-658.
- Hassegawa, R. H., Kasuya, M. C., & Vanetti, M. C. (2005). Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with gricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(2), 212-217. doi:10.2225/vol8-issue2-fulltext-3
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y., & Shimizu, S. (2002). Production of Arachidonic Acid by *Mortierella* Fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 252-262.
- Hiroi, M., & Tsuyuki, H. (1988). Comparison of fatty acid composition in fruit body and spore of mushrooms. *Bulletin of College of Agriculture and Veterinary and Medicine*, 45, 104-109.
- Hong, J. S., Kim, Y. H., Lee, K. R., Kim, M. K., Cho, C. I., & Part, K. K. (1988). Composition of organic abd fatty acid in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus*. *Orean Journal of Food Science and Technology*, 20(1), 100-105.
- Horrobin, D. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research*, 31(2), 163-194. doi:10.1016/0163-7827(92)90008-7
- Iizuka C. & Takeuchi M., 1978. Method of artificial growing edible fungi U.S. Patent #4, 071, 973
- Ikekawa, T. (1995). Enokitake, *Flammulina velutipes*: Host-mediated antitumor polysaccharides. *Food Reviews International*, 11(1), 203-206. doi:10.1080/87559129509541033
- Israilides, C., Kletsas, D., Arapoglou, D., Philippoussis, A., Pratsinis, H., Ebringerová, A., Harding, S. (2008). In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*, 15(6-7), 512-519. doi:10.1016/j.phymed.2007.11.029
- Janardhanan, K. K., Kaul, T. N., & Husain, A. (1970). Use of vegetable wastes for the production of fungal protein from *Morchella* species. *Journal of Food Science Technology*, 7, 197.
- Kalač, P. (2016). *Edible Mushrooms: Chemical Composition and Nutritional Value*. Academic Press.
- Kim, S. S., Lee, J. S., Cho, J. Y., Kim, Y. E., & Hong, E. K. (2010). Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* liquid culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 351-355. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.10.010
- Kimura, Y., Tojima, H., Fukase, S., & Takeda, K. (1994). Clinical evaluation of sizofilan as assistant immunotherapy in treatment of head and neck cancer. *Acta Oto-Laryngologica*, 114(Sup511), 192-195. doi:10.3109/00016489409128330

- Kitzberger, C. S., Lomonaco, R. H., Michielin, E. M., Danielski, L., Correia, J., & Ferreira, S. R. (2009). Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 35-43. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.05.034
- Komura, D. L., Ruthes, A. C., Carbonero, E. R., Alquini, G., Rosa, M. C., Sasaki, G. L., & Iacomini, M. (2010). The origin of mannans found in submerged culture of basidiomycetes. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1052-1056. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.042
- Lakhtar, H., Ismaili-Alaoui, M., Philippoussis, A., Perraud-Gaime, I., & Roussos, S. (2010). Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(3), 167-172. doi:10.1016/j.ibiod.2009.10.006
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., & Yun, J. W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5), 369-376. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.015
- Litchfield, J. H. (1968). The production of fungi. *Single Cell Protein*, 309.
- Litchfield, J. H., Overbeck, R. C., & Davidson, R. S. (1963). Mushroom Culture, factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11(2), 158-162. doi:10.1021/jf60126a018
- Litchfield, J. H., & Overbeck, R. C. (1965). Submerged culture growth of *Morchella* species in food processing waste substances. *Food Science and Technology*, 511-520.
- Litchfield, J. H. (1977). Single cell proteins. *Food Technology*, 31(5), 175-179.
- Lomberg, M. L., Solomko, E. F., Kucherenko, O. V., & Kleschenko, P. H. (2002). Some medicinal mushrooms in submerged culture. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(2-3), 1. doi:10.1615/intjmedmushr.v3.i2-3.930
- Losel, D. M. (1988). Fungal lipids. *Microbial Lipids*, 1, 699-805.
- Lull, C., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, 2005(2), 63-80. doi:10.1155/mi.2005.63
- Maeda, Y. Y., Hamuro, J., & Chihara, G. (1974). The nature of immunopotentiality by the antitumor polysaccharide Lentinan and the significance of biogenic amines in its action. *International Journal of Cancer*, 12, 259-281.
- Manu-Tawiah, W., & Martin, A. (1987). Chemical composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiology*, 4(4), 303-310. doi:10.1016/s0740-0020(87)80004-7
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., & Sannia, G. (1995). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 30(8), 1914-1918. doi:10.1016/0043-1354(95)00330-4
- Mattila, P., Lampi, A., Ronkainen, R., Toivo, J., & Piironen, V. (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76(3), 293-298. doi:10.1016/s0308-8146(01)00275-8
- Maziero, R., Cavazzoni, V., & Bononi, V. L. (1999). Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista De Microbiologia*, 30(1), 77-84. doi:10.1590/s0001-37141999000100015
- Meng, F., Liu, X., Jia, L., Song, Z., Deng, P., & Fan, K. (2010). Optimization for the production of exopolysaccharides from *Morchella esculenta* SO-02 in submerged culture and its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 700-704. doi:10.1016/j.carbpol.2009.09.032
- Miles, P. G., & Zhang, S. (1997). *Mushroom biology: Concise basics and current developments*. Singapore: World scientific.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi:10.1021/ac60147a030

- Miller, M., & Jong, S. (1986). Commercial cultivation of Shiitake in sawdust filled plastic bags. *Cultivating Edible Fungi Developments in Crop Science*, 421-426. doi:10.1016/b978-0-444-42747-2.50049-x
- Miric, O., Lalic, V. Z., & Miletic, D. I. (1985). The composition of some lipid fractions (phospholipids, triglycerides, free fatty acids, sterols) of wild growing edible mushrooms. *Hrana Ishrana (Yugoslavia)*, 26, 123-128.
- Mitrakas, M., Papageorgiou, G., Docoslis, A., & Sakellaropoulos, G. (1996). Evaluation of various pretreatment methods for olive oil mill waste-waters. *Eur. Water Pollut. Control*, 6(6), 10-16.
- Miyazaki, K., Mizutani, H., Katabuchi, H., Fukuma, K., Fujisaka, S., & Okamura, H. (1995). Activated (HLA-DR) T-Lymphocyte subsets in cervical carcinoma and effects of radiotherapy and immunotherapy with sifoziran on cell-mediated immunity and survival. *Gynecologic Oncology*, 56(3), 412-420. doi:10.1006/gyno.1995.1073
- Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11(1), 5-21. doi:10.1080/87559129509541017
- Nair, N. G., Holley, M. P., Song, C. H., & Cho, K. Y. (1990). Lipid metabolism of *Pleurotus sajor caju*. *Annals of Applied Biology*, 116(3), 455-462. doi:10.1111/j.1744-7348.1990.tb06628.x
- Ngai, P. H., Zhao, Z., & Ng, T. (2005). Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26(2), 191-196. doi:10.1016/j.peptides.2004.09.011
- Niaounakis, M. and C.P. Halvadakis 2004. *Olive-Mill Waste Management: Literature review and Patent Survey*. Typothito – George Dardanos Publications, Athens, Greece
- Nieto, L. M., Hoyos, S. G., Rubio, F. C., Pareja, M. G., & Cormenzana, A. R. (1993). The biological purification of waste products from olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 43(3), 215-219. doi:10.1016/0960-8524(93)90033-8
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautová, V., & 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. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.042
- Ouzouni, P. K., Veltsistas, P. G., Paleologos, E. K., & Riganakos, K. A. (2007). Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(6), 480-486. doi:10.1016/j.jfca.2007.02.008
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189-259. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.09.005
- Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., & Aggelis, G. (2011α). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1138-1150. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04961.x
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. (2008). Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 32(1), 60-71. doi:10.1016/j.biombioe.2007.06.007
- Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: A review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(9), 1475-1485. doi:10.1002/jctb.1553
- Parikh, P., McDaniel, M. C., Ashen, D., Miller, J. I., Sorrentino, M., Chan, V., Sperling, L. S. (2005). Diets and cardiovascular disease: An evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 45, 1379-1387.
- Patel, Y., Naraian, R., & Singh, V. (2012). Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3(1), 1-12. doi:10.5829/idosi.wjfpb.2012.3.1.303

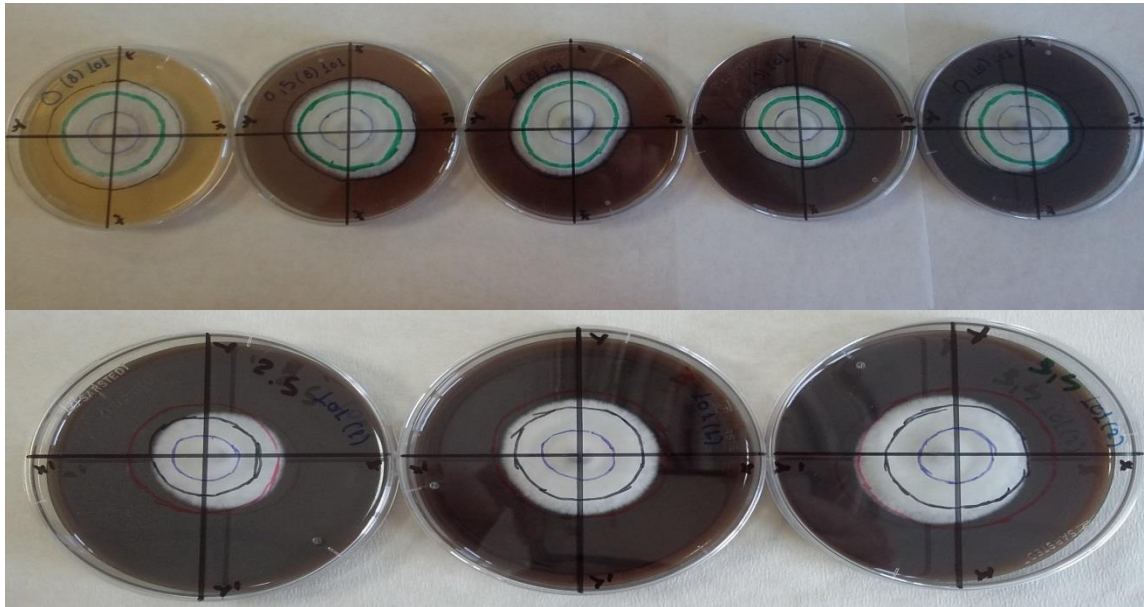
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., & Tweddell, R. J. (2006). Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family *Boletaceae*. *Mycological Research*, *110*(10), 1179-1183. doi:10.1016/j.mycres.2006.05.006
- Pedneault, K., Angers, P., Avis, T. J., Gosselin, A., & Tweddell, R. J. (2007). Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. 'citrino-pileatus' grown at different temperatures. *Mycological Research*, *111*(10), 1228-1234. doi:10.1016/j.mycres.2007.06.014
- Petrakis, C. (2006). Olive Oil Extraction. *Olive Oil*. doi:10.1201/9781439832028.pt3
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., & Zervakis, G. (2002). Monitoring of mycelium growth and fructification of *Lentinula edodes* on several agricultural residues. *Mushroom Biology and Mushroom Products*, 279-287.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., & Zervakis, G. (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *19*(6), 551-557.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., & Israilides, C. (2007). Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *59*(3), 216-219. doi:10.1016/j.ibiod.2006.10.007
- Philippoussis, A. N. (2009). Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, 163-196. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7_9
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*, 235-291. doi:10.1007/978-1-4615-2109-9_9
- Ratledge, C. (1989). Microbial routes to lipids. *Biochemical Society Transactions*, *17*(6), 1139- 1141. doi:10.1042/bst0171139
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transactions*, *30*(5). doi:10.1042/bst030a101
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 1-52. doi:10.1016/s0065-2164(02)51000-5
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, *86*(11), 807-815. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.017
- Ratledge, C., & Wynn, J. (2005). Microbial production of oils and fats. *Food Biotechnology, Second Edition Food Science and Technology*. doi:10.1201/9781420027976.ch1.17
- Reshetnikov, S. V., & Tan, K. K. (2001). Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *3*(4), 34. doi:10.1615/intjmedmushr.v3.i4.80
- Reusser, F., Spencer, F., & Sallans, H. (1958). *Tricholoma nudum* as a source of microbial protein. *Applied Microbiology*, *6*, 5-8.
- Reverberi, M., Mario, F. D., & Tomati, U. (2004). β -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(2), 217-225. doi:10.1007/s00253-004-1662-y
- Royse, D. J., Schisler, L. C., & Diehle, D. A. (1985a). Shiitake mushrooms consumption, production and cultivation. *Interdisciplinary Science Reviews*, *10*(4), 329-335. doi:10.1179/030801885789820544
- Royse, D. J. (1985b). Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the Shiitake mushroom. *Mycologia*, *77*(5), 756. doi:10.2307/3793284
- Royse, D. J., Przybylowicz, P., & Donoghue, J. (1990). Shiitake Growers Handbook. *Mycologia*, *81*(5), 828. doi:10.2307/3759896
- Rozzi, A., & Malpei, F. (1996). Treatment and disposal of olive mill effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *38*(3-4), 135-144. doi:10.1016/s0964-8305(96)00042-x

- S., W. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258-274. doi:10.1007/s00253-002-1076-7
- Sabbah, I., Marsook, T., & Basheer, S. (2004). The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process Biochemistry*, 39(12), 1947-1951. doi:10.1016/j.procbio.2003.09.026
- Salvador, M., Aranda, F., & Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, 73(1), 45-53. doi:10.1016/s0308-8146(00)00276-4
- Schillaci, D., Arizza, V., Gargano, M. L., & Venturella, G. (2013). Antibacterial activity of mediterranean oyster mushrooms, species of genus *Pleurotus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(6), 591-594. doi:10.1615/intjmedmushr.v15.i6.70
- Shannon, L. J., & Stevenson, K. E. (1975). Growth of fungi and bod reduction in selected brewery wastes. *Journal of Food Science*, 40(4), 826-829. doi:10.1111/j.1365-2621.1975.tb00567.x
- Song, C. H., Yiang, J. Y., Vine, J. H., Tattum, B., & Cho, K. Y. (1989). Lipid profile of *Pleurotus sajor caju*. *Annual Appliance of Microbiology*, 114, 167-176.
- Stahl, P. D., & Klug, M. J. (1996). Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4136-4146.
- Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medical mushrooms*. Berkeley: Ten Speed Press.
- Sumner, J. L., & Morgan, E. D. (1969). The Fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature-adapted fungi in the order *Mucorales*. *Journal of General Microbiology*, 59(2), 215-221. doi:10.1099/00221287-59-2-215
- Sumner, J. L. (1973). The fatty acid composition of basidiomycetes. *New Zealand Journal of Botany*, 11(3), 435-442. doi:10.1080/0028825x.1973.10430293
- Suutari, M., Liukkonen, K., & Laakso, S. (1990). Temperature adaptation in yeasts: The role of fatty acids. *Journal of General Microbiology*, 136(8), 1469-1474. doi:10.1099/00221287-136-8-1469
- Suutari, M. (1995). Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology*, 164(3), 212-216. doi:10.1007/s002030050256
- Suutari, M., & Laakso, S. (1994). Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(4), 285-328. doi:10.3109/10408419409113560
- Szuecs, J. (1958). Method of growing mushroom mycelium and the resulting products. *U.S. Patent*, 2, 841-850.
- Taguchi, H., Yoshida, T., Tomita, Y., & Teramoto, S. (1968). The effects of agitation on disruption of the mycelial pellets in stirred fermenters. *Journal of Fermentation Technology*, 46, 814-822.
- Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T., Itoh, T., & Osawa, N. (1985 α). End point results of phase III study of lentinan. *Japanese Journal of Cancer Chemotherapy*, 12, 366-380.
- Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T., Itoh, T., & Osawa, N. (1985 β). End point result of a randomized controlled study of the treatment of gastrointestinal cancer with a combination of lentinan and chemotherapeutic agents. *Excerpta Medica*, 151-165.
- Taguchi, H., Yoshida, T., Tomita, Y., & Teramoto, S. (1968). The effects of agitation on disruption of the mycelial pellets in stirred fermenters. *Journal of Fermentation Technology*, 4, 814-822.
- Tang, Y., & Zhong, J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1-2), 20-28. doi:10.1016/s0141-0229(02)00066-2
- Tokimoto, K., & Komatsu, M. (1978). Biological Nature of *Lentinus edodes*. *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, 445-459. doi:10.1016/b978-0-12-168050-3.50027-x
- Tomati, U., & Galli, E. (1992). The fertilizing value of waste waters from the olive processing industry. *Humus, Its Structure and Role in Agriculture and Environment Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology*, 117-126. doi:10.1016/b978-0-444-88980- 5.50015-x

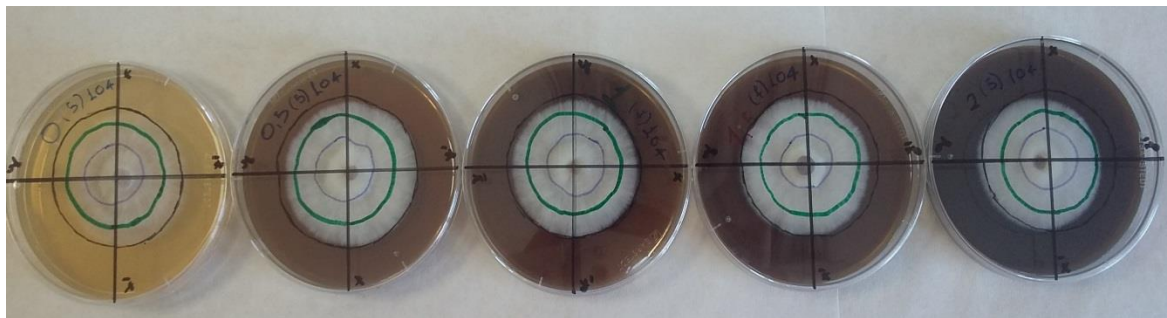
- Tomati, U., Belardinelli, M., Galli, E., Iori, V., Capitani, D., Mannina, L., Segre, A. (2004). NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill waste waters. *Carbohydrate Research*, 339(6), 1129-1134. doi:10.1016/j.carres.2004.02.007
- Tsai, S., Weng, C., Huang, S., Chen, C., & Mau, J. (2006). Nonvolatile taste components of *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *LWT - Food Science and Technology*, 39(10), 1066-1071. doi:10.1016/j.lwt.2005.07.017
- Tsai, S., Tsai, H., & Mau, J. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), 1392-1402. doi:10.1016/j.lwt.2006.10.001
- Tseng, Y., Lee, Y., Li, R., & Mau, J. (2005). Non-volatile flavour components of *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 90(3), 409-415. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.054
- Tsioulpas, A. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, 84(3), 251- 257. doi:10.1016/s0960-8524(02)00043-3
- Volt P. A., 1966. *In vitro* studies on species and mutants of *Agaricus*, *Cantharellus*, *Lepista*, *Pleurotus* and *Volvariella*. Ph.D. thesis, Michigan State University, East Lansing, Discussing Abstract 27(B) pp3004-3005
- Viccini, G., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2003). A model for converting solid state fermentation growth profiles between absolute and relative measurement bases. *Food Technology and Biotechnology*, 41(3), 191-201.
- Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current Perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1), 31-62. doi:10.1615/intjmedmushrooms.v1.i1.30
- Wilson, A. C., & Miller, R. W. (1978). Growth temperature-dependent stearyl coenzyme A desaturase activity of *Fusarium oxysporum* microsomes. *Canadian Journal of Biochemistry*, 56(12), 1109-1114. doi:10.1139/o78-174
- Wolff, R. L., Laviaille, O., Pédrone, F., Pasquier, E., Destailats, F., Marpeau, A. M., Aitzetmüller, K. (2002). Abietoid seed fatty acid composition—A review of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and preliminary inferences on the taxonomy of *Pinaceae*. *Lipids*, 37(1), 17-26. doi:10.1007/s11745-002-0859-5
- Wynn, J. P., Hamid, A. A., Midgley, M., & Ratledge, C. (1998). Widespread occurrence of ATP: Citrate lyase and carnitine acetyltransferase in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 145-147.
- Xu, H., Sun, L., Shi, Y., Wu, Y., Zhang, B., & Zhao, D. (2008). Optimization of cultivation conditions for extracellular polysaccharide and mycelium biomass by *Morchella esculenta* As51620. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 66-73. doi:10.1016/j.bej.2007.08.013
- Xu, P., Ding, Z., Qian, Z., Zhao, C., & Zhang, K. (2008). Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), 325-331. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.10.016
- Yang, J., Lin, H., & Mau, J. (2001). Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 72(4), 465-471. doi:10.1016/s0308-8146(00)00262-4
- Yang, L., & Zhang, L. (2009). ChemInform abstract: chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *ChemInform*, 40(33). doi:10.1002/chin.200933258
- Yilmaz, N., Solmaz, M., Türkekul, I., & Elmastaş, M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*, 99(1), 168-174. doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.017
- Zadrasil, F. (1993). Cultivation of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on lingo-cellulose containing wastes. *Mushroom Information*, 9-31.
- Zadrazil, F. (1975). Influence of CO₂ concentration on the mycelium growth of three *pleurotus* species. *European Journal of Applied Microbiology*, 1(4), 327-335. doi:10.1007/bf01382692

- Zadražil, F. (1978). Cultivation of *Pleurotus*. *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, 521-557. doi:10.1016/b978-0-12-168050-3.50031-1
- Zerva, A., Zervakis, G. I., Christakopoulos, P., & 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. doi:10.1016/j.jenvman.2016.02.042
- Zhang, J. (2007). A study on the synthetic characteristics of the extracellular polysaccharide (EPS) of *Ganoderma lucidum* cultured in batch fermentation using a kinetic model. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(6), 1065-1071. doi:10.1016/s1872-2075(07)60064-8
- Zhong, J., & Tang, Y. (2004). Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Bio manufacturing Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 25-59. doi:10.1007/b94367
- Zhou, Y., Hong-bo, S., & Chen, D. (2009). Effects of organic nitrogen and carbon sources on mycelial growth and polysaccharides production and their optimization in the submerged culture of *Grifola umbellata*, a Chinese medicinal herb. *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5202-5214.
- Φιλίππουσης Α., (2007). Στοιχεία καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών στην Ελλάδα. ΕΘΙΑΓΕ/ ΙΓΕΜΚ

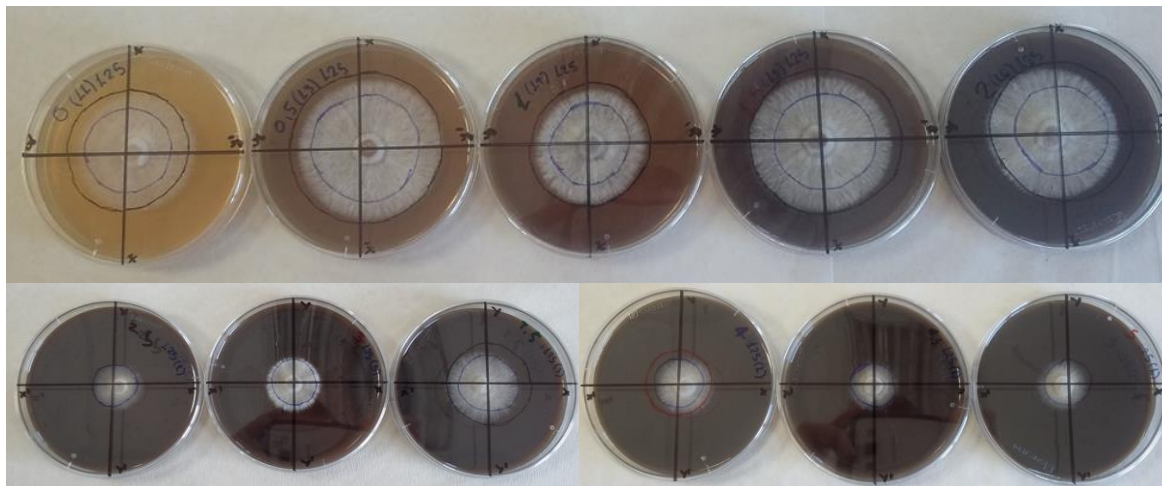
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



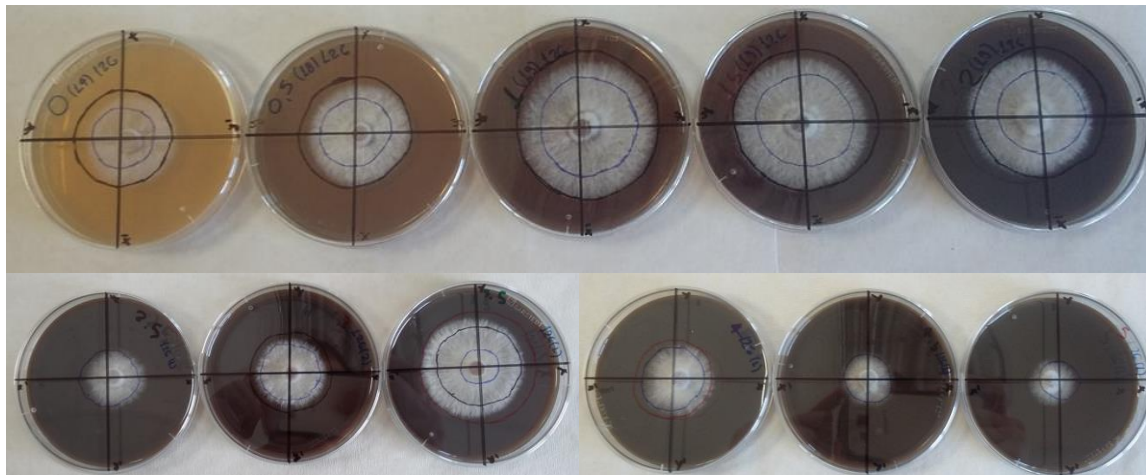
Φωτογραφία 1: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *A. aegerita* AMRL 101 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35% (κάτω), σε τρυβλία petri στους $26 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.



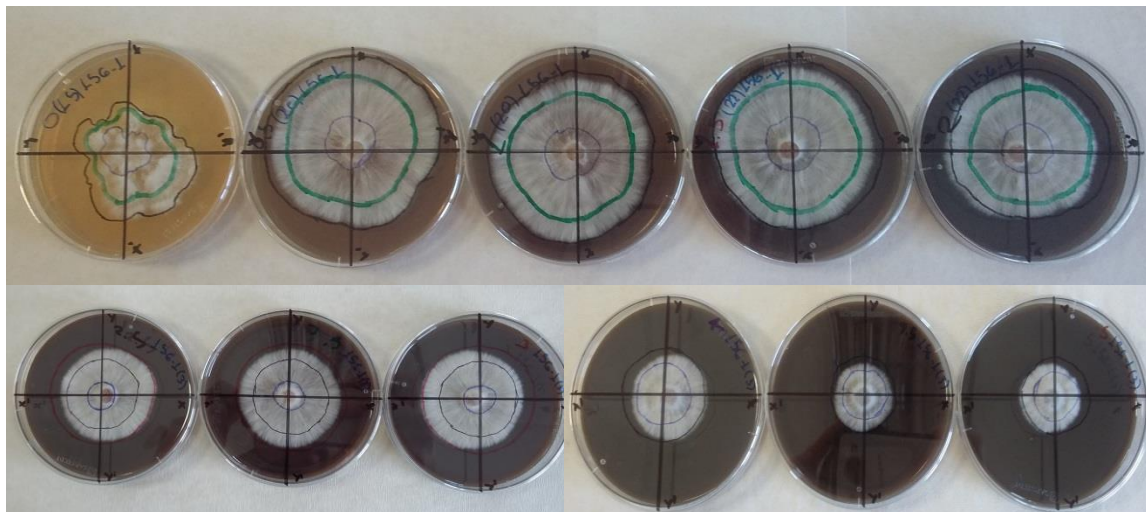
Φωτογραφία 2: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *A. aegerita* AMRL 104 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, σε τρυβλία petri στους $26 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.



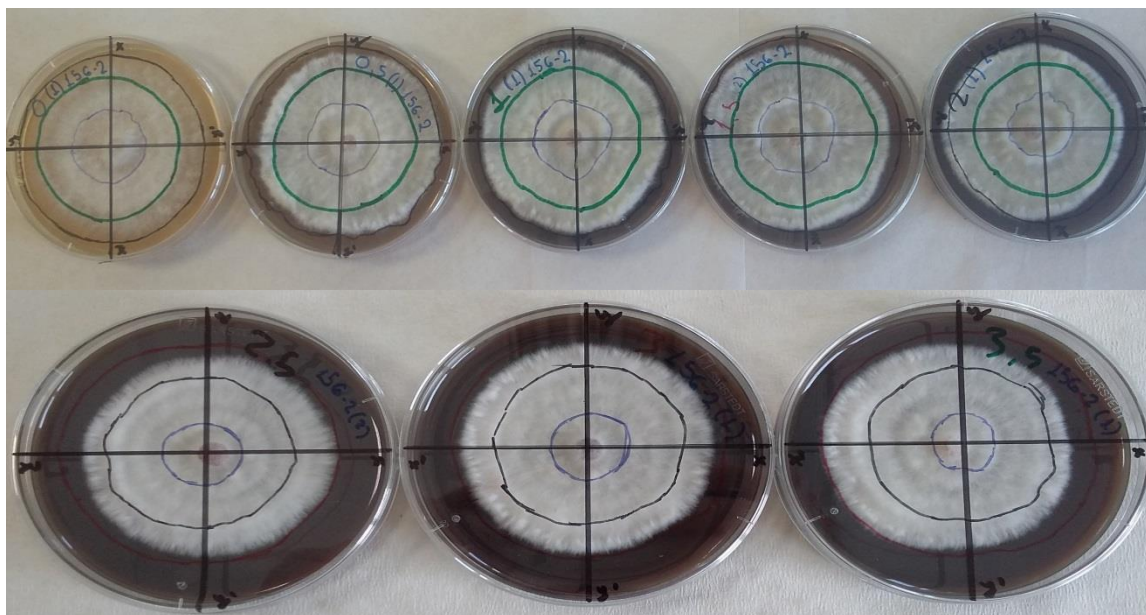
Φωτογραφία 3: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *L. edodes* AMRL 125 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (κάτω), σε τρυβλία petri στους 26 (\pm 1) °C.



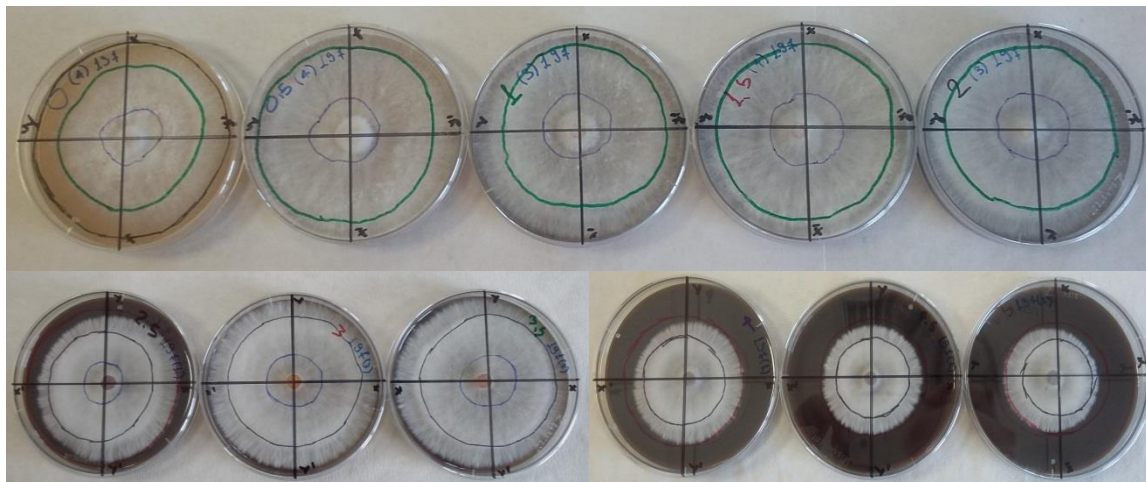
Φωτογραφία 4: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *L. edodes* AMRL 126 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (κάτω), σε τρυβλία petri στους 26 (\pm 1) °C.



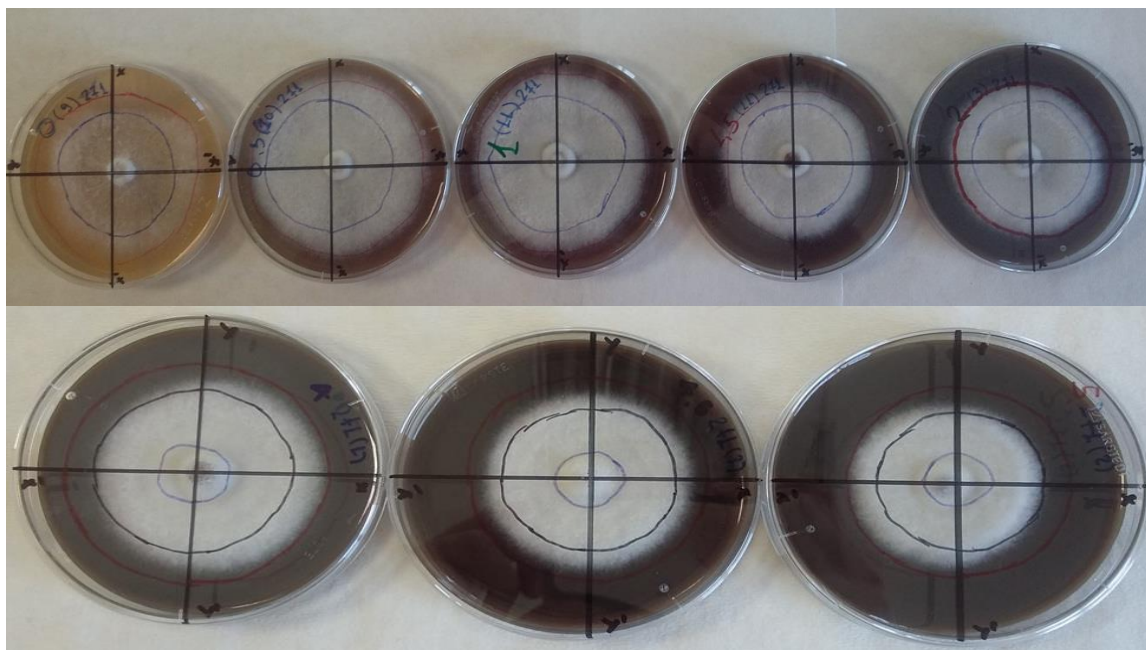
Φοτογραφία 5: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. sapidus* AMRL 156-1 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (κάτω), σε τρυβλία petri στους 26 (± 1) °C.



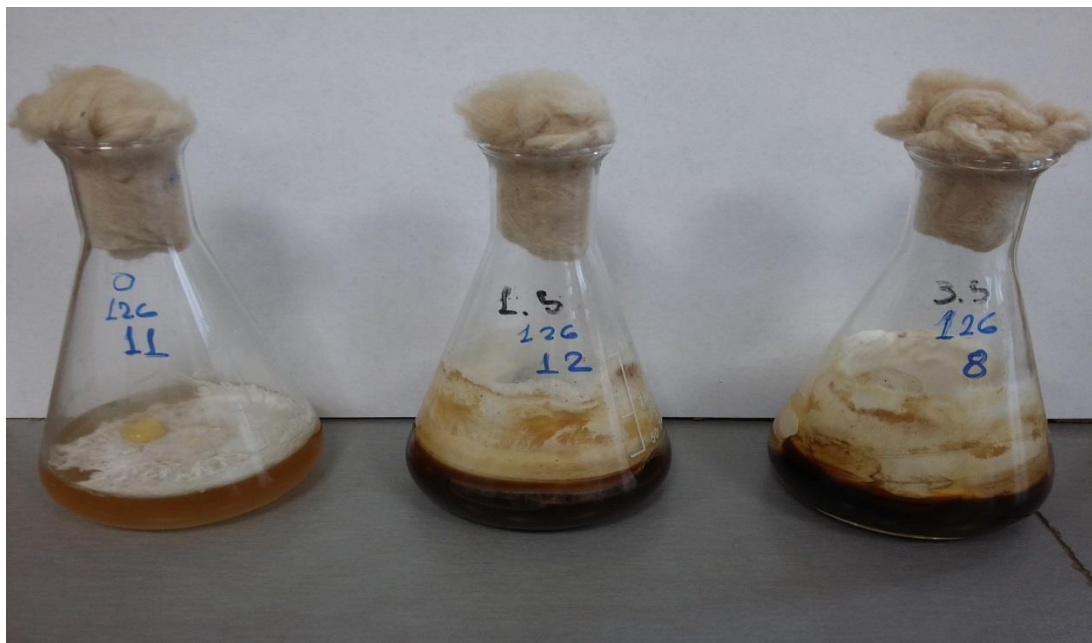
Φοτογραφία 6: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. sapidus* AMRL 156-2 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35% (κάτω), σε τρυβλία petri στους 26 (± 1) °C.



Φωτογραφία 7: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. sajor-caju* AMRL 197 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (κάτω), σε τρυβλία petri στους 26 (± 1) °C.



Φωτογραφία 8: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *F. velutipes* AMRL 271 σε θρεπτικά υποστρώματα με συγκέντρωση ΥΑΕ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% (πάνω) και 25%, 30%, 35% (κάτω), σε τρυβλία petri στους 26 (± 1) °C



Φωτογραφία 9: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *L. edodes* AMRL 126 σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άθρακα τη γλυκόζη, σε συγκεντρώσεις ΥΑΕ 0%, 15%, 35% (από αριστερά προς τα δεξιά), στους 26 (\pm 1) °C



Φωτογραφία 10: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. sapidus* AMRL 156-2 σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άθρακα τη γλυκόζη, σε συγκεντρώσεις ΥΑΕ 0%, 15%, 35% (από αριστερά προς τα δεξιά), στους 26 (\pm 1) °C



Φωτογραφία 11: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. sajor-caju* AMRL 197 σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άθρακα τη γλυκόζη, σε συγκεντρώσεις ΥΑΕ 0%, 15%, 35% (από αριστερά προς τα δεξιά), στους 26 (\pm 1) °C



Φωτογραφία 12: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *F. velutipes* AMRL 271 σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άθρακα τη γλυκόζη, σε συγκεντρώσεις ΥΑΕ 0%, 15%, 35% (από αριστερά προς τα δεξιά), στους 26 (\pm 1) °C