



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΜΣ: «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων»

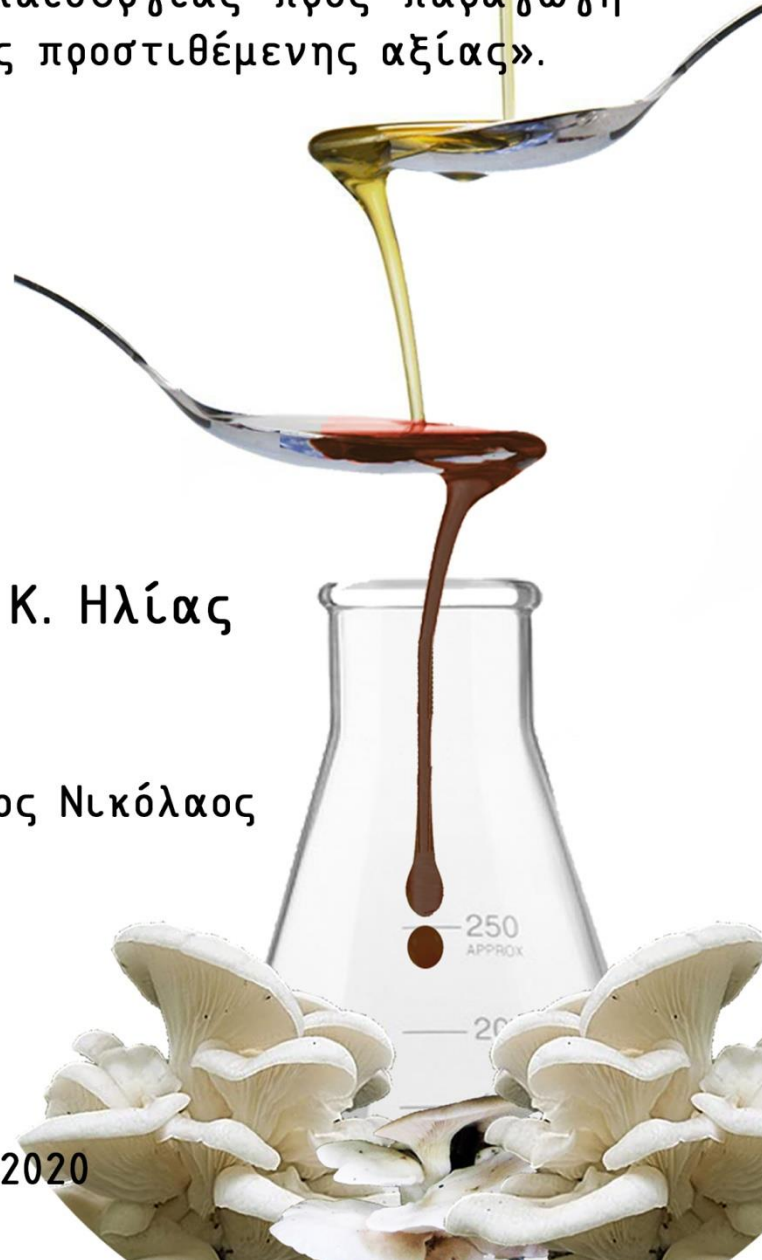
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Βιοτεχνολογική επεξεργασία των εμπλουτισμένων με σάκχαρα υγρών αποβλήτων ελαιουργίας προς παραγωγή μυκηλιακών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας».

Διαμάντης Κ. Ηλίας

Επιβλέπων καθηγητής: Στοφόρος Νικόλαος

ΑΘΗΝΑ 2020





ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΠΜΣ: «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Βιοτεχνολογική επεξεργασία των εμπλουτισμένων με σάκχαρα υγρών αποβλήτων ελαιουργίας προς παραγωγή μυκηλιακών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας».

«Biotechnological treatment of sugar-enriched oil mill waste-water to produce high value-added mycelial products».

Διαμάντης Κ. Ηλίας

Εξεταστική Επιτροπή:

Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Διαμαντοπούλου Παναγιώτα, Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Συνεπιβλέπουσα)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαχείριση των παραπροϊόντων από την ελαιουργία είναι δύσκολη λόγω της ποικιλομορφίας τους και της σύστασης τους. 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 (ενδοπολυσακχαρίτες, αντιοξειδωτικές ουσίες) του εδώδιμου μύκητα *Pleurotus pulmonarius* AMRL 177 όπως και η ικανότητα του μελετώμενου αυτού στελέχους να αποφαινώσει και αποχρωματίσει το ΥΑΕ στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας. Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη του *P. pulmonarius*, σε υγρές καλλιέργειας κλειστού τύπου, σε συνθετικό υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη (40 g/L και 60 g/L) και με συγκεντρώσεις ΥΑΕ 0%, 10%, 20% και 30%, σε μη ανακινούμενες συνθήκες και σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C για 43 ημέρες, όπου μετρήθηκε η παραγωγή μυκηλιακής μάζας και δευτερογενών μεταβολιτών (ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών-IPS, ολικών φαινολικών ενώσεων, αντιοξειδωτικών ουσιών-DPPH), καθώς και ο βαθμός αποφαινώσεως και αποχρωματισμού του περιεχομένου του ΥΑΕ στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα, το pH και η αγωγιμότητα. Σε ό,τι αφορά την παραγωγή βιομάζας, υψηλές συγκεντρώσεις καταγράφηκαν σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα (μάρτυρας, υποστρώματα με 10%, 20% και 30% ΥΑΕ), παρόλη την μεγάλη τοξικότητα του περιεχομένου ΥΑΕ. Από τις ζυμώσεις του στελέχους *P. pulmonarius*, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 32,76 g/L και παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα με 60 g/L γλυκόζη 30% v/v ΥΑΕ. Επίσης σε όλα τα μελετώμενα θρεπτικά μέσα η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών τόσο ως απόλυτη (g/L) όσο και ως σχετική τιμή (% w/w) ήταν υψηλή. Η μέγιστη τιμή του IPS ήταν 4,38 g/L για στο θρεπτικό μέσο με συγκέντρωση γλυκόζης 60 g/L και 20 % v/v ΥΑΕ, ενώ η μέγιστη % w/w ήταν ~ 20%. Στα υποστρώματα με αρχική συγκέντρωση 40 g/L γλυκόζης παρουσιάστηκε μείωση του IPS (g/L) μετά την 37^η ημέρα, σε αντίθεση με τα υποστρώματα αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L γλυκόζης όπου οι IPS (g/L) αυξήθηκαν μέχρι και το τέλος της ζύμωσης, ανεξαρτήτου της συγκέντρωσης ΥΑΕ σε αυτά. Επιπλέον, σχετικά με τα ολικά φαινολικά συστατικά της βιομάζας και την αντιοξειδωτική ικανότητα-DPPH, οι μέγιστες τιμές εμφανίστηκαν την 37^η ημέρα για όλα τα υποστρώματα και κυμάνθηκαν στα 27- 36 mg/L. Τέλος, όσον αφορά στο βαθμό αποφαινώσεως και

αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ, όλα τα μελετώμενα θρεπτικά μέσα, εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αποφαινόλωσης, τα οποία κυμαίνονταν μεταξύ 94,68% και 95,12% για στο θρεπτικό μέσο με 10% ΥΑΕ, 93,08% και 93,41% για στο θρεπτικό μέσο με 20% ΥΑΕ και 92,56% και 93,08% για στο θρεπτικό μέσο με 30% ΥΑΕ. Επίσης, σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα της καλλιέργειας παρουσιάστηκαν υψηλά ποσοστά αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ, με τιμές οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 59,79% και 71,40% στο θρεπτικό μέσο με 10% ΥΑΕ, 65,41% και 66,15% στο θρεπτικό μέσο με 10% ΥΑΕ και 85,07% και 85,56% στο θρεπτικό μέσο με 30% ΥΑΕ. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων (~95%) παρουσιάστηκε στο θρεπτικό υποστρώματα με 10% ΥΑΕ, ενώ το μέγιστο ποσοστό αποχρωματισμού (~85%) στο θρεπτικό υπόστρωμα με 30% ΥΑΕ. Συμπερασματικά, ο μελετώμενος εδώδιμος μύκητας *P. pulmonarius* μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην βιολογική επεξεργασία των ΥΑΕ με σκοπό την μείωση του ρυπαντικού τους φορτίου και ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας (βιομάζα, πολυσακχαρίτες, φαινολικές και αντιοξειδωτικές ουσίες).

Λέξεις κλειδιά: *Pleurotus pulmonarius*, υγρά απόβλητα ελαιουργείου, αποφαινόλωση, ενδοπολυσακχαρίτες

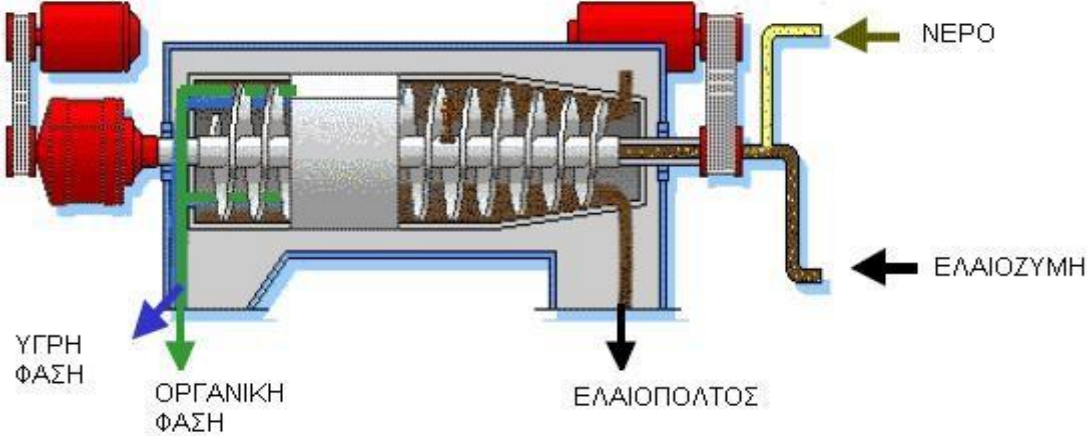
ABSTRACT

The by-products of olive cultivation and olive oil production are difficult to manage because of their diversity and their constitution. 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 mycelial growth and production of secondary metabolites (intracellular polysaccharides, antioxidant compounds) of the edible mushroom *P. pulmonarius*, as well as the ability of the examined strain to detoxify (phenolic content reduction and decolorization) the OMW contained in the nutrient substrate of the culture. The kinetic study of the selected strain *P. pulmonarius* AMRL 177 in batch- liquid state fermentation culture, in a synthetic substrate with glucose (40 g/L and 60g/L) being the main carbon source and with OMW concentrations of 0%, 10%, 20% and 30%, in non-shaking flask cultures and at a temperature of 26 ± 1 °C was conducted for 43 Ημέρες. In addition, the physiological parameters of fungal growth were evaluated and the production of mycelial mass and secondary metabolites (intracellular polysaccharides-IPS, total phenolic compound-TPC, antioxidant components-DPPH), as well as the degree of phenolic content reduction and decolorization of OMW, pH and conductivity also measured. In terms of biomass production, all the different substrates examined presented high biomass concentration, in all the (control, substrates with 10%,20% and 30% OMW), despite the high toxicity of the OMW contained in the culture substrate. Specifically, the highest biomass was collected from the substrate in the nutritive substrate with 60 g/L glucose and 30% OMW concentration, reaching 32.76 g/L. Specifically, all the examined substrates presented production of intra-polysaccharides, both as quantities in g/L, as well as concentration % of dry biomass weight. The highest production of g/L intra-polysaccharides 4.38 g/L was presented in the substrate containing 60 g/L glucose and 20% OMW, while the highest % w/w was ~ 20%. Substrates with concentration of 40 g/L glucose presented a decrease in IPS (g/L) after day 37, in contrast to substrates with concentration of 60 g/L glucose IPS (g/L) that increased until the end of fermentation, regardless of the concentration of OMW. Furthermore, as about the total phenolic compounds peak values appeared on day 37 and for antioxidant components-DPPH a similar value for all substrates ranging from 27 to 36 mg/L. Lastly, in regard to the phenolic content reduction and the discoloration of the content of OMW on the nutritive substrates, all the examined

substrates, presented high phenol reduction values, ranging between 94.68% and 95.12% for the substrate containing 10% OMW, ranging between 93.08% and 93.41% and between 92.56% and 93.08% for the substrate containing 30% OMW. Furthermore, all the substrates presented also high decolorization values of the OMW contained in the nutrient substrate of the culture, with values ranging between 59.79% and 71.40% for the substrate containing 10% OMW, ranging between 65.41% and 66.15% for the substrate containing 20% OMW and between 85.07% and 85.56% for the substrate containing 30% OMW. Specifically, the substrate that who achieved the greatest reduction in the concentration of phenolic compounds, with ~95% reduction on the nutritive substrates with 10% of OMW concentration. The substrate who exhibited the highest rate of discoloration (~85%) on the nutritive substrate with 30% OMW concentration, while on the one with 20% OMW concentration the maximum discoloration ~66%. In conclusion, the examined mushroom wild species could be used with great success as a mean of biological treatment of OMW with simultaneous production of high nutrition value products (biomass, polysaccharides, phenolic compounds and antioxidants).

Keywords: *Pleurotus pulmonarius*, olive mill wastewater, intracellular polysaccharides, phenolic content reduction

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 3 |
| ABSTRACT | 5 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 15 |
| 1.1 Ελιά και ελαιόλαδο..... | 15 |
| 1.1.1 Γενικά..... | 15 |
| 1.1.2. Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς | 16 |
| 1.1.3. Το ελαιόδεντρο..... | 17 |
| 1.2. Παραγωγή ελαιολάδου..... | 19 |
| 1.2.1 Ελαιοτριβείο-Γενική περιγραφή..... | 19 |
| 1.2.2. Παραγωγική διαδικασία | 20 |
| 1.2.2 Α Παραδοσιακή μέθοδος..... | 21 |
| 1.2.2 Β Φυγοκεντρικό σύστημα 3 φάσεων..... | 22 |
|  | 22 |
| 1.2.2 Γ Φυγοκεντρικό σύστημα 2 φάσεων | 22 |
| 1.3 Απόβλητα ελαιοτριβείου | 24 |
| 1.3.1 Στερεά απόβλητα..... | 24 |
| 1.3.2 Υγρά απόβλητα | 25 |
| 1.4. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων | 29 |
| 1.4.1. Τρόποι επεξεργασίας και διάθεσης των αποβλήτων ελαιοτριβείων..... | 31 |
| 1.5. Ορισμός και Μορφολογία | 36 |
| 1.5.1. Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων | 39 |
| 1.5.2. <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 41 |
| 1.5.3. Διατροφικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών..... | 42 |
| 1.5.4. Φαρμακευτικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών..... | 44 |
| 1.5.5. Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και χρήσιμων μεταβολιτών μακρομυκήτων σε υγρές ζυμώσεις..... | 46 |

| | |
|---|-----|
| 1.5.6. Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών μακρομυκλήτων..... | 50 |
| 1.5.7. Αντιοξειδωτικές ουσίες μακρομυκλήτων..... | 57 |
| 1.5.8. Φαινολικά συστατικά | 58 |
| 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ | 59 |
| 2.1. Βιολογικό Υλικό..... | 59 |
| 2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστήκα υγρού απόβλητου ελαιουργίας (ΥΑΕ)..... | 60 |
| 2.3 Πειράματα ζυμώσεων βυθού σε φιάλες | 60 |
| 2.4 Χημικές αναλύσεις | 62 |
| 2.4.1 Συλλογή βιομάζας | 62 |
| 2.4.2 Προσδιορισμός pH | 62 |
| 2.4.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων | 63 |
| 2.4.4 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων | 64 |
| 2.4.5 Αποχρωματισμός..... | 65 |
| 2.4.6 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων | 66 |
| 2.4.7. Προσδιορισμός ολικού αζώτου | 67 |
| 2.4.8. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών..... | 68 |
| 2.4.9. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH..... | 68 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 70 |
| 3.1 Κινητική παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης..... | 70 |
| 3.2. Κατανάλωση φαινολικών και αποχρωματισμός στο θρεπτικό μέσο όπου είχε γίνει προσθήκη ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας | 76 |
| 3.3. Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS)..... | 81 |
| 3.4. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων | 86 |
| 3.5. Παραγωγή ολικών φαινολικών ενώσεων στην βιομάζα και προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας | 87 |
| 3.6. Αγωγιμότητα και pH | 89 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 91 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 96 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 98 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ..... | 108 |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|--|-----|
| Εικόνα 1: Περιοχές που παράγουν ελαιόλαδο στην λεκάνη της Μεσογείου. Σκιασμένες περιοχές: υψηλή παραγωγικότητα, διάστικτες περιοχές: χαμηλή παραγωγικότητα (Niaounakis et al., 2006)..... | 15 |
| Εικόνα 2: Μέση παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου για την περίοδο 1990/1991-2011/2012 (www.internationaloliveoil.org)..... | 16 |
| Εικόνα 3: Η Ελιά..... | 16 |
| Εικόνα 4: Περιγραφή της Ελιάς..... | 17 |
| Εικόνα 5: Επιμέρους τμήματα ελαιοκάρπου..... | 18 |
| Εικόνα 6: Τριφασικό Φυγοκεντρικό Σύστημα Ελαιοτριβείου..... | 22 |
| Εικόνα 7: Διφασικό Φυγοκεντρικό Σύστημα Ελαιοτριβείου..... | 23 |
| Εικόνα 8: Στάδια Παραγωγής Ελαιολάδου..... | 24 |
| Εικόνα 9: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στα απόβλητα ελαιοτριβείων (Knurr et al., 1996)..... | 30 |
| Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός μακρομύκητα..... | 36 |
| Εικόνα 11: Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων (Delmas, 1989)..... | 40 |
| Εικόνα 12: Καρποφορία του μανιταριού <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 41 |
| Εικόνα 13: Ανάπτυξη του μακρομύκητα <i>P. pulmonarius</i> σε τρυβλία Petri 90mm με PDA. 109 | |
| Εικόνα 14: Ανάπτυξη του μακρομύκητα <i>P. pulmonarius</i> σε τρυβλία Petri 90mm με PDA. 110 | |
| Εικόνα 15: Τα 8 διαφορετικά διαλύματα γλυκόζης, τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού οξέος και τα διαλύματα της πηγής αζώτου, μακροστοιχείων, ιχνοστοιχείων..... | 111 |
| Εικόνα 16: Ανάπτυξη του μακρομύκητα <i>P. pulmonarius</i> σε μη αναδεδυόμενες στατικές καλλιέργειες στα 8 διαφορετικά θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη..... | 112 |
| Εικόνα 17: Ανάπτυξη του μακρομύκητα <i>P. pulmonarius</i> σε μη αναδεδυόμενες στατικές καλλιέργειες. Αριστερά είναι οι μάρτυρες 40 g/L και 60 g/L γλυκόζη και δεξιά έχει γίνει προσθήκη ΥΑΕ 10% v/v..... | 113 |
| Εικόνα 18: Ανάπτυξη του μακρομύκητα <i>P. pulmonarius</i> σε μη αναδεδυόμενες στατικές καλλιέργειες. Αριστερά είναι οι μάρτυρες 40 g/L και 60 g/L γλυκόζη και δεξιά έχει γίνει προσθήκη ΥΑΕ 20% v/v..... | 113 |
| Εικόνα 19: Ανάπτυξη του μακρομύκητα <i>P. pulmonarius</i> σε μη αναδεδυόμενες στατικές καλλιέργειες. Αριστερά είναι οι μάρτυρες 40 g/L και 60 g/L γλυκόζη και δεξιά έχει γίνει προσθήκη ΥΑΕ 30% v/v..... | 114 |
| Εικόνα 20: Επώαση της καλλιέργειας σε θάλαμο θερμοκρασίας 26 (±1) °C..... | 115 |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1: Σύσταση επιμέρους τμημάτων του καρπού (Azbar et al., 2004) | 18 |
| Πίνακας 2: Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων (Sierra et al., 2001).... | 25 |
| Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά αποβλήτων κλασσικών και τριφασικών ελαιοτριβείων (Kapellakis et al., 2008)..... | 27 |
| Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά διφασικού αποβλήτου (Caryuela et al., 2006)..... | 28 |
| Πίνακας 5: Παράμετροι ανάπτυξης του μύκητα <i>P. pulmonarius</i> . (Stamets. 1993)..... | 42 |
| Πίνακας 6: Φαρμακευτικές Δράσεις Βασιδιομυκήτων (Wasser and Wess, 1999)..... | 46 |
| Πίνακας 7: Χημικές δομές πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από διάφορα μανιτάρια (Zhang κ.α., 2007) | 51 |
| Πίνακας 8: Δραστικοί αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από φαρμακευτικά μανιτάρια Βασιδιομυκήτων (Wasser and Weis, 1999)..... | 54 |
| Πίνακας 9: Χημικές δομές και δράσεις μερικών πολυσακχαριτών απομονωθέντων από φυσικές πηγές (Yang and Zhang, 2009)..... | 55 |
| Πίνακας 10: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υγρού απόβλητου ελαιουργίας που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα..... | 60 |
| Πίνακας 11: Η σύσταση των οχτώ διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L εμπορικής γλυκόζης και Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργίας (ΥΑΕ; 0, 10, 20, 30 % v/v)..... | 62 |
| Πίνακας 12: Σχεδιασμός πειραμάτων και παρουσίαση της σύστασης των θρεπτικών μέσων με τις συγκεντρώσεις γλυκόζης 40 g/L και 60 g/L και φαινολικών ουσιών 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L και 3 g/L (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)..... | 70 |
| Πίνακας 13: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης και συντελεστή απόδοσης του <i>P. pulmonarius</i> σε στατικές καλλιέργειες με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 40 και 60 g/L μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30%) για 43 ημέρες στους 26 (±1) °C. .. | 71 |
| Πίνακας 14: Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (g/L; %, w/w) του στελέχους <i>P. pulmonarius</i> AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)..... | 82 |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Κινητική Παραγωγής Βιομάζας (g/L) συναρτήσει του χρόνου του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0,10,20,30 % v/v φαινολικά συστατικά (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)..... 73

Διάγραμμα 2: Παραγωγή Βιομάζας g/L συναρτήσει του χρόνου του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0,10,20,30 % v/v φαινολικά συστατικά (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)..... 74

Διάγραμμα 3: Κινητική Κατανάλωσης γλυκόζης (g/L) συναρτήσει του χρόνου του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0,10,20,30 % v/v φαινολικά συστατικά (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά). 75

Διάγραμμα 4: Ποσοστό Κατανάλωσης (%) γλυκόζης στο τέλος της ζύμωσης του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0, 10, 20, 30 % v/v φαινολικά συστατικά (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά). 75

Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση Ολικών φαινολικών (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη). 77

Διάγραμμα 6: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L (ΥΠ1Β) και 60 g/L (ΥΠ2Β) και προσθήκη ΥΑΕ (10% v/v)..... 78

Διάγραμμα 7: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L (ΥΠ1Γ) και 60 g/L (ΥΠ2Γ) και προσθήκη ΥΑΕ (20% v/v)..... 78

Διάγραμμα 8: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L (ΥΠ1Δ) και 60 g/L (ΥΠ2Δ) και προσθήκη ΥΑΕ (30% v/v)..... 78

Διάγραμμα 9: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή

άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)..... 79

Διάγραμμα 10: Ποσοστό Αποφαινώσεως υποστρωμάτων σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (10, 20, 30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά). 80

Διάγραμμα 11: Ποσοστό Αποχρωματισμού (%) υποστρωμάτων σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0,10,20,30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)..... 81

Διάγραμμα 12: Η Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (g/L) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 40 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά). 83

Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (g/L) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά). 83

Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (% w/w) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0,10,20,30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά 85

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το τέλος της μεταπτυχιακής μου διατριβής σηματοδοτείται το τέλος μιας πορείας δυο ετών όντας μεταπτυχιακός φοιτητής του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Φθάνοντας στο τέλος της μεταπτυχιακής μου φοίτησης θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένα πρόσωπα που με τη βοήθεια τους συντέλεσαν στην περάτωση των σπουδών μου στην διερεύνηση των γνώσεων και των οριζόντων μου.

Αρχικά, η παρούσα μελέτη δε θα ολοκληρωνόταν χωρίς την αμέριστη και καθοριστική παρουσία της Δρ Παναγιώτας Διαμαντοπούλου, Κύριας Ερευνήτριας ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, η οποία ήταν παρών όποτε και να την χρειάστηκα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης. Την ευχαριστώ θερμά για την υπομονή της και την αντοχή της που με βοήθησαν να φτάσω σήμερα εδώ.

Έπονται των ευχαριστιών μου τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, οι Καθ. Σεραφείμ Παπανικολάου για τη βοήθεια και το ενδιαφέρον του για την πρόοδο μου, και ο Καθ. Νικόλαο Στοφόρο για τη συνεχή στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια τόσο των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων (EEM) του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων/ ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ., που με βοηθούσαν και με στήριζαν καθημερινά σε ότι και αν χρειάστηκα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Γεωπόνο-Επιστήμονα Τροφίμων Ειρήνη Μελανούρη και την μεταδιδάκτορα Χημικό Κατερίνα Φουρτάκα για την αμέριστη συμπαράσταση του και την ουσιαστική βοήθεια του κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της μελέτης αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στην συμφοιτήτρια και φίλη Μαριάννα Δεδούση για τη άριστη συνεργασία την οποία είχαμε, καθώς και στις υπέροχες αναμνήσεις που δημιουργήσαμε στο εργαστήριο το οποίο μας φιλοξένησε.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους μεγαλύτερους αρωγούς μου. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Βικτώρια που πίστεψαν σε έμένα και με στήριζαν με κάθε μέσο που μπορούσαν να διαθέσουν ψυχολογικό, ηθικό και οικονομικό σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σας ευχαριστώ.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελιά και ελαιόλαδο

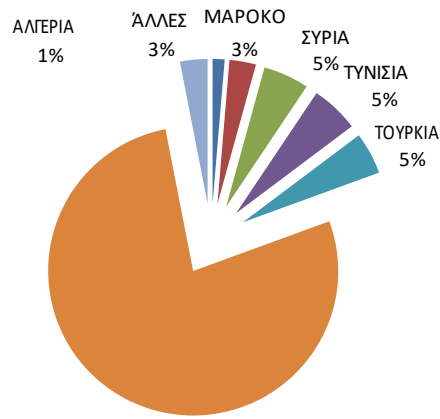
1.1.1 Γενικά

Η παραγωγή ελαιολάδου είναι ένας από τους σημαντικότερους πυλώνες στήριξης της αγροτικής παραγωγής στην Ελλάδα. Η επιτραπέζια ελιά και το ελαιόλαδο παράγεται κυρίως στις χώρες της Ευρώπης, όπου εντοπίζεται η 78% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (περίπου 2.290.000 τόνοι, κατά μέσο όρο 1990/1991-2011/2012) (www.internationaloliveoil.org). Οι χώρες της Μεσογείου έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό καλλιέργειας και παραγωγής ελαιολάδου την Ευρώπη, ενισχύοντας την αγροτική οικονομία, την τοπική κληρονομιά και το περιβάλλον (Niaounakis et al., 2006).



Εικόνα 1: Περιοχές που παράγουν ελαιόλαδο στην λεκάνη της Μεσογείου. Σκιασμένες περιοχές: υψηλή παραγωγικότητα, διάστικτες περιοχές: χαμηλή παραγωγικότητα (Niaounakis et al., 2006).

Η Ελλάδα έχει σημαντική συμβολή στην παγκόσμια ελαιοπαραγωγή, έχοντας την τρίτη θέση παγκοσμίως (390.200 τόνοι κατά μέσο όρο ετησίως, που αντιστοιχεί στο 16,5% της ευρωπαϊκής παραγωγής, 1990/1991 – 2011/2012). Στις πρώτες θέσεις της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου βρίσκονται η Ισπανία (1.188.300 τόνοι κατά μέσο όρο, που αντιστοιχεί στο 54,75% της ευρωπαϊκής παραγωγής, περιόδους 1990/1991 – 2011/2012) και η Ιταλία (571.700 τόνοι κατά μέσο όρο, που αντιστοιχεί στο 26,35% της ευρωπαϊκής παραγωγής, περιόδους 1990/1991 – 2011/2012) (www.internationaloliveoil.org).



Εικόνα 2: Μέση παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου για την περίοδο 1990/1991-2011/2012 (www.internationaloliveoil.org).

1.1.2. Προέλευση και εξάπλωση της ελιάς



Εικόνα 3: Η Ελιά

Το ελαιόδεντρο καλλιεργείται σε περιορισμένη έκταση ανά την υφήλιο, και καταλαμβάνει μόνο τις περιοχές της εύκρατης ζώνης στο νότιο και βόρειο ημισφαίριο. Η καλλιέργεια της ελιάς απαιτεί ιδιαίτερες εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες, ώστε να

αναπτυχθεί, να ανθοφορήσει οπότε και να καρποφορήσει αρκετά, δίνοντας μια αξιόλογη παραγωγή. Το ελαιόδεντρο είναι στενά συνδεδεμένο με το χριστιανικό πολιτισμό και με την ιστορία και τις δοξασίες των μεσογειακών λαών. Η καταγωγή του χάνεται μέσα στους θρύλους και τις παραδόσεις των λαών της Μεσογείου (Θεριός, 2005; Μπαλατσούρας, 1999). Η ελιά είναι γνωστή από τους αρχαίους χρόνους. Η εμφάνιση και η καλλιέργεια της φθάνουν στην προϊστορική εποχή. Μερικοί βοτανικοί θεωρούν ότι η ελιά κατάγεται από τις ανατολικές μεσογειακές περιοχές. Ο Fisher (1904) αναφέρει ότι η ελιά έχει έλθει στις ανατολικές μεσογειακές περιοχές από τη Β.Δ. Ινδία δια μέσου του Ιράν, όπου το γένος *Olea* εκπροσωπείται από έναν αριθμό διαφορετικών ειδών, Αργότερα, επεκτάθηκε προς τις δυτικές μεσογειακές περιοχές. Ο Chevalier (1948) έχει τις ίδιες απόψεις, αλλά δεν υπάρχουν μαρτυρίες για την ύπαρξη της ελιάς στις μεσογειακές περιοχές κατά την νεολιθική εποχή. Ο Π. Αναγνωστόπουλος σε ανακοίνωση του στην Ακαδημία Αθηνών το 1951 υποστηρίζει, βασιζόμενος σε ευρήματα που βρέθηκαν σε ανασκαφές, ότι η πατρίδα

της ελιάς είναι η Κρήτη. Την υπόθεση αυτή ενισχύει το γεγονός ότι το όνομα της είναι ελληνικό. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες η καλλιέργεια της ελιάς άρχισε να επεκτείνεται στη Ν. Αφρική, Χιλή, Αργεντινή, Αυστραλία, Κίνα, Ιαπωνία και αλλού (Ποντίκης, 2000).

1.1.3. Το ελαιόδεντρο

Βοτανική ταξινόμηση

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα *Olea*, *Syringa*, *Forsythia*, *Ligustrum*, *Fraxinus* και *Phillyrea*. Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30 διαφορετικά είδη, που είναι διασπαρμένα στις πέντε ηπείρους. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα εξής (Σαρλής, 1999):

1. *Olea europea*. *L. subsp euromediterranea*
2. *Olea cryhysophylla*
3. *Olea hochstetteri*
4. *Olea somaliensis*
5. *Olea subtrinervata*

Η βοτανική ονομασία της ελιάς είναι *Olea europea sativa*. Είναι δένδρο υπεραιώνιο και αειθαλές και το καλλιεργούμενο είδος κατάγεται από τη Μεσόγειο. Προσαρμόζεται άριστα σε ζεστά, ξηρά και μακράς διάρκειας καλοκαίρια. Ακόμη διαθέτει μεγάλη αντοχή και στις χαμηλές θερμοκρασίες έως και 0 °C. Το ενήλικο δένδρο έχει μεσαίο μέγεθος και κατά περίπτωση μπορεί να φτάσει και τα 10 μέτρα ύψος. Υπάρχουν ακόμη και νάνες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως καλλωπιστικά



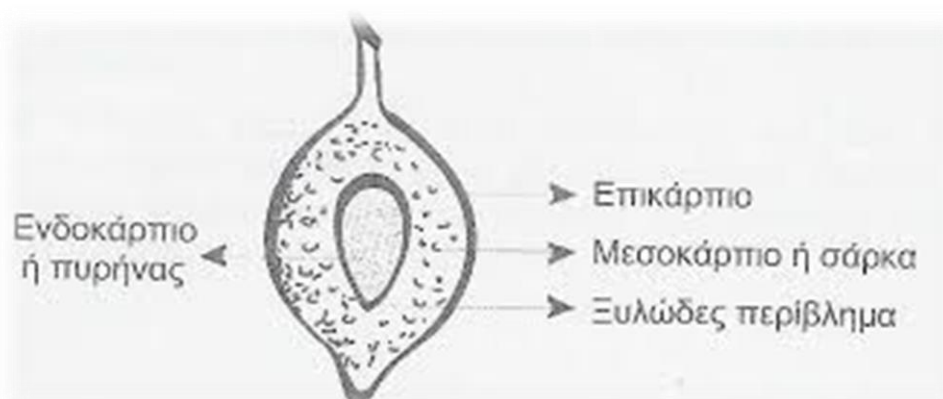
Εικόνα 4: Περιγραφή της Ελιάς

(Θεριός, 2005). Το ελαιόδεντρο μέχρι να φτάσει σε πλήρη παραγωγή απαιτεί 8-10 έτη. Παρόλα αυτά υπάρχουν ποικιλίες που δίνουν ικανοποιητική παραγωγή σε 4-6 χρόνια. Η ανθοφορία της ελιάς είναι το Μάιο και τα άνθη της είναι μικρά σε μέγεθος, έχουν ημίλευκο χρώμα. Τα φύλλα της είναι μικρά με απαλό πράσινο χρώμα, στο πάνω μέρος

πράσινο και ασημί στο κάτω. Η ωρίμανση του καρπού αρχίζει τον Οκτώβρη. Η συγκομιδή αν πρόκειται για την επιτραπέζια ελιά που προορίζεται για πράσινη ελιά τουρσί γίνεται τον Οκτώβρη. Αν πρόκειται να καταναλωθούν σαν αλατισμένες ή μαύρες ή για την παραγωγή του ελαιολάδου, η συλλογή γίνεται τον Δεκέμβρη που ο καρπός έχει αρχίσει να μαυρίζει. Συνοπτικά, στη Λεκάνη της Μεσογείου, η ανθοφορία της ελιάς εντοπίζεται από τον Απρίλιο-Μάιο, ενώ η συγκομιδή γίνεται από τα τέλη Νοεμβρίου μέχρι το Φεβρουάριο στις νότιες περιοχές. Τα μέρη του ελαιοκάρπου είναι το μεσοκάρπιο το κουκούτσι και ο πυρήνας. Το μεγαλύτερο μέρος του καρπού αποτελείται από νερό (50%), υδατάνθρακες (20%) και λιπίδια (30%) (Azbar et al., 2004).

Πίνακας 1: Σύσταση επιμέρους τμημάτων του καρπού (Azbar et al., 2004)

| Συστατικά | Μεσοκάρπιο (%) | Κουκούτσι (%) | Πυρήνας (%) |
|-------------------|----------------|---------------|-------------|
| Νερό | 50 - 60 | 9,3 | 30 |
| Λιπίδια | 15 - 30 | 0,7 | 27,3 |
| Αζωτούχες ενώσεις | 2 - 5 | 3,4 | 10,2 |
| Σάκχαρα | 3 - 7,5 | 41 | 26,6 |
| Κυτταρίνη | 3 - 6 | 38 | 1,9 |
| Μέταλλα | 1 - 2 | 4,1 | 1,5 |
| Πολυφαινόλες | 2 - 2,25 | 0,1 | 0,5 - 1 |
| Άλλα | - | 3,4 | 24 |



Εικόνα 5: Επιμέρους τμήματα ελαιοκάρπου

1.2. Παραγωγή ελαιολάδου

1.2.1 Ελαιοτριβείο-Γενική περιγραφή

Τα σύγχρονα ελαιοτριβεία είναι εξέλιξη των παραδοσιακών ελαιοτριβείων. Είναι μικρού μεγέθους αγροτο-βιομηχανικές εγκαταστάσεις που λειτουργούν εποχιακά και στις οποίες γίνεται η εξαγωγή του ελαιολάδου από τον ελαιοκάρπο. Σήμερα, λειτουργούν τόσο σύγχρονα ελαιοτριβεία όσο και κάποια παραδοσιακά ελαιοτριβεία σε περιορισμένο αριθμό. Από τα αρχαία χρόνια ακόμη υπήρχαν ελαιοτριβεία για την παραγωγή ελαιολάδου. Η σύνθλιψη του καρπού της ελιάς γινόταν με δύο οριζόντιες σε στρογγυλό σχήμα πλάκες. Ο ελαιοκάρπος έμπαινε ανάμεσα τους, έπειτα εργάτες μετακινούσαν μέσω ενός κεντρικού άξονα την υπερκείμενη πλάκα περιστροφικά. Μετέπειτα, η υπερκείμενη οριζόντια πλάκα αντικαταστάθηκε με μια ή περισσότερες μυλόπετρες, οποίες ήταν τοποθετημένες σε ένα μεγάλο και πλατύ δοχείο. Ο ελαιοκάρπος μεταφερόταν σε αυτό το μεγάλο δοχείο και γινόταν πολτός. Η κίνηση του κεντρικού άξονα τους γινόταν είτε με εργάτες είτε με άλογο ή και με μηχανικό κινητήρα. Στη συνέχεια ο ελαιοπολτός έμπαινε σε ειδικά σακιά και μεταφερόταν για επεξεργασία στα ελαιοπιεστήρια. Το λάδι καθαριζόταν σε δεξαμενές ή ακόμα και σε ειδικά δοχεία. Μέχρι σήμερα, τα παραδοσιακά ελαιοτριβεία έχουν αντικατασταθεί σχεδόν αποκλειστικά από σύγχρονες εγκαταστάσεις επεξεργασίας ελαιοκάρπου. Κάθε σύγχρονο ελαιοτριβείο διαθέτει τα ειδικά μηχανήματα κάποιου συστήματος παραγωγής ελαιολάδου (διφασικό – τριφασικό φυγοκεντρικό σύστημα) καθώς και βοηθητικούς και αποθηκευτικούς χώρους (Φακλάρης, 2003). Η ιδιαιτερότητα του ελαιοκάρπου εμφανίζεται μετά την άλεση του, αφού ο διαχωρισμός της υγρής φάσης από τη στερεή είναι παρουσιάζει δυσκολίες. Ο ελαιοκάρπος όταν αλεσθεί ολόκληρος δίνει τη λεγόμενη πάστα ή ελαιοζύμη που έχει δύο χαρακτηριστικά κριτικής σημασίας για το διαχωρισμό του λαδιού:

- Μεγάλη ελαστικότητα, που οφείλεται στα τεμαχίδια της επιδερμίδας του καρπού.
- Τάση να σχηματίζει εύκολα γαλακτώματα φυτικών υγρών-λαδιού με την παρέμβαση ορισμένων συστατικών του καρπού που δρουν ως γαλακτωματοποιητές (Μπαλατσούρας, 1999).

1.2.2. Παραγωγική διαδικασία

Ακόμα και σήμερα υπάρχουν κάποια παραδοσιακά ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν το υδραυλικό πιεστήριο. Η παραγωγή ελαιολάδου στα σύγχρονα ελαιοτριβεία βασίζεται στην φυγόκεντρο δύναμη και γίνεται κυρίως με 2 διαφορετικές διαδικασίες. Τα φυγοκεντρικά συστήματα επεξεργασίας χωρίζονται στα διφασικά και τα τριφασικά αναλόγως με τα τελικά προϊόντα τους. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα τους κυρίως στην ποσότητα των υγρών αποβλήτων και των υπόλοιπων παραπροϊόντων που παράγουν (Sierra et al., 2001). Τα στάδια επεξεργασίας του ελαιόκαρπου σε ένα ελαιοτριβείο είναι τα παρακάτω:

- Παραλαβή ελαιόκαρπου

Η μεταφορά του ελαιοκάρπου από τους ελαιώνες στο ελαιοτριβείο γίνεται σε πλαστικά τελάρα με οπές αερισμού ή σε πλαστικούς σάκους με φορτηγό αυτοκίνητο, όπου ζυγίζονται και αρχίζει η επεξεργασία τους. Η αποθήκευση του καρπού δε συνίσταται αλλά αν είναι απαραίτητη θα πρέπει να είναι για μικρό χρονικό διάστημα και σε χώρο με καλό αερισμό.

- Τροφοδοσία-Αποφύλλωση καρπού

Τα φύλλα της ελιάς όταν συνθλίβονται προσδίδουν πικρή γεύση στο λάδι και δίνει προϊόν κατώτερης ποιότητας, καθώς εμπλουτίζεται με χλωροφύλλη. Έτσι η αποφύλλωση είναι απαραίτητη και γίνεται μαζί με την απομάκρυνση φερτών υλικών που μπορεί να υπάρχουν μαζί με τους καρπούς της ελιάς όπως πέτρες κ.α.

- Πλύσιμο

Η ποιότητα του ελαιολάδου υποβαθμίζεται από την παρουσία ξένων σωμάτων στην ελαιόμαζα (χώμα, πέτρες, κ.α.) επειδή επηρεάζεται αρνητικά το άρωμα, η γεύση και η οξύτητα του λαδιού. Όταν στον καρπό υπάρχει αργιλική σκόνη της οποίας είναι δύσκολη η απομάκρυνση, τότε το ελαιολάδο επηρεάζεται κατά την αποθήκευση και ταγγίζει γρήγορα. Κατά συνέπεια το πλύσιμο που ελαιοκάρπου είναι απαραίτητο για την παραγωγή ενός αξιόλογου προϊόντος. Το νερό μπορεί να ανακυκλωθεί μετά από κατακρήμνιση ή διήθηση των στερεών συστατικών του. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία απαιτούνται περίπου 100- 120 L νερό για 1000 kg ελαιοκάρπου.

- Πολτοποίηση ελαιοκάρπου

Η διαδικασία της πολτοποίησης του ελαιοκάρπου είναι ίσως το σημαντικότερο στάδιο παραγωγής ελαιολάδου για την απόδοση και για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Υπάρχει ιδιαίτερη δυσκολία καθώς ο καρπός αποτελείται από:

- Στερεές ουσίες (πυρήνας, σάρκα και ενδοσπέρμιο)
- Υγρές ουσίες (λάδι και φυτικά υγρά)
- Πολύ ελαστικές ουσίες (φλοιός)

Στα σύγχρονα ελαιουργεία για την συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιούνται μεταλλικοί μύλοι, σφυρόμυλοι και σπαστήρες με οδοντωτούς δίσκους. Στα παραδοσιακά ελαιοτριβεία η άλεση του καρπού γινόταν με κυλινδρικές μυλόπετρες.

- Μάλαξη ελαιοζύμης

Η μάλαξη γίνεται σε ειδικά συγκροτήματα τους θερμομαλακτήρες με τη προσθήκη ζεστού νερού και την ανάμειξη του με την ελαιοζύμη. Η ελαιοζύμη έχει θερμανθεί στους 28-30 °C για την διευκόλυνση της διαδικασίας. Στο στάδιο αυτό, τα σταγονίδια μικρής διαμέτρου του ελαίου συνενώνονται σε μεγαλύτερες σταγόνες που απομακρύνονται εύκολα από τον ελαιοπολτό κατά τη διαδικασία της συμπίεσης.

- Εξαγωγή ελαιολάδου

Η εξαγωγή ελαιολάδου από τον ελαιοπολτό μπορεί να γίνει με δύο μεθόδους: την παραδοσιακή (με πίεση) και τα φυγοκεντρικά συστήματα. Η διάκριση των φυγοκεντρικών συστημάτων γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των φάσεων στις οποίες διαχωρίζεται ο ελαιοπολτός (2 φάσεων-3 φάσεων).

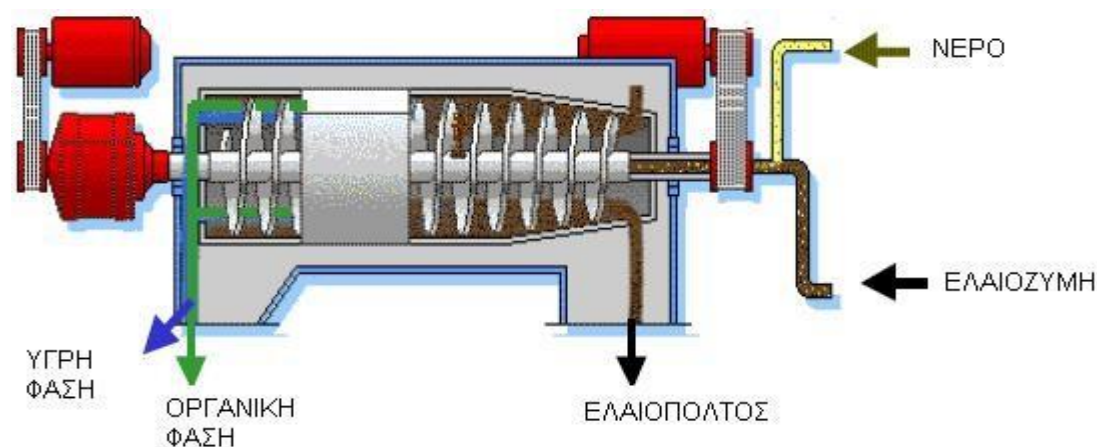
1.2.2 Α Παραδοσιακή μέθοδος

Η διαδικασία αυτή γινόταν με πίεση και για αρκετές δεκαετίες ήταν η μοναδική μέθοδος παραλαβής ελαιολάδου. Με την εφαρμογή πίεσης διαχωριζόταν η υγρή φάση (μίγμα λαδιού/νερού) από τη στερεή. Στη συνέχεια γινόταν διαχωρισμός του λαδιού από την υγρή φάση. Η παραγωγή αποβλήτων ήταν 350 kg ελαιοπυρήνα και 450 kg υγρών αποβλήτων για 1000 kg ελαιοκάρπου. Σημαντικό μειονέκτημα της

μεθόδου είναι ότι είναι μια ασυνεχής παραγωγική διαδικασία, αν και σε σχέση με τις φυγοκεντρικές μεθόδους η ποσότητα των αποβλήτων είναι μειωμένη σημαντικά.

1.2.2 Β Φυγοκεντρικό σύστημα 3 φάσεων

Τη δεκαετία του '70 στόχος της ελαιουργίας ήταν να αυξηθεί η ποσότητα που ήταν ικανό ένα ελαιοτριβείο να επεξεργασθεί, να αυξηθεί η απόδοση της εξαγωγής ελαιολάδου και κυρίως να μειωθεί η χειρωνακτική εργασία. Κάπως έτσι φτάσαμε στη δημιουργία των ελαιοτριβείων τριών φάσεων. Η εξαγωγή του ελαιολάδου γίνεται με την επίδραση της φυγόκεντρου δύναμης μέσω ενός φυγοκεντρικού διαχωριστήρα (decanter). Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται ο ελαιοπυρήνας, το ελαιόλαδο και τα λιόζουμα (3 φάσεις). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αυξημένη κατανάλωση νερού και τα συνέπεια οι μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων που παράγονται. Ειδικότερα, παράγονται 500 kg ελαιοπυρήνα και 1200 kg υγρά απόβλητα από την επεξεργασία 1000 kg ελαιοκάρπου (1,25- 1,7 φορές περισσότερο νερό απ' ότι στην εξαγωγή με πίεση).

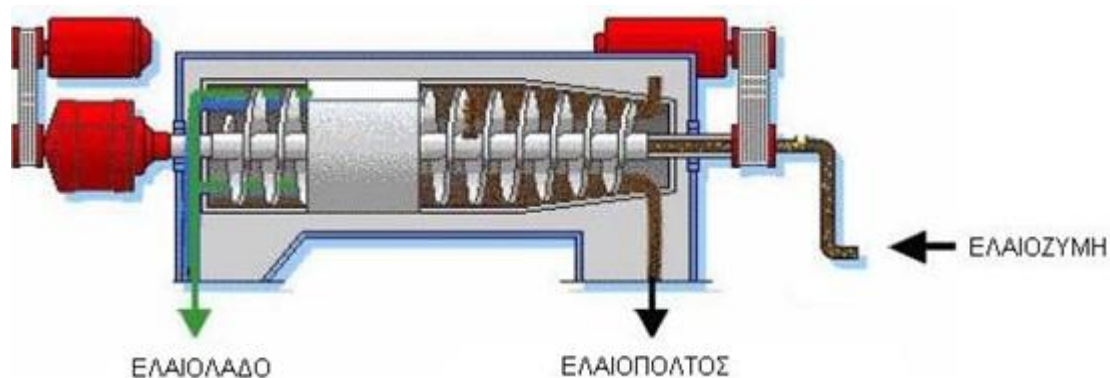


Εικόνα 6: Τριφασικό Φυγοκεντρικό Σύστημα Ελαιοτριβείου

1.2.2 Γ Φυγοκεντρικό σύστημα 2 φάσεων

Τα μειονεκτήματα του τριφασικού συστήματος διαχωρισμού οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός φυγοκεντρικού συστήματος δύο φάσεων. Κατά τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιείται μόνο το νερό πλυσίματος χωρίς την προσθήκη άλλης ποσότητας νερού. Το ελαιόλαδο παραλαμβάνεται στην υγρή φάση και η ελαιοπυρήνα ως μια ημιστερεή φάση στην οποία ενσωματώνονται και τα λιόζουμα. Κατά την επεξεργασία

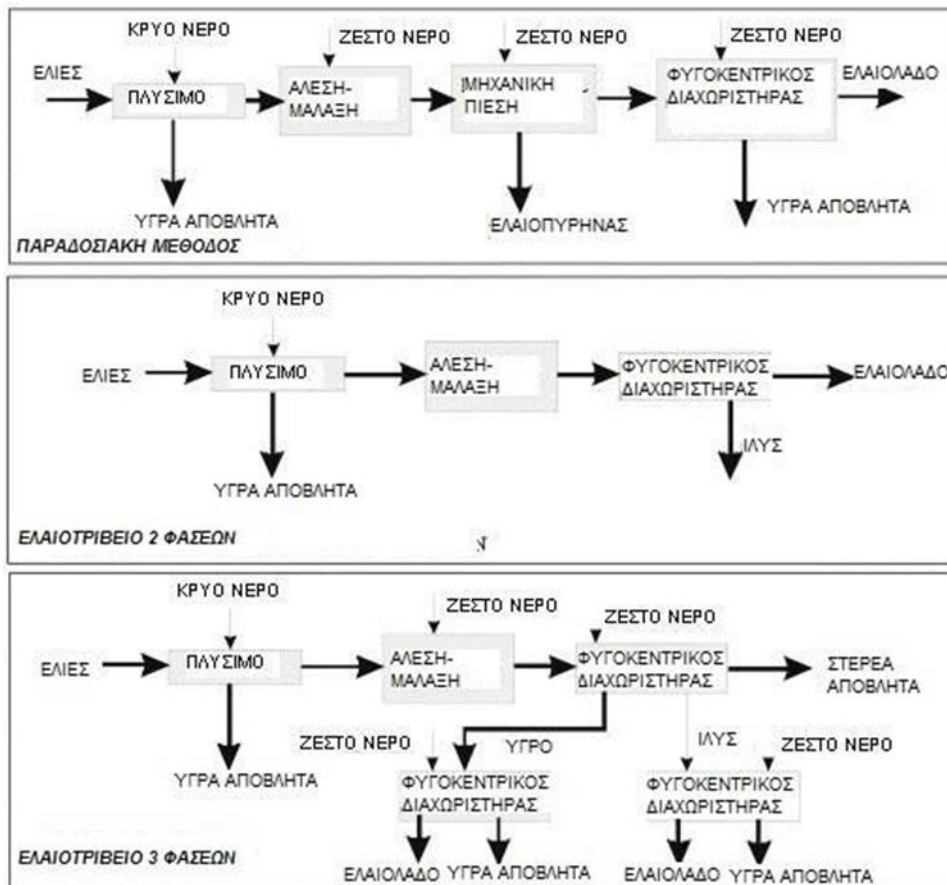
1000 kg είναι 800 kg. Η μείωση της κατανάλωσης νερού και η απουσία υγρών αποβλήτων είναι το πλεονέκτημα του διφασικού συστήματος. Σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι η ελαιοπυρήνα που παράγεται έχει αυξημένη υγρασία και υψηλό ρυπαντικό φορτίο. Κατά συνέπεια είναι δύσκολη στο χειρισμό, στη μεταφορά και στην επεξεργασία.



Εικόνα 7: Διφασικό Φυγοκεντρικό Σύστημα Ελαιοτριβείου

- Τελικός διαχωρισμός-Καθαρισμός ελαιολάδου

Στο τελευταίο στάδιο επεξεργασίας γίνεται διαχωρισμός του ελαιολάδου με φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες από τα φυτικά υγρά και τα νερά της έκπλυσης. Ο τελικός διαχωρισμός εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το ιξώδες και το ειδικό βάρος της υγρής φάσης, καθώς και από το σχήμα και τις διαστάσεις των ελαιοσταγονιδίων. Κάποιες φορές το ελαιόλαδο διηθείται και σε ειδικά φίλτρα κυτταρίνης, αφού μετά τον διαχωρισμό είναι θολό. Αυτό συμβαίνει επειδή, στο ελαιόλαδο υπάρχουν φυσαλίδες αέρα ή γαλακτώματα ελαίου και φυτικών υγρών που σχηματίζονται με την παρεμβολή γαλακτωματοποιητών (διάφορα μεγαλομοριακά συστατικά της ελαιομάζας). Τέλος, μέσω παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων (κόσκινα απολάσπωσης), αφαιρούνται τα στερεά συστατικά (τεμαχίδια σάρκας, φλοιού και πυρηνόξυλου) που μπορεί να περιέχονται. Το περιεχόμενο σε στερεά σωματίδια είναι 0,5-1% του συνολικού βάρους της υγρής φάσης (Κυριτσάκης 2009; McNamara et al., 2008; Μπαλατσούρας, 1999; Kapellakis et al., 2008; Roig et al., 2006).



Εικόνα 8: Στάδια Παραγωγής Ελαιολάδου

1.3 Απόβλητα ελαιοτριβείου

Κατά την επεξεργασία του ελαιόλαδου, εκτός από το κύριο προϊόν δηλαδή το ελαιόλαδο, παράγονται και παραπροϊόντα όπως τα φύλλα και τα κλαδιά των ελαιόδεντρων και ο ελαιοπυρήνας. Ακόμη, παράγονται και μεγάλες ποσότητες αποβλήτων με υψηλό ρυπαντικό φορτίο. Η διαχείριση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων των ελαιοτριβείων έχει ιδιαίτερη περιβαλλοντική σημασία, καθώς βιομηχανική μονάδα πρέπει να κάνει περιβαλλοντική διαχείριση των παραπροϊόντων και των αποβλήτων της σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

1.3.1 Στερεά απόβλητα

Ο όρος στερεά απόβλητα αναφέρεται στο μίγμα στερεών συστατικών όπως ο ελαιοπυρήνας και τα φύλλα των ελαιόδεντρων. Η επεξεργασία του ελαιοπυρήνα γίνεται σε ειδικές εγκαταστάσεις, τα πυρηνελουργεία. Από τη διαδικασία προκύπτουν ετησίως 17000 τόνοι πυρηνέλαιου και 160000 τόνοι πυρηνόξυλο. Ειδικότερα, ο ελαιοπυρήνας ξεραίνεται στους 60 °C και επεξεργάζεται με διάλυμα εξανίου (Genedebien et al., 2001).

1.3.2 Υγρά απόβλητα

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Olive Mill Wastewater – OMW) ονομάζονται λιόζουμα ή κατσίγαρος. Η επεξεργασία τους είναι απαραίτητη καθώς παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από τα τριφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία, από την αραίωση της ελαιοζύμης με νερό, την προσθήκη νερού κατά τη πλύση του καρπού, τη μάλαξη και τον διαχωρισμό του ελαιολάδου και από τα φυτικά υγρά του ελαιοκάρπου. Τα υγρά απόβλητα δημιουργούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα όταν απορριφθούν χωρίς επεξεργασία, λόγω της υψηλής ρυπογόνου δύναμης που έχουν. Όπως βλέπουμε και στον **Πίνακα 2** χαρακτηρίζονται από:

- Σκούρο καφέ χρώμα έως μαύρο
- Χαρακτηριστική οσμή
- Υψηλό οργανικό φορτίο
- Όξινο pH
- Υψηλή αγωγιμότητα
- Υψηλή περιεκτικότητα πολυφαινόλων
- Υψηλή περιεκτικότητα σε στερεό υλικό

Πίνακας 2: Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων (Sierra et al., 2001)

| Παράμετρος | Όρια τιμών |
|--|------------|
| pH | 4,5-6 |
| Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD ₅ g/L) | 35-100 |
| Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (XAO g/L) | 40-195 |
| Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC g/L) | 22-64 |
| Ανόργανα στοιχεία (g/L) | 5-14 |
| Πολυφαινόλες (g/L) | 3-24 |
| N (g/L) | 5-15 |
| P (g/L) | 0,3-1,1 |
| K(g/L) | 2,7-7,2 |
| Ca (g/L) | 0,12-0,75 |
| Mg (g/L) | 0,10-0,40 |
| Στερεά % | 5,5-17,6 |

Το κύριο συστατικό των υγρών αποβλήτων είναι το νερό. Όσον αφορά στο οργανικό κλάσμα, αποτελείται κυρίως από σάκχαρα όπως η φρουκτόζη, γλυκόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη και ξυλόζη (Arienzo et al., 2003). Οι οργανικές ενώσεις που περιέχονται στα απόβλητα ελαιοτριβείου μπορούν να ταξινομηθούν σε **(Πίνακας 3,4)**:

- α) ενώσεις εύκολης και άμεσης αφομοίωσης από μικροοργανισμούς
- β) πολυμερή ή βιοαποικοδομήσιμα, όπως πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες, πηκτίνες
- γ) δύσκολα αποικοδομήσιμα συστατικά όπως φαινόλες, τανίνες, μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες.

Συνεπώς, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων είναι ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Ακόμη, η περιεκτικότητα τους σε άζωτο είναι χαμηλή. Περιέχεται κυρίως αμμωνιακό, νιτρικό και οργανικό άζωτο (μικρό ποσοστό πρωτεϊνικής φύσεως). Επίσης, υπάρχουν οργανικά οξέα όπως οξικό, οξαλικό, φουμαρικό, γλυκερικό, μαλικό, τρυγικό και κιτρικό. Ένα ακόμα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των υγρών αποβλήτων είναι η ισχυρή φυτοτοξικότητα. Είναι επιβλαβή για φυτά με επιφανειακό ριζικό σύστημα και για φυτά που είναι στο βλαστικό στάδιο χωρίς να παρουσιάζει εξειδίκευση (Capasso et al., 1992; Ouzounidou et al., 2010). Η υψηλή τοξικότητα προέρχεται από τη συγκέντρωση πολυφαινόλων (Mulinacci et al., 2001). Επίσης, περιέχει πολυαλκοόλες, όπως η γλυκερίνη και η μανιτόλη, λιπαρές ουσίες και ίχνη γλυκοζιδίων (Azbar et al., 2004). Τελικά, όσον αφορά στα ανόργανα άλατα, στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων περιέχονται κυρίως άλατα του καλίου, φωσφόρου και ασβεστίου. Επιπλέον, μικρά ποσοστά αλάτων νατρίου και μαγνησίου, θειικά άλατα και ίχνη βαρέων μετάλλων. Ειδικά, τα στοιχεία που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για λίπασμα έχουν ιδιαίτερη σημασία όπως το κάλιο, το μαγνήσιο και ο φώσφορος (Roig et al., 2006; Mekki et al., 2006).

Η σύνθεση των αποβλήτων δε είναι σταθερή και εξαρτάται από (Niaounakis et al., 2006):

- Την ποικιλία προέλευσης της ελιάς, το στάδιο ωριμότητας, την περιεκτικότητα σε νερό και το χρόνο αποθηκεύσεως του καρπού πριν την ελαιοποίηση.
- Τη μέθοδο παραλαβής του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη, με την κλασσική μέθοδο του υδραυλικού πιεστηρίου, με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης τριών ή δύο φάσεων. Κάθε τύπος ελαιοτριβείου έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε

επιπλέον νερό κατά τη διεργασία. Σαν αποτέλεσμα αυτού, τα φυτικά υγρά παράγονται από τα ελαιοτριβεία τριών φάσεων, όπου και χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες νερού, να υφίστανται κάποια αραίωση.

- Την ποσότητα του νερού που είναι διαθέσιμη για την επεξεργασία του ελαιοκάρπου.
- Τον χρόνο αποθήκευσης. Η αποθήκευση μπορεί να αλλάξει τα βιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου, καθώς παρατηρείται έντονη βιολογική δραστηριότητα (αύξηση της οξύτητας), καθώς επίσης και φυσικοχημικές μεταβολές όπως η καθίζηση στερεών.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά αποβλήτων κλασσικών και τριφασικών ελαιοτριβείων (Karellakis et al., 2008)

| Παράμετρος | Κλασσικό | Φυγοκεντρικό τριών φάσεων |
|---|----------|---------------------------|
| pH | 4,5-5,5 | 4,7-5,2 |
| Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ g/L) | 120-130 | 60-180 |
| Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD₅g/L) | 90-100 | 20-55 |
| Αιωρούμενα στερεά (%) | 0,1 | 0,9 |
| Ολικά στερεά (%) | 12 | 6 |
| Ολικά σάκχαρα | 2-8 | 0,5-2,6 |
| Οργανικές ουσίες (%) | | |
| Αζωτούχες ενώσεις | 0,5-2 | 0,1-2,6 |
| Οργανικά οξέα | 0,1-1,5 | 0,2-0,4 |
| Πολυαλκοόλες | 1-1,5 | 0,3-0,5 |
| Πηκτίνες, ταννίνες | 1-1,5 | 0,2-0,5 |
| Πολυφαινόλες | 2-2,4 | 0,3-0,8 |
| Λίπη | 0,03-1 | 0,5-2,3 |
| Ανόργανα στοιχεία (%) | | |
| P | 0,11 | 0,03 |
| K | 0,72 | 0,27 |
| Ca | 0,07 | 0,02 |
| Mg | 0,04 | 0,01 |
| Na | 0,09 | 0,03 |

C1

0,03

0,01

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά διφασικού αποβλήτου (Caryuela et al., 2006)

| Παράμετρος | Διφασικό απόβλητο |
|-----------------------------------|-------------------|
| Οργανικές ενώσεις (%) | 94,3 |
| Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC %) | 55,1 |
| Ολικό άζωτο (TN g/kg) | 11,3 |
| Φώσφορο (g/kg) | 0,9 |
| Κάλιο (g/kg) | 2,4 |
| Λιγνίνη (%) | 47,5 |
| Κυτταρίνη (%) | 16,5 |
| Ημικυτταρίνες (%) | 38,7 |
| Σάκχαρα (g/kg) | 96 |
| Λίπη (g/kg) | 202 |
| Φαινόλες (g/kg) | 12,2 |
| pH | 5,2 |
| Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (EC dS/m) | 5,2 |

Το διφασικό σύστημα, συγκριτικά με τους άλλους δύο τύπους ελαιοτριβείων παράγει μεγαλύτερες ποσότητες στερεού αποβλήτου. Πλεονεκτεί όμως διότι παράγει μικρότερη ποσότητα υγρών αποβλήτων. Η επιπλέον προσθήκη νερού στο τριφασικό σύστημα μειώνει την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες σε σχέση με τα απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου.

Στον ελλαδικό χώρο, η πλειοψηφία των ελαιοτριβείων λειτουργούν με το τριφασικό σύστημα επεξεργασίας. Υπάρχουν, ωστόσο, και κάποια παραδοσιακά αλλά σε πολύ μικρό αριθμό. Σε αντίθεση, με την Ισπανία που η συντριπτική πλειονότητα των εγκαταστάσεων των ελαιοτριβείων είναι διφασικά πλέον. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι στην Ελλάδα τα περισσότερα πυρηνελουργεία που υπάρχουν δεν μπορούν αν επεξεργαστούν τον υγρό ελαιοπυρήνα που παράγεται από τα διφασικά ελαιοτριβεία.

1.4. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις αποβλήτων ελαιοτριβείων

Τα απόβλητα ελαιοτριβείου λόγω του υψηλού ρυπαντικού τους φορτιού, κατατάσσονται ανάμεσα στα πιο επιβλαβή απόβλητα για το περιβάλλον. Το περιβαλλοντικό πρόβλημα εντείνεται ακόμη περισσότερο όταν διοχετεύονται σε φυσικούς αποδέκτες όπως ποτάμια, θάλασσες, λίμνες και ρεματιές.

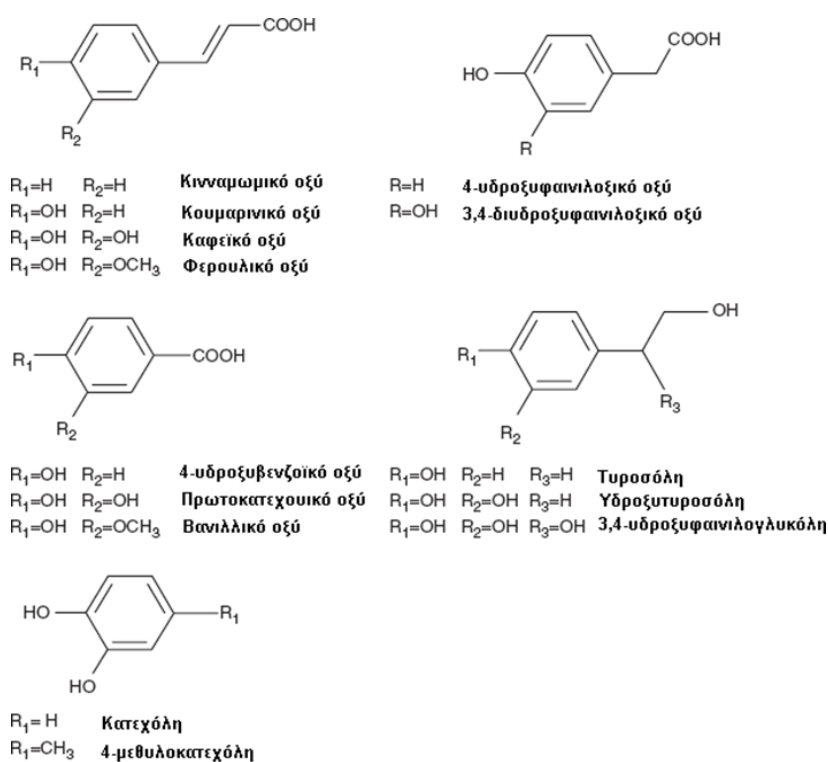
Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, όταν απορρίπτονται ανεξέλεγκτα στους κοντινούς υδάτινους αποδέκτες δημιουργούν προβλήματα σε όλο το υδάτινο οικοσύστημα. Η πρώτη και πιο εμφανής συνέπεια είναι η αλλαγή του χρώματος των υδάτων που συμβαίνει λόγω του πολυμερισμού και της οξείδωσης των ταννινών που περιέχονται στα απόβλητα. Επίσης, παρατηρείται ενίσχυση του φαινομένου του ευτροφισμού. Αυτό συμβαίνει διότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών (συμπερ. και των φυκών) αυξάνεται αρκετά, βοηθούμενος από τη αυξημένη συγκέντρωση φωσφόρου και οργανικών ενώσεων. Παράλληλα, η μεγάλη συγκέντρωση φαινολών, φωσφόρου και πολυσακχαριτών είναι τοξική για κάποια είδη μικροοργανισμών (Fiorentino, et al., 2003), ενώ άλλα είδη μικροοργανισμών ευνοούνται από την υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αναπτύσσονται ταχύτερα και σε βάρος των υπολοίπων. Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι υπάρχουν υδρόβιοι οργανισμοί που ακόμα και μικρές ποσότητες αποβλήτου μπορεί να είναι τοξικές για αυτούς (Fiorentino et al., 2004).

Τέλος, το έδαφος λόγω της μεγάλης δυνατότητας βιοαποικοδόμησης που έχει, για πολλά χρόνια είχε γίνει αποδέκτης των αποβλήτων ελαιοτριβείων. Αυτό όμως μπορεί να συνεπάγεται και σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα του εδάφους, ειδικά εάν εφαρμοστούν μεγάλες ποσότητες σε μικρό χρονικό διάστημα.

- Αλλαγές στο πορώδες του εδάφους (Niaounakis et al., 2006)
- Μικροβιοστατική και μικροβιοκτόνο δράση
- Φυτοτοξική δράση λόγω:
 - Ύπαρξης πολυφαινολών
 - Αύξησης αλάτων
 - Παρουσίας οργανικών οξέων (Ouzounidou et al., 2010).

Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων είναι ο βασικός παράγοντας που έχει συνδεθεί με την τοξικότητα και την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των αποβλήτων ελαιοτριβείου (Mekki et al., 2006). Διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό

τους βάρους σε απλές φαινόλες (ταννίνες μικρού μοριακού βάρους και φλαβονοειδή) και στις πολυφαινόλες (σκούρου χρώματος πολυμερή από τον πολυμερισμό και την οξείδωση απλών φαινολικών ενώσεων). Η συγκέντρωση των φαινολικών στο ελαιόλαδο εξαρτάται από την ωριμότητα του καρπού, τον τρόπο και το χρόνο της αποθήκευσης, τον τύπο του ελαιοτριβείου καθώς και από τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής. Φαινολικά συστατικά υπάρχουν στο ελαιόδενδρο στον καρπό αλλά και στα φύλλα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ανάλογα με τον τύπο του φυτικού ιστού (Ποντίκης, 2000). Αποτελεί ένα αμυντικό μηχανισμό του φυτού ενάντια σε προσβολές από μικροοργανισμούς και έντομα. Από χημικής άποψης, είναι ενώσεις που αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο που περιέχει μια ή και περισσότερες υδροξυλομάδες. Λόγω του ότι είναι υδατοδιαλύτες ενώσεις, μεταφέρονται κατά την παραγωγή ελαιολάδου στην υδάτινη φάση (Vermeris et al., 2006).



Εικόνα 9: Κυριότερες φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στα απόβλητα ελαιοτριβείων (Knurr et al., 1996)

1.4.1. Τρόποι επεξεργασίας και διάθεσης των αποβλήτων ελαιοτριβείων

Η μέθοδος διαχείρισης των αποβλήτων αποτέλεσε για αρκετά χρόνια ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα καθώς παράγονται και σε μεγάλες ποσότητες. Στην πορεία των ετών αναπτύχθηκαν αρκετές μέθοδοι επεξεργασίας. Άλλωστε δε είναι μόνο ένα περιβαλλοντικό πρόβλημα αλλά και μια πηγή για την παραλαβή χρήσιμων προϊόντων.

Η δυσκολία στη διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείων οφείλεται τόσο στην ιδιαιτερότητα του υλικού όσο και σε οικονομικούς παράγοντες. Πρώτα, είναι το υψηλό οργανικό τους φορτίο και η τοξικότητα που παρουσιάζουν για κάποια είδη φυτών και ζώων. Ύστερα, τα μικρά και μεμονωμένα ελαιοτριβεία δεν μπορούν να αντέξουν το οικονομικό βάρος της επένδυσης για τη διαχείριση των αποβλήτων τους. Παράλληλα, πρέπει να ληφθεί υπόψη ή εποχικότητα της λειτουργίας των ελαιοτριβείων και η διασπορά τους μέσα στις καλλιεργούμενες με ελαιόδεντρα εκτάσεις.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την επεξεργασία των αποβλήτων και την αποτοξικοποίησή τους. Εφαρμόζονται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό και φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματικές. Ακόμη, τα απόβλητα ελαιοτριβείου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή άλλων ωφέλιμων τελικών προϊόντων όπως λίπασμα (με ή χωρίς κομποστοποίηση), την παραγωγή αντιοξειδωτικών ή και για την παραγωγή καυσίμου και βιοαερίου μετά από επεξεργασία.

Οι μεθοδολογίες επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιοτριβείου χωρίζονται σε μηχανικές, βιολογικές και φυσικοχημικές.

A) Μηχανική επεξεργασία

1. Διήθηση

Η πιο παλιά μέθοδος είναι η διήθηση για την απομάκρυνση των στερεών που περιέχονται στα απόβλητα ελαιοτριβείου και μπορεί να είναι άργιλος, ιλύς και οργανική ουσία. Η διήθηση μπορεί να εφαρμοστεί και σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους. Η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιείται με την βοήθεια πορώδους υλικού (φίλτρο) που συγκρατεί τα στερεά ενώ ή υγρή φάση κινείται ελεύθερα. Το φίλτρο αποτελείται από στρώματα άμμου, αμμοχάλικου ή ενεργού άνθρακα (Israilides et al., 1997). Εφαρμόζεται με τη δύναμη της βαρύτητας (φυσική ροή), με

πίεση στην πλευρά εισόδου (εξαναγκασμένη ροή) και εφαρμογή κενού στην έξοδο των αποβλήτων.

2. *Επίπλευση*

Η μέθοδος της επίπλευσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των αιωρούμενων σωματιδίων από τα υγρά απόβλητα. Ο διαχωρισμός διευκολύνεται όταν στο υγρό διοχετεύεται υπό πίεση ένα αέριο, αυτό μπορεί να είναι αέρας ή άζωτο και δημιουργούνται φυσαλίδες. Έτσι προσροφάται στην επιφάνεια των στερεών και μειώνεται το ειδικό τους βάρος ώστε να γίνεται πιο εύκολος ο διαχωρισμός. Οι διάφοροι τύποι επίπλευσης διακρίνονται κυρίως από τον τρόπο που παράγονται οι φυσαλίδες.

3. *Καθίζηση*

Η μέθοδος της καθίζησης στοχεύει στην απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα ελαιολιβείου. Η αρχή της μεθόδου είναι τα στερεά έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό και κατά συνέπεια καθιζάνουν. Μπορεί να γίνει είτε με φυσική ροή είτε με εξαναγκασμένη. Τα υγρά απόβλητα ρέουν στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης μετά την αφαίρεση των μεγάλου μεγέθους στερεών. Στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης η ροή μειώνεται και τα σωματίδια βυθίζονται στον πυθμένα.

B) Φυσικοχημική επεξεργασία

Οι φυσικοχημικές μέθοδοι (συσσωμάτωση, φιλτράρισμα κτλ) επεξεργασίας συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη περαιτέρω βιολογική επεξεργασία.

1. *Διαχωρισμός με μεμβράνες*

Με τον διαχωρισμό με μεμβράνες επιτυγχάνεται η απομάκρυνση διαλυμένων ουσιών, κolloειδών και αιωρούμενων σωματιδίων. Η μεμβράνη είναι ημιπερατή ή πορώδης και επιτρέπει στα σωματίδια των υγρών αποβλήτων, ανάλογα με το μέγεθος τους, να τη διαπερνούν ή όχι (Rozzi et al., 1996). Παρόλα αυτά ο διαχωρισμός με μεμβράνες δεν είναι κατάλληλος για απόβλητα ελαιολιβείου με υψηλό ρυπαντικό φορτίο λόγω του ότι φράζουν τους πόρους των μεμβρανών και δημιουργούνται συσσωμάματα. Κατ' αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα γλοιώδες στρώμα στην επιφάνεια των μεμβρανών (Wui et al., 2008). Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο διαχωρισμός με μεμβράνες είναι αποτελεσματικός στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιολιβείων όταν έχει ήδη αφαιρεθεί ένα μέρος του ρυπαντικού τους φορτίου. Τέλος υπάρχουν αρκετές έρευνες που υποστηρίζουν ότι από το διαχωρισμό

με μεμβράνες μπορεί να γίνει παραλαβή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Paraskeva et al., 2007; Cassano et al., 2013). Μειονέκτημα της μεθόδου είναι το αρκετά υψηλό κόστος της.

2. *Αποτέφρωση*

Η αποτέφρωση είναι μια λύση με χαμηλό κόστος για την διαχείριση των αποβλήτων ελαιοτριβείου και στηρίζεται στο υψηλό οργανικό τους φορτίο. Στα απόβλητα διοχετεύεται αέρας σε υψηλή θερμοκρασία, κι έτσι εξατμίζεται πλήρως το νερό από τα απόβλητα και καταστρέφονται οι οργανικές τους ενώσεις.

3. *Εξάτμιση και απόσταξη*

Με τη χρήση αυτής της επεξεργασίας, συμπυκνώνεται το οργανικό και ανόργανο περιεχόμενο των αποβλήτων ελαιοτριβείων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω εφαρμογές όπως σε σιτηρέσια ζώων (αν και εφαρμόζεται σε περιορισμένη έκταση λόγω της πικρής γεύσης), για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και ως λίπασμα. Η ενέργεια για την εξάτμιση προέρχεται ή από θερμότητα καύσης είτε από φυσική πηγή (ήλιος) (Rozzi et al., 1996).

Οι βιολογικές μέθοδοι βασίζονται στην αποικοδόμηση των πολύπλοκων οργανικών ενώσεων από τους μικροοργανισμούς σε απλούστερες και ενεργειακά σταθερότερες ενώσεις. Οι λίμνες εξάτμισης είναι μια μέθοδος βιολογικής επεξεργασίας για υγρά απόβλητα με χαμηλό ρυπαντικό φορτίο. Είναι τεχνητές κοιλάτητες στο έδαφος στις οποίες καταλήγουν τα απόβλητα ελαιοτριβείων χωρίς προηγούμενη επεξεργασία. Στις λίμνες εξάτμισης συμβαίνουν διάφορες διαδικασίες όπως η εξάτμιση του νερού, η εξάτμιση των πτητικών συστατικών η αποικοδόμηση και υδρόλυση του οργανικού υλικού μέσω μικροοργανισμών. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται από κυρίως από τις κλιματολογικές συνθήκες. Σήμερα οι λίμνες εξάτμισης χρησιμοποιούνται για αποθήκευση του αποβλήτου, έτσι γίνεται και εξάτμιση του νερού των αποβλήτων αλλά και καθίζηση των στερεών που περιέχονται. Μετά την εξάτμιση τα στερεά που μένουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα (Rozzia and Malpei, 1996). Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι μια απλή εφαρμογή χαμηλού κόστους, εάν όμως δε γίνει σωστή μόνωση στα τοιχώματα της λίμνης μπορεί να υπάρξει μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η διάρκεια της επεξεργασίας που είναι περισσότερο από 60 ημέρες, και οι μεγάλες επιφάνειες που πρέπει να καλύψουν. Ακόμη, από τις λίμνες εξάτμισης

αναδύεται μια δυσάρεστη οσμή που γίνεται αντιληπτή ακόμα και σε μεγάλη απόσταση (Carbera, et al., 1996; Rozzi, et al., 1996).

Γ) Βιολογική επεξεργασία

1. Μέθοδος ενεργού ιλύος

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι η ενεργός ιλύς. Έχει χαμηλή λειτουργική δαπάνη και υψηλή αποδοτικότητα σε σύγκριση με τη χημική επεξεργασία (Drysdale et al., 1999). Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο λόγω του ότι μπορεί να επεξεργαστεί απόβλητα με $BOD < 3000$ (Brenes et al., 1993). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι βακτήρια, πρωτόζωα, και φύκη και αποτελούν την βιομάζα για την αποικοδόμηση (Lacko et al., 1999). Από τη διαδικασία αποικοδόμησης παράγονται υψηλές ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα και νιτρικά ιόντα και ιλύς. Η ιλύς ανακυκλώνεται στη δεξαμενή αερισμού ενώ το υπόλοιπο μέρος πρέπει να επεξεργαστεί ξεχωριστά για περαιτέρω χρήση. Η μέθοδος χρησιμοποιεί συνδυασμό δεξαμενών τόσο σε αερόβιες αλλά και σε αναερόβιες συνθήκες. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα απόβλητα σαν θρεπτικό μέσο και το οξειδώνουν προς CO_2 και συγχρόνως δημιουργείται νέα βιομάζα. Έτσι επιτυγχάνεται αποτοξικοποίηση των ρύπων (Brene, et al., 1993).

2. Αναερόβια επεξεργασία

Η αναερόβια επεξεργασία είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αποτοξικοποίηση αποβλήτων με υψηλό οργανικό φορτίο. Εφαρμόζεται όλο και περισσότερο επειδή παράγεται κατά τη διαδικασία σημαντική ποσότητα μεθανίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω ως πηγή ενέργειας (Bitton 2005). Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι αναερόβιοι, δηλαδή αναπτύσσονται μόνο απουσία οξυγόνου χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τις οργανικές ενώσεις που περιέχονται στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Συγκριτικά με την αερόβια μέθοδο επεξεργασίας, η αναερόβια γίνεται σε μειωμένος ρυθμό λόγω της χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας των αναερόβιων μικροοργανισμών. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οι μικρότερες ποσότητες ιλύος που παράγονται (Rozzi et al., 1996).

3. Κομποστοποίηση

Μία ακόμη μέθοδος αποτοξικοποίησης των αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι η κομποστοποίηση. Είναι μια διαδικασία αποικοδόμησης που γίνεται με την βοήθεια μικροοργανισμών και έχει ως αποτέλεσμα την παραλαβή ενός τελικού προϊόντος που ονομάζεται χούμος. Το τελικό προϊόν χρησιμοποιείται ως εδαφοβελτιωτικό. Κατά τη διαδικασία της αποικοδόμησης το οργανικό περιεχόμενο των αποβλήτων ανοργανοποιείται προς CO₂, ακόμη παράγονται νερό και ανόργανα άλατα. Σημαντική είναι επίσης και η μείωση του όγκου, που είναι της τάξεως του 40-50%. Τα απόβλητα τοποθετούνται σε σειράδια στα οποία και γίνονται εξώθερμες αντιδράσεις που ανεβάζουν τη θερμοκρασία τους στους 60 – 70 °C. Παράλληλα για να γίνει σωστά η κομποστοποίηση είναι απαραίτητος ο σωστός αερισμός των σειραδιών. Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων η κομποστοποίηση τους γίνεται σε συνδυασμό με άλλα στερεά γεωργικά παραπροϊόντα όπως πριονίδι, πυρηνόξυλο ή και υπολείμματα από εκκοκκιστήρια βάμβακος. Η μέθοδος αυτή ορίζεται σαν συγκομποστοποίηση (Paredes et al., 2002; Zenjari et al., 2006). Μελέτες αναφέρουν ότι δε υπάρχουν σημαντικές διαφορές του κόμποστ που προέρχεται από απόβλητα ελαιοτριβείων και των κόμποστ από άλλα αγροτικά παραπροϊόντα (Paredes et al., 2001; Cegarra et al., 1996; Zervakis et al., 2011)

4. Αποδόμηση αποβλήτων ελαιοτριβείου με χρήση μυκήτων

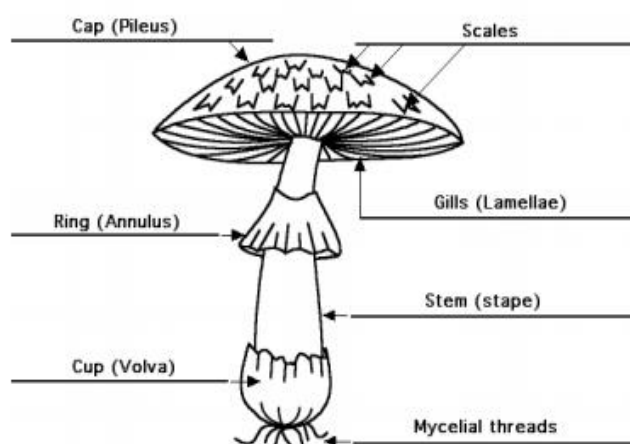
Αρκετές έρευνες έχουν γίνει με στόχο τη μείωση του φαινολικού φορτίου και την αποτοξικοποίηση των αποβλήτων ελαιοτριβείων με την ανάπτυξη ανώτερων μυκήτων σε διάφορες συγκεντρώσεις αποβλήτου. Διάφορα είδη μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό με αρκετά καλά αποτελέσματα στην ανάπτυξη τους σε απόβλητα ελαιοτριβείου μειώνοντας το φαινολικό τους φορτίο και αποτοξικοποιώντας τα απόβλητα. Η κύρια κατηγορία μικροοργανισμών που αποδομούν την λιγνίνη είναι οι μύκητες και ειδικότερα οι βασιδιομύκητες (Hammel, 1997). Συνεπώς οι μύκητες άρχισαν να χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των αποβλήτων ελαιοτριβείων για την αποτοξικοποίηση τους. Στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί ανήκουν στα είδη *Phanerochaete chrysosporium* (Sayadi and Radhouane, 1992), *Lentinula edodes* (D' Annibale, et al., 1998), *Pleurotus ostreatus* (Kissi et al., 2001; Fountoulakis et al., 2002; Martirani et al., 1996) *P. eryngii*, *Ganoderma australe* και *G. carnosum* (Ntougias, et al., 2012) μειώνοντας το φαινολικό φορτίο και αποχρωματίζοντας τα απόβλητα ελαιοτριβείων. Παράλληλα είδη του γένους *Pleurotus* έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για την τοξικότητα του αποβλήτου (Ntougias, et al., 2013). Ακόμη έχουν γίνει μελέτες για την παραγωγή

εδώδιμωνμανιταριών από θρεπτικά μέσα που περιέχουν απόβλητα ελαιοτριβείου (Zervakis, et al., 1996; Ruiz - Rodriguez , et al., 2010; Zervakis, et al., 2013).

1.5. Ορισμός και Μορφολογία

Ωςμανιτάρια ορίζονται οι μακρομύκητες με διακριτά καρποσώματα που αναπτύσσονται υπέργεια ή υπόγεια (Chang and 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 τουμανιταριού. Το καρπόσωμα αποτελεί το αναπαραγωγικό μέρος του μακρομύκητα, έχει διάρκεια ζωής περίπου 10-14 μέρες και σκοπός του είναι η παραγωγή σπορίων για την διαίωιση του είδους. Το υπόλοιπο τμήμα του μακρομύκητα έχει μεγάλη διάρκεια ζωής και ονομάζεται **μυκήλιο**. Έχει τη μορφή τριχόμορφου, αραχνοειδούς ιστού και συναντάται κάτω από το έδαφος καθώς και σε νεκρούς ή ζωντανούς κορμούς δέντρων.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός μακρομύκητα

Η δομή τωνμανιταριών που περιγράφεται, συναντάται στα είδη Βασιδιομυκήτων και σε ένα μικρό αριθμό ειδών Ασκομυκήτων. Από τα 16.000 περίπου είδη Βασιδιομυκήτων, έχει προταθεί ό,τι 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 τη βοήθεια δηλαδή της 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 τη 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 δε θα μπορούσε να προσλάβει χωρίς την παρουσία του και το φυτό παρέχει θρεπτικές ουσίες στο μύκητα. Αυτοί αναφέρονται ως συμβιωτικοί μύκητες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η συμβιωτική σχέση είναι τόσο σημαντική όπου αν υπήρχε απώλεια αυτής το φυτό δε θα μπορούσε να επιβιώσει (Chang and Milles, 2004).

Συνοπτικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Pleurotus* είναι τα εξής (Singer, 1986, Zervakis, 1992): Ετεροκάρυο, συνήθως, μυκήλιο με ρυθμική ανάπτυξη (σε ομόκεντρες ζώνες) έως και ακανόνιστη, με ή χωρίς ατελή μορφή (κορέμια, γλαυδοσπόρια) λευκού ως καστανού χρώματος, με ή χωρίς σχηματισμό κίτρινων χρωστικών και οσμής φρουτώδους, γλυκάνισου ή ουδέτερης. Πάνω στις υφές σχηματίζονται συχνά εξειδικευμένες κατασκευές παγίδευσης-ακινητοποίησης νηματωδών. Οι καταβολές καρποφοριών σχηματίζονται με ή χωρίς τη μεσολάβηση ψυχρού ερεθίσματος. Ο πύλος έχει μέγεθος 1,5-20 cm. Είναι αρχικά κυρτός στη συνέχεια γίνεται οστρακόμορφος ως δισκόμορφος και τελικά επίπεδος ή κοίλος ως χωνοειδής. Το χρώμα του ποικίλει από λευκό έως κίτρινο ή από καστανό έως πορφυρό ή κυανότερο. Η περιφέρεια του είναι συχνά αναδιπλωμένη προς τα κάτω. Η εξωτερική του επιφάνεια είναι λεία ή με ελαφρές σχισμές, λέπια, οολίδες και το εσωτερικό (σάρκα) είναι συνήθως συμπαγές με λευκό έως ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Διαθέτει ελάσματα μακρόστενα, λεία, ολόκληρα, ακτινωτά διατεταγμένα, τα οποία

καλύπτουν την κάτω επιφάνεια του πύλου έως και την κορυφή του στίπου. Τα ελάσματα έχουν χρώμα λευκό έως και ανοιχτό ερυθρό. Ο στίπος είναι συνήθως οριζόντιος έως έκκεντρος ή ελλείπων, μακρύς και λεπτός έως κοντός και χονδρός, λείος ή και χνοώδης. Το χρώμα του διαφέρει από λευκό έως τεφροκάστανο. Τα βασιδιοσπόρια έχουν σχήμα υποκυλινδρικό έως κυλινδρικό ή ελλειψοειδές, με λεπτά και λεία τοιχώματα, μη αμυλώδη.

Οι πρώτες προσπάθειες για καλλιέργεια των *Pleurotus* έγιναν το 1917 στη Γερμανία. Τότε καλλιεργήθηκε το είδος *Pleurotus ostreatus* πάνω σε κούτσουρα και κομμένους κορμούς δένδρων. Αργότερα το 1959 ο Block παρήγαγε καρποφορίες σε αποστειρωμένα μίγματα πριονιδιού και βρώμης. Η μαζική καλλιέργεια των *Pleurotus* με θρεπτικό μέσο το άχυρο αναφέρεται κατά το 1962 από τους Baño και Snvastava ενώ μεγάλες μονάδες καλλιέργειας εμφανίστηκαν στην Ευρώπη στις αρχές της δεκαετίας του '70 (Wood and Smith, 1987). Σήμερα η καλλιέργεια έχει σχεδόν τυποποιηθεί όσον αφορά τα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά μέσα και γίνεται σε άχυρο (το οποίο προέρχεται συνήθως από σιτάρι, κριθάρι, ρύζι) το οποίο εμπλουτίζεται με υλικά πλούσια σε άζωτο (π.χ. αλεύρι ψυχανθών, σπάδικες αραβοσίτου). Ιδιαίτερα αξιοσημείωτος είναι ο υπερτετραπλασιασμός της παραγωγής ειδών *Pleurotus* από 169.000 σε 797.000 τόνους κατά την οκταετία 1986 - 1994. Η ευρεία εξάπλωση και η εντατικοποίηση που γνώρισε πρόσφατα η συγκεκριμένη καλλιέργεια παγκοσμίως, οφείλεται κυρίως στην εύκολη και ταχεία ανάπτυξή τους σε ένα μεγάλο εύρος φθηνών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων καθώς και στις μικρές σχετικά απαιτήσεις σε εγκαταστάσεις παραγωγής και καλλιεργητικές φροντίδες (Zadrazil, 1978, Zervakis and Balis 1992. Poppe and Hofle, 1995). Σε βιομηχανική κλίμακα κυρίως καλλιεργούνται τα είδη *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. cystidiosus*. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια *Pleurotus* αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό της παραγωγής του *Pleurotus ostreatus* από 4% στο σύνολο της εγχώριας παραγωγής το 1988, υπερδιπλασιάστηκε και ανήλθε στο 10% το 1994. Η συνολική παραγωγή *Pleurotus* στην Ελλάδα έχει σταθεροποιηθεί τα τελευταία 40 χρόνια γύρω στους 100 τόνους ετησίως ενώ κατά το χρονικό διάστημα 1990 - 1995 το ποσοστό αύξησης παραγωγής *Pleurotus* ανέρχεται στο 43%. Αναφορικά με τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες αξίζει να σημειωθεί ότι στους μύκητες *Pleurotus* υπάρχει η ουσία εριταδενίνη, η οποία δρα ανασταλτικά κατά των καρδιοπαθειών αλλά ρυθμίζει και τη χοληστερόλη στο αίμα (Cochran, 1978).

1.5.1. Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων

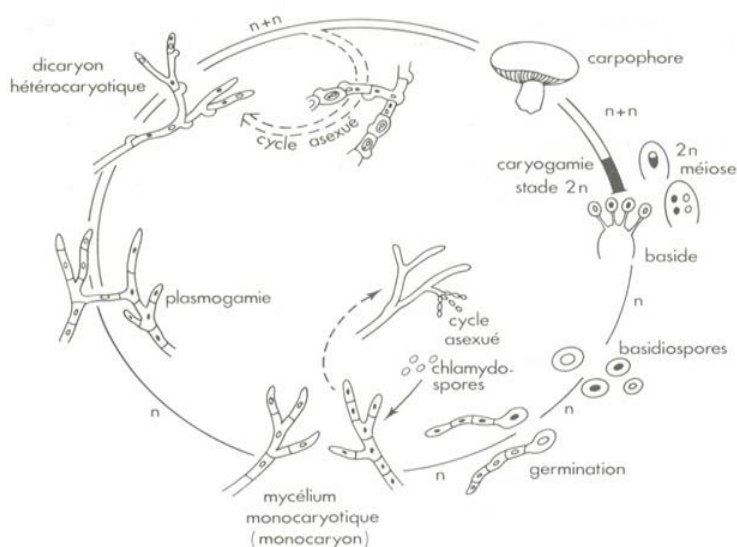
Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων παρουσιάζει πολλές παραλλαγές. Παρακάτω περιγράφεται εκείνος, ενός τυπικού βασιδιομύκητα της τάξης των Agaricales (Delmas, 1989).

Ως σημείο εκκίνησης του βιολογικού κύκλου θεωρείται το βασιδιοσπόριο το οποίο είναι μονοκύτταρο και απλοειδές (ν 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 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. Διακρύωση 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 θάνατο 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 εγκάρσιων 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 πύλο (καπέλο) και το στίπο (πόδι). Στο κάτω μέρος του πύλου, τοποθετημένα κατακόρυφα και ακτινοειδώς, γύρω από το στίπο, 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 βασιοσπόρια απλοειδή και ανά δύο αντίθετου φύλου. Όταν ωριμάσουν τα βασιοσπόρια εκτινάσσονται από τα στηρίγματά τους, διασπείρονται και όταν βρεθούν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο 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 στη ταξινόμηση.



Εικόνα 11: Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων (Delmas, 1989)

1.5.2. *Pleurotus pulmonarius*

| | |
|-------------------------------------|--|
| ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Μύκητες |  |
| ΦΥΛΟ: Basidiomycota | |
| ΚΛΑΣΗ: Agaricomycetes | |
| ΤΑΞΗ: Agaricales | |
| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Pleurotaceae | |
| ΓΕΝΟΣ: <i>Pleurotus</i> | |
| ΕΙΔΟΣ: <i>P. pulmonarius</i> | |

Εικόνα 12: Καρποφορία του μανιταριού *Pleurotus pulmonarius*

Ο *P. pulmonarius* μορφολογικά διαφοροποιείται δύσκολα από τον *P. ostreatus*, αλλά διαφέρει αρκετά για τις προτιμήσεις του στα κωνοφόρα δένδρα. Το μανιτάρι *P. pulmonarius* έχει κυρτό πύλο, έως πολύ κυρτό και τελικά επίπεδο ή ανασηκωμένο, συχνά κυματοειδές όταν είναι ώριμο. Η διάμετρός του είναι 5-20 εκατοστά ενώ η περίμετρος του είναι λεία έως κυματιστή. Ο στίπος είναι τυπικά εκφυόμενος στο κέντρο του πύλου και δεν φέρει βέλο. Η σάρκα γενικά είναι αδύνατη. Τα σπόρια είναι διαστάσεων 7,5-11 x 3-4 μ. κυλινδρικά ή όχι, λευκά έως κιτρινωπά. Το μυκήλιο είναι λευκό, γραμμικής αύξησης, βαμβακώδες με το χρόνο και τελικά μορφοποιημένο σε ένα λεπτό μυκηλιακό σύμπλεγμα. Το χρώμα ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος, το φωτισμό και τις συνθήκες θερμοκρασίας. Το μανιτάρι *P. pulmonarius* ενδημεί στη βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Τα στελέχη του διατίθενται άφθονα από τις περισσότερες βιβλιοθήκες μανιταριών και συχνά έχουν λαθεμένη ονομασία ως *P. sajor-caju*. Αυτό συμβαίνει λόγω αρχικού λάθους κατά τη ταξινόμησή του. Το πραγματικό *P. sajor-caju* συγκαταλέγεται στο γένος *Lentinus*.

Αυτό το μανιτάρι είναι ιδιαίτερα εύκολο να καλλιεργηθεί. Αποικίζει εκλεκτικά: σκλήθρα, βαμβακόξυλο, λεύκα, βελανιδιά, σφεντάμι, φτελιά και σε μερικά κωνοφόρα (ειδικά σε ελάτη και ερυθρελάτη). Για φυσική καλλιέργεια χρησιμοποιούνται και άλλα υλικά όπως σιτάρι, άχυρο ρυζιού ή βαμβακιού,

καλαμπόκι και υπολείμματα ζαχαροκάλαμου. Ο *P. pulmonarius* προσαρμόζεται σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και παράγει μανιτάρια σ' ένα πλήθος οργανικών υπολειμμάτων. Για εμπορική καλλιέργεια και μεγαλύτερες σοδειές χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά τα δημητριακά (σιτάρι, ρύζι), οι βλαστοί καλαμποκιού, τα υπολείμματα σκληρών ξύλων, ζαχαροκάλαμων, καφέ, χαρτιού βαμβακιού και διάφορα άλλα γεωργικά και δασικά προϊόντα. Η προσθήκη 20% άχυρου τριφυλλιού ή μηδικής σε άχυρο σιταριού, αυξάνει σημαντικά τη σοδειά. Τα μανιτάρια εμφανίζονται ή μεμονωμένα ή σε δυάδες ή σε τριάδες και αρκετές φορές πολύ περισσότερα. Μερικά στελέχη αυτού του μύκητα, αρκετές φορές δημιουργούν καρποφορίες σε συστάδες περισσότερων από 5 ή 6 μανιταριών. Συχνά εμφανίζονται νέα μανιτάρια όταν τα παλιά έχουν κοπεί. Αυτή την ιδιότητα γενικά δε την έχουν τα άλλα είδη *Pleurotus*. Επειδή αυτό το μανιτάρι αναπτύσσεται τόσο γρήγορα, ο χρόνος συγκομιδής επηρεάζει την ποιότητα όλης της παραγωγής, (Stamets, 1993).

Πίνακας 5: Παράμετροι ανάπτυξης του μύκητα *P. pulmonarius*. (Stamets, 1993)

| | ΕΠΩΑΣΗ | ΠΡΩΙΜΟΤΗΤΑ | ΚΑΡΠΟΦΟΡΙΑ |
|-----------------|-------------|---------------|---------------|
| ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ | 24-29°C | 10-24°C | 18-24°C |
| ΣΧΕΤ. ΥΓΡΑΣΙΑ | 90-100% | 95-100% | 85-90% |
| ΔΙΑΡΚΕΙΑ | 8-14 ημέρες | 3-5 ημέρες | 3-5 ημέρες |
| CO ₂ | >5000 ppm | 400-800 ppm | 400-800 ppm |
| ΑΛΛΑΓΕΣ ΑΕΡΑ | 1 ανά ώρα | 5-7 ανά ώρα | 5-7 ανά ώρα |
| ΦΩΣ | - | 1000-1500 lux | 1000-1500 lux |

1.5.3. 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. Λόγο των χαρακτηριστικών που προαναφέρθηκαν τα μανιτάρια αποτελούν πολύ θρεπτική τροφή και η διατροφική τους αξία έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Cheung, 2010; Kalac, 2016; Chang and Milles, 2004).

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά στην περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη, σε γενικές γραμμές το ποσοστό αυτής κυμαίνεται μεταξύ 15% έως 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 τη διατροφή του ανθρώπου αμινοξέα (ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη, φαινιλαλανίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, βαλίνη), επίσης έχουν συνήθως περιορισμένη ποσότητα θειούχων αμινοξέων όπως η μεθειονίνη κι 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 and Rimoczi (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 στο στίβο αντίστοιχα. Στην συνέχεια της ανάπτυξης, το ποσοστό της ακατέργαστης πρωτεΐνης μειώθηκε (Kalac, 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 τριγλυκερίδια, 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 στη 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 οξέος είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες ώστε να

θεωρηθούν τα μανιτάρια υγιεινό τρόφιμο με μεγάλη θρεπτική αξία (Chang and Milles, 2004; Cheung, 2013).

Η συνολική περιεκτικότητα των μανιταριών σε υδατάνθρακες εξαρτάται από το είδος του μανιταριού και κυμαίνεται από 35% έως 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 τη τρεχαζόλη και σε μικρότερες συγκεντρώσεις τη γλυκόζη, τη 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% έως 15% σε βάση ξηρού βάρους και η χιτίνη, ένας μη υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης, ο οποίος αποτελεί το 80-90% του ξηρού βάρους των κυτταρικών τοιχωμάτων (Kalac, 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->4) συνδεδεμένο πολυμερές της N-15 ακετυλο-γλυκοζαμίνης) και πολυσακχαρίτες όπως β-D(1->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 τη 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).

1.5.4. Φαρμακευτικές ιδιότητες καλλιεργούμενων μανιταριών

Πέρα από τη 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 and Weis, 1999; Lull et al., 2005). Οι ουσίες που απομονώνονται χρησιμοποιούνται για την παραγωγή

προϊόντων με τη 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, ανταμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντιβακτηριδιακές δράσεις (Schillaci, 2013; Patel et al., 2012; Breene, 1990). Επίσης ο πολυσακχαρίτης λεντινάνη, ο οποίος πήρε το όνομα του από γένος *Lentinula* στο οποίο ανήκει το μανιτάρι *Lentinula edodes*, έχει βρεθεί ότι διαθέτει πολύ σημαντικές αντιϊκές 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 et al., 2008), τοκοφερόλες και φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση (Tsai et al., 2007) καθώς και το πεπτίδιο *agrocybin* το οποίο διαθέτει αντιμυκητιακή δράση (Ngai et al., 2005).

Πίνακας 6: Φαρμακευτικές Δράσεις Βασιδιομυκήτων (Wasser and Wess, 1999)

| Θεραπευτικά αποτελέσματα /Μακρομυκήτες | Αντιμυκητιασικά | Αντιφλεγμονώδη | Αντικαρκινικά | Κοστ 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 | | | |

1.5.5. 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 et al., 1958; Reusser et al., 1958) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τρόφιμα, πρόσθετα τροφίμων ή διατροφικά συμπληρώματα (Cirillo et al., 1960; Janardhanan et al., 1970; Litchfield, 1968). Η καλλιέργεια βυθού έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ικανή να παράγει μεγάλες ποσότητες μυκηλίου σε μια σύντομη χρονικά περίοδο (Litchfield and 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 et al., 1968). Εκτός των άλλων, το τελικό

προϊόν που παραλαμβάνεται είναι και ποιοτικά ομοιόμορφο (Szuecs,1958). Στις περισσότερες έρευνες, ο σύνηθες τρόπος ανάπτυξης των μυκηλίων μακρομυκήτων σε υγρά θρεπτικά μέσα, για παραλαβή της μυκηλιακής μάζας και διαφόρων μεταβολιτών γίνεται χρησιμοποιώντας απλές πηγές άνθρακα με κυρίαρχη τη γλυκόζη (Manu-Tawiah and Martin, 1987; Gern et al., 2008; Xu et al., 2008; Diamantopoulou et al., 2012α,β, 2014, 2016). Επίσης, έχει αναφερθεί και η χρήση λακτόζης (Tang and 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 μέσα και χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα διάφορα αγρο-βιομηχανικά υποπροϊόντα, όπως η γλυκερόλη και τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου (Tsioulpas et al., 2002; Fountoulakis et al., 2002; Aggelis et al., 2003). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι οι καλλιέργειες βυθού μπορούν να δράσουν οικολογικά στο περιβάλλον μειώνοντας το απαιτούμενο βιολογικό οξυγόνο (BOD) καθώς αξιοποιούν ως θρεπτικά μέσα τα βιομηχανικά απόβλητα και τα απόβλητα που προκύπτουν κατά την παραγωγή τροφίμων (Litchfield, 1997).

Ο Zardazil (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; Zardazil, 1975, 1978; Shannon and Stevenson, 1975; Dijkstra, 1976; Diamantopoulou et al., 2012α). Οι Manu-Tawiah και Martin (1987) ανέπτυξαν το μυκήλιο του συγκεκριμένου μύκητα σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα σε αναδεδυόμενες καλλιέργειες βυθού. Το πρώτο συνθετικό θρεπτικό μέσο 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, τη τέφρα, τα αμινοξέα και τα μεταλλικά στοιχεία. Επίσης, οι Diamantopoulou et al. (2012α) ανέπτυξαν στελέχη των μακρομυκήτων *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *M. elata*, *M. esculenta*, *G. lucidum*, *G. applanatum*, *A. auricula*, *A. aegerita*, *F. velutipes*, *L. edodes* και *V. volvacea*, σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη 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. lucidum* (10,9 g/L), *A. auricula* (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 Gern et al. (2008) θέλησαν να επιλέξουν ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο 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 υπόστρωμα μέσο χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα σίτου/καλαμποκιού (10 ή 20 g/L), εκχύλισμα ζύμης (2 ή 5 g/L), θειικό 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 ανευρέθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε 20 g/L εκχύλισμα σίτου/καλαμποκιού και 40 g/L γλυκόζης.

Οι Martirani et al. (1995) ανέπτυξαν τον βασιδιομύκητα *P. ostreatus* σε υγρή καλλιέργεια από εκχύλισμα πατάτας και ζύμης, απομόνωσαν το παραχθέν ένζυμο οξειδάση και το πρόσθεσαν σε υγρά απόβλητα ελαιουργείων (έως 20%), 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 μακρομύκητας *P. ostreatus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απομονωθείσα οξειδάση μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, 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 et al. (1992) μελέτησαν τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα *P. ostreatus* σε καλλιέργειες βυθού όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας και δυο μεταβολιτών, της φαινολοξειδάσης (λιγνολυτικό ένζυμο) και της ενδογλυκανάσης (κυτταρινολυτικό ένζυμο), εξετάζοντας παράλληλα στην 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 et al. (2008) ανέπτυξαν το μακρομύκητα *Lentinula edodes* σε καλλιέργεια βυθού και παρέλαβαν ενεργά εκχυλίσματα από το μυκήλιο και το καρπόσωμά του με σκοπό να διερευνήσουν την ανασοδιεγερτική τους δράση, την κυτταροτοξικότητα τους και την παρεμποδιστική τους δράση στην ανάπτυξη διαφόρων φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, πολλοί ερευνητές έχουν αναπτύξει το μύκητα *Lentinula edodes* για την παραλαβή ενός πολύ σημαντικού πολυσακχαρίτη, της λεντινάνης, ο οποίος διαθέτει αντικαρκινική, ανασορρυθμιστική, αντιμικροβιακή και αντική δράση (Mizuno, 1995; Maeda κ.α., 1974).

Επίσης οι Maziero et al. (1999), σε καλλιέργειες βυθού διαφόρων στελεχών του *L. edodes* ανέφεραν παραγωγή βιομάζας 4,70 g/L σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης υπό ανάδευση. Ακόμη οι Lomberh et al. (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 et al., 2010). Ωστόσο, μικρότερες παραγωγές βιομάζας (5,0 g/L) σημειώθηκαν όταν ο μύκητας καλλιεργήθηκε με γεωργικά υπολείμματα σε αναδεδυόμενες φιάλες (Hasegawa et al., 2005) και σε υγρά απόβλητα ελαιουργίας (5,0 g/L) (D'Annibale et al., 2004). Επιπλέον, οι Reverberi et al. (2004) ανέφεραν αυξημένη σύνθεση της β-1-3-γλυκάνης από τον μύκητα *L. edodes* σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου (YAE). Τα YAE βρέθηκαν να είναι πολύ καλό θρεπτικό μέσο για την παραγωγή βιομάζας του *L. edodes* (Lakhtar et al., 2010) και αυτό κυρίως, λόγω του ότι είναι πλούσια σε λιπίδια (1,5% w/w), πλούσια κυρίως σε παλμιτικό και ελαϊκό οξύ, τα οποία υποκινούν την ανάπτυξη του μυκηλίου (Song et al., 1989). Οι Tomati et al. (2004) αναφέρουν επίσης ότι από τη βιομάζα του μυκηλίου του *L. edodes* που επώαστηκε σε YAE,

εκχυλίστηκαν οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και ξυλόζη σε μεγάλη ποσότητα (αναλογία 7:1), αλλά και ίχνη από ριβόζη, αραβινόζη και μαννόζη.

1.5.6. Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών μακρομυκίων

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και από το γενικό χημικό τους τύπο ($C_6H_{10}O_5)_n$ $n > 100$ 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 πολυσακχαρίτες που έχουν βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 100 καθώς η πλειοψηφία τους κυμαίνεται μεταξύ 200-300. 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 τη μορφή γλυκανών συναντάμε τους πολυσακχαρίτες των ανώτερων μυκίων. 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 7 είναι καταγεγραμμένες οι κατηγορίες πολυσακχαριτών με τις αντίστοιχες χημικές τους δομές που απομονώθηκαν από διάφορα μανιτάρια (Zhang κ.α., 2007) .

Πίνακας 7: 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> | (1→3) -α-γλυκάνη | - | - |

| | | | | | |
|----------------------|--------------------------------|--|--|------------------------|---------------------|
| | | (Kiho κ.α., 1992) | | | |
| | (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</i> <i>confluens</i> (Sugiyama κ.α., 1992) <i>Pleurotus</i> <i>pulmonarius</i> (Wasser, 2002) | γλυκάνη | ξυλόζη | - |
| | Αραβινογλυκάνη | <i>Ganoderma tsugae</i> (Wang κ.α., 1993) | γλυκάνη | αραβινόζη | - |
| | Ριβογλυκάνη | <i>Agaricus blazei</i> (Mizuno, 1992; Mizuno, 1998) <i>Flammulina velutipes</i> (Zeng, 1990) | γλυκάνη | ριβόζη | - |
| | Γαλακτομαννογλυκάνη | <i>Hohenbuehelia</i> <i>serotina</i> (Ma κ.α., 1991) <i>Leucopaxillus</i> <i>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 ετερογλοκάνες | 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 | Το πεπτίδιο αποτελείται κυρίως από ασπαρτικό και | 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 στην κατηγορία των Βασιδιομυκήτων, για τα οποία η βιβλιογραφία αναφέρει ότι περιέχουν βιολογικά ενεργούς αντικαρκινικούς και ανοσοδιεγερτικούς πολυσακχαρίτες. Συγκεκριμένα, μετά από έρευνα των

Reshetnikov et al. (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 7 γίνεται αναφορά σε ορισμένους δραστικούς αντικαρκινικούς πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από Βασιδιομύκητες με φαρμακευτικές ιδιότητες είτε από τα καρποσώματα τους είτε από καλλιέργειες βυθού (μυκηλιακή μάζα ή υγρή φάση).

Πίνακας 8: Δραστικοί αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από φαρμακευτικά μανιτάρια Βασιδιομυκήτων (Wasser and Weis, 1999)

| Είδος | Καρπόσωμα | Καλλιέργεια βυθού – μυκηλιακή μάζα | 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. volvacea</i> | VVG (β-1-3)-D-γλυκάνη, α- μαννο-β-γλυκάνη | - | - |
| <i>F. velutipes</i> | EA6, EA6-PII (β-γλυκάνη - πρωτεΐνη) | προφλαμίνη (γλυκοπρωτεΐνη) | - |
| <i>A. aegerita</i> | α-(1-3)-β-γλυκάνη | - | - |
| <i>L. edodes</i> | λεντινάνη (β-D-γλυκάνη) | KS-2-α-μαννάνη-πεπτίδιο, LEM, LAP (ετερογλυκάνη- πρωτεΐνη), EP3 | LEM, LAP (ετερογλυκάνη - πρωτεΐνη), EP3 |
| <i>G. applanatum</i> | Fl-1-B-1 (β-γλυκάνη) | F-1a-1-b (β-γλυκάνη), ετερογλυκάνες, πεπτιδογλυκάνες | - |
| <i>G. lucidum</i> | Fl-1a (β-γλυκάνη), FIII-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 οι 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 εναρμονίζεται με τις χημειοθεραπείες και τις θεραπείες με ακτινοβολία.

Αντικαρκινικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν από ανώτερους μύκητες (καρποσώματα, καλλιέργειες βυθού) είναι είτε υδατοδιαλυτές 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 8 αναφέρονται οι χημικές δομές και οι φαρμακευτικές δράσεις μερικών πολυσακχαριτών απομονωθέντων από διάφορες φυσικές πηγές (Yang and Zhang, 2009).

Πίνακας 9: Χημικές δομές και δράσεις μερικών πολυσακχαριτών απομονωθέντων από φυσικές πηγές (Yang and Zhang, 2009).

| Πολυσακχαρίτες | Χημική σύσταση | Δράσεις | Αναφορές |
|----------------------------------|--|--|---|
| Λεντινάνη | β-1, 3-D γλυκάνη που περιέχει τμήματα γλυκοπυρανοζίλης 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 | B-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 G. | (1→4) –α-D-μαννοξυλλάνη ή (1-3)-β-D-γλυκάνη για κύριο σκελετό διακλαδιζόμενο με | Αντικαρκινική, αντιική, ανοσορρυθμιστική, αντιοξειδωτική, προστασία του συκωτιού, μείωση | Bao κ.α., 2001, 2002; Eo κ.α., 2000; Kim κ.α., 2000; Lai & |

| | | | |
|--|---|---|--|
| <i>Lucidum</i> | μονο-, δι-, ολιγοσακχαρίτες, μια γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει φουκόζη ή μία όξινη πρωτεΐνη ενωμένη με πολυσακχαρίτη | των επιπέδων της γλυκόζης του ορού, αντιερπετική, αντιελκογόνη και παρεμπόδιση της υπεροξειδωσής του λίπους και της οξειδωσής- καταστροφής του DNA | 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; Yoon κ.α., 2003; Zhang & Yang, 1995; Zhang κ.α., 1995α,β, 1999γ |
| Πολυσακχαρίτης από τσάι | 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 βακτηρίων | 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 χώνευσης 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 et al. (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 (Furue et al., 1981;Taguchi et al., 1985α,β).

Τέλος, η σχιζοφυλλάνη, η οποία παράγεται από το μανιτάρι *Schizophyllum commune*, έχει δειχθεί ότι έχει κυτταροστατική δράση στο σάρκωμα 180. Επιπροσθέτως, έρευνες υποστηρίζουν ότι έχει τη δυνατότητα να παρατείνει τη διάρκεια ζωής ασθενών με καρκίνωμα στο λαιμό ή το κεφάλι (Kimura et al.,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 et al., 1995).

1.5.7. Αντιοξειδωτικές ουσίες μακρομυκήτων

Τα αντιοξειδωτικά είναι χημικές ενώσεις που παρεμποδίζουν την αντίδραση οξείδωσης των ελευθέρων ριζών, ανταλλάσσοντας ένα από τα δικά τους ηλεκτρόνια με τα μόρια της ελεύθερης ρίζας για να τα αδρανοποιήσουν. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να είναι ενδογενή και διαιτητικά αντιοξειδωτικά όπως πολυφαινόλες, βιταμίνη Α (π.χ. καροτενοειδή), βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη), β-γλυκάνη, κλπ. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι μια κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει διαφορετικές μεταξύ τους τάξεις οργανικών ενώσεων, οι οποίες έχουν ως κοινή ιδιότητα την αντιοξειδωτική τους δράση και ανευρίσκονται κυρίως σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης (Chien et al., 2011; Mau et al., 2005; Sun et al., 2004). Μεγάλος είναι ο αριθμός μανιταριών που έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες μεταξύ αυτών και τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus*. Εκχυλίσματα από μανιτάρια μπορούν να περιέχουν μια ποικιλία από συστατικά, καθένα από τα οποία είναι μοναδικό για κάθε μανιτάρι. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά ανευρίσκονται στα καρποσώματα, στο μυκήλιο και σε ζωμό υγρής καλλιέργειας τα οποία μπορεί να είναι (Chien et al., 2011; Mau et al., 2005; Sun et al., 2004):

- φαινολικά συστατικά,
- πολυσακχαρίτες,
- πεπτίδια,
- συμπλέγματα πολυσακχαριτών-πεπτιδίων,
- τοκοφερόλες,

- φλαβονοειδή,
- γλυκοσίδια,
- εργοθειονίνη και
- ασκορβικό οξύ

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες στα μανιτάρια συσχετίζονται με διάφορα αντιοξειδωτικά συστατικά, όπως τοκοφερόλες, καροτενοειδή, ασκορβικό οξύ και ολικά φαινολικά συστατικά (Barros et al., 2007; Jander-Shagug and Masaphy, 2010). Επιπλέον, τα κύρια αντιοξειδωτικά στα μανιτάρια είναι φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή), ενώ ο ρόλος των τοκοφερόλων φαίνεται να είναι περιορισμένος και της β-καροτίνης και του λυκοπενικού υπολειπόμενος (Barros et al., 2008; Kalač, 2009).

1.5.8. Φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά είναι αρωματικές υδροξυλιωμένες ενώσεις με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Σε αυτά ανήκουν τα φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκιναμικά οξέα, λιγνάνες, ταννίνες, στυλβένια και οξειδωμένες πολυφαινόλες. Έχει καταγραφεί ότι τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση στα βιολογικά συστήματα, δρώντας σαν δεσμευτές ελευθέρων ριζών. Οι συγκεκριμένες ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη ομάδα από δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από φυτά και μύκητες κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξής τους όταν αυτά βρεθούν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (θρεπτικό ή θερμοκρασιακό στρες, υπερϊώδης ακτινοβολία) (Bennett and Wallsgrove, 1994) ή ακόμη και όταν τραυματιστούν τα εξωτερικά τους κυτταρικά τοιχώματα (Robbins, 2003). Τα φαινολικά συστατικά έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορούν να δράσουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών, δότες υδρογονοκατιόντων και καταστολείς μονήρους οξυγόνου (Croft, 1999), καταστρώντας τα στις πιο σημαντικές ενώσεις των φυτών με αντιοξειδωτική δράση (Barros et al., 2008; Elmastas et al., 2006; Ferreira et al., 2009; Turkoglu et al., 2006). Τέλος, τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων συμπεριλαμβανομένων της αντιβακτηριδιακής, αντιφλεγμονώδους και

αντιπεργλυκεμικής δράσης (Liu et al., 2012). Παρατηρείται ότι το φαινολικό προφίλ των βρώσιμων μανιταριών, περιέχει γενικά τα ίδια φαινολικά συστατικά οξέα κατατάσσοντάς τα στις κύριες φαινολικές ενώσεις στα μανιτάρια, με περιεχόμενο εντός του ίδιου εύρους (Barros et al., 2008; Heleno et al., 2015; Puttaraju et al., 2006; Taofiq et al., 2015). Τα πιο συχνά απαντώμενα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος που έχουν ανευρεθεί στα μανιτάρια είναι τα: π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, γαλλικό, γεντισικό, ομογεντιστικό, βανιλλικό και συριγγικό οξύ. Η πλειοψηφία των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος που απαντώνται στα μανιτάρια είναι τα : π-κουμαρικό, ο-κουμαρικό, καφεικό, φερουλικό, σιναπικό κ.α. Πέρα από αυτά έχει αναφερθεί και η παρουσία ταννικών και ελλαγικών οξέων (Kozarski et al., 2015).

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βιολογικό Υλικό

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το εδώδιμο μανιτάρι *Pleurotus pulmonarius*, το οποίο ανήκει στην κλάση των βασιδιομυκήτων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το στέλεχος που υπάρχει στην τράπεζα καλλιεργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ με τον κωδικό AMRL 177. Οι καθαρές καλλιέργειες του είδους αυτού έχουν απομονωθεί και διατηρούνται στην τράπεζα καλλιεργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του Ι.Τ.Α.Π. (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) και φέρουν κωδικό αριθμό καταχώρησης AMRL (Athens Mushroom Research Laboratory). Το είδος διατηρείται είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με mineral oil, είτε σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) υπό μορφή εμβολίου διαμέτρου 3 mm μέσα σε αποστειρωμένο νερό στους $5\pm 0,5$ °C. Κατά την έναρξη κάθε πειράματος γινόταν ανανέωση των ειδών σε τρυβλία με PDA στους $25\pm 0,5$ °C. Συγκεκριμένα, τεμάχιο μυκηλίου από το κάθε είδος εμβολιαζόταν στο κέντρο τρυβλίων petri 90 mm με PDA (Merck, Darmstadt, Germany). Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων στους $25\pm 0,5$ °C και σε σχετική υγρασία 75%. Η ανανέωση του βασιδιομύκητα πραγματοποιείται έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι πάντα ηλικίας 7-10 ημερών.

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρού απόβλητου ελαιουργίας (ΥΑΕ)

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υγρού απόβλητου ελαιουργίας, που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα, περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2). Ο προσδιορισμός του pH έγινε με την συσκευή Jenway 3020 pH meter (Essex, UK). Ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS; Miller, 1959). Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ ο προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) πραγματοποιήθηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης και τέλος ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Kjeldahl. Οι παραπάνω μέθοδοι θα αναλυθούν στα επόμενα εδάφια.

Πίνακας 10: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υγρού απόβλητου ελαιουργίας που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

| Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ΥΑΕ | |
|---------------------------------|-------------|
| Ολικά Σάκχαρα | 30 g/L |
| Φαινολικές ενώσεις | 11,5 g/L |
| Ελεύθερες αμινομάδες | 70,5 mg/L |
| Πρωτεΐνες | 0,5 g/L |
| pH | 4,95 |
| Αγωγιμότητα | 13,86 mS/cm |

2.3 Πειράματα ζυμώσεων βυθού σε φιάλες

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε το στέλεχος του εδώδιμου μύκητα *P. pulmonarius*, AMRL 177, ως προς την κινητική παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, καθώς και ως προς την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού, σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ΥΑΕ (υγρό απόβλητο ελαιουργείου), σε καλλιέργειες βυθού κλειστού τύπου οι οποίες δεν αναδεύονταν.

Πρώτα, έγινε επεξεργασία του αποβλήτου ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά του συστατικά. Το απόβλητο προέρχονταν από ελαιοτριβείο στην Αιτωλοακαρνανία (Μεσολόγγι) και διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Η

απόψυξη γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου από το προηγούμενο βράδυ της επεξεργασίας. Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Φυγοκέντριση στις 2800 στροφές για 20 λεπτά στους 5 °C (Hettich Zentrifugen Mikro 22R)
- Παραλαβή υπερκειμένου και διήθηση με απλό διηθητικό χαρτί με τη βοήθεια αντλίας κενού.

Αρχικά, παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό μέσο με σύσταση όπως αυτή που περιγράφεται στον Πίνακα 11 και προσθήκη ΥΑΕ σε αναλογίες 10%, 20%, 30% (v/v), με σκοπό τα θρεπτικά αυτά μέσα να περιέχουν φαινολικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις 1 g/L, 2 g/L και 3 g/L. Για την αποφυγή αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών συστατικών του θρεπτικού υλικού κατά την αποστείρωση, ετοιμάστηκαν σε απιονισμένο νερό, τα οχτώ διαλύματα της εμπορικής γλυκόζης όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11**, το ρυθμιστικό διάλυμα του φωσφορικού οξέος και τέλος τα διαλύματα που περιείχαν τις πηγές αζώτου, τα υπόλοιπα μακροστοιχεία και τα ιχνοστοιχεία. Για κάθε επέμβαση διαφορετικού υποστρώματος έγιναν 3 επαναλήψεις (κωνικές). 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 ασηπτικά με το στέλεχος του μύκητα *Pleurotus pulmonarius* που υπάρχει στην τράπεζα καλλιέργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ με τον κωδικό AMRL 177 σε θάλαμο νηματικής ροής. Το εμβόλιο του μύκητα παραλήφθηκε από το τρυβλίο με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα διαμέτρου 9 mm ώστε όλα τα εμβόλια να έχουν το ίδιο μέγεθος. Τα εμβόλια των μυκήτων ελήφθησαν από προϋπάρχουσες, νεαρής ηλικίας, καθαρές καλλιέργειες. Τέλος οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 26 ± 1 °C.

Πίνακας 11: Η σύσταση των οχτώ διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L εμπορικής γλυκόζης και Υγρού Αποβλήτου Ελαιουργίας (ΥΑΕ; 0, 10, 20, 30 % v/v).

| ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟΥ /ΥΑΕ | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΣΕ (g/L) | | | | | | | |
|---|--------------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | 0% v/v | | 10% v/v | | 20% v/v | | 30% v/v | |
| | Εμπορική Γλυκόζη | 40 | 60 | 37 | 57 | 34 | 54 | 31 |
| Εκχύλισμα ζύμης | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |

2.4 Χημικές αναλύσεις

2.4.1 Συλλογή βιομάζας

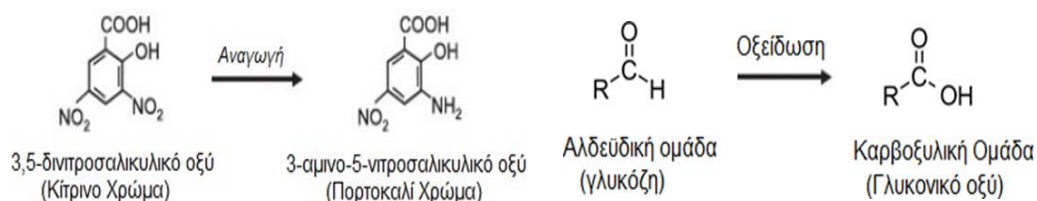
Η βιομάζα συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση υπό κενό και με τη χρήση φίλτρων (Whatman No2, Kent, England). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια τύπου MacCartey, καταγράφηκε το νωπό βάρος της βιομάζας με ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB, Darmstadt, Germany). Μετά τη συλλογή βιομάζας ακολούθησε ξήρανση. Η προ ζυγισμένη νωπή βιομάζα τοποθετήθηκε για 48 ώρες στον ξηραντήρα (Elvem, Ελλάδα). Μετά καταγράφηκε το ξηρό πλέον βάρος της βιομάζας στο ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

2.4.2 Προσδιορισμός pH

Η μέτρηση του pH και της αγωγιμότητας έγινε καθόλη την διάρκεια της καλλιέργειας, αμέσως μετά από την εκάστοτε παραλαβή της μυκηλιακής βιομάζας. Ο προσδιορισμός του pH έγινε με την συσκευή Jenway, 3020 pH meter (Essex, UK) και ο προσδιορισμός της αγωγιμότητας έγινε με την συσκευή Jenway, 4010 Conductivity meter (Essex, UK).

2.4.3 Προσδιορισμός αναγόντων 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). Ως ανάγοντα σάκχαρα, χαρακτηρίζονται τα σάκχαρα που εμφανίζουν μια ελεύθερη ημιακεταλική ομάδα στο ανωμερικό άτομο άνθρακα (σε προβολές σακχάρων κατά Haworth) (Kuszmans, 2006). Η γλυκόζη είναι ένα ανάγον που υπάρχει μέσα στο υδρόλυμα μας και αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα. Η αλδεϋδική ομάδα της γλυκόζης ανάγει το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ προς 3-αμινο-5- νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία καυστικού νατρίου, με βάση την ακόλουθη αντίδραση. Ταυτόχρονα έχουμε οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ, όπως δίδεται στην κάτωθι αντίδραση (Kuszmans, 2006). Το διάλυμα του 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξέος φέρει κίτρινο χρώμα, ενώ στο τέλος της αντίδρασης (Kuszmans, 2006) το σχηματιζόμενο 3-αμινο-5- νιτροσαλικυλικό οξύ δίνει πορτοκαλί χρώμα στο διάλυμα. Διαφορετικές εντάσεις πορτοκαλί χρώματος δύναται να παρατηρηθούν στο τέλος της αντίδρασης, ανάλογα με την συγκέντρωση και το είδος του αναγόντος σακχάρου που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Επομένως, είναι απαραίτητο να δημιουργηθούν καμπύλες αναφοράς με πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης από το ανάγον σάκχαρο που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε. Ο σχηματισμός του 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικού οξέος στο τέλος της αντίδρασης, επηρεάζει καθοριστικά την απορρόφηση του διαλύματος κατά την φωτομέτρηση. Η μετρούμενη απορρόφηση από το φωτόμετρο, σε μήκος κύματος 540 nm είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναγόντος σακχάρου (Miller, 1959).



Προετοιμασία αντιδραστήριου DNS

Σε 500 mL απιονισμένου νερού προσθέτουμε 200 mL καυστικού νατρίου (2N) και εφαρμόζουμε ήπια θέρμανση στο διάλυμα. Ακολούθως, διαλύουμε αργά 10g

3,5- δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS). Έπειτα, προσθέτουμε αργά 300 g Τρυγικό καλιονάτριο και συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 mL, με την βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου. Στο τέλος το αντιδραστήριο DNS που παρασκευάσαμε, συλλέγεται σε σκούρο γυάλινο περιέκτη (Miller, 1959).

Εφαρμογή μεθόδου

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με 0,5 mL δείγμα, προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα (Vortex). Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος (μάρτυρα) ακολουθούμε ακριβώς την ίδια διαδικασία, όμως αντί για δείγμα χρησιμοποιούμε 0.5 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθως, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο (100 °C) για 5 min ακριβώς και αμέσως μετά ψύχονται σε λεκάνη με πάγο και νερό H₂O (20 °C) για 2 min. Έπειτα, προστίθενται 5 mL απιονισμένο H₂O σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολουθεί ανάδευση(Vortex) και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm, με κυψελίδα των 2 mL.

Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer, είναι φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση $y = 1,7282x$ όπου y η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων σε (g/L) και x η τιμή της απορρόφησης.

2.4.4 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) εφαρμόζεται ευρέως για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων. Η πορεία της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου (οξείδωση) από ένα φαινολικό ανιόν οπότε παράγεται μια ελεύθερη ρίζα ημικινόνης. Η απομάκρυνση ενός δεύτερου ηλεκτρονίου από ορθο- ή παρα-διφαινόλη παράγει μια κινόνη. Το μόριο που δέχεται κάθε φορά το ηλεκτρόνιο ανάγεται. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται είναι πολύ δραστικές ενώσεις και μπορούν να αντιδράσουν με μια άλλη ελεύθερη ρίζα από οποιαδήποτε πηγή (του ίδιου τύπου ή π.χ. από λιποειδή, κλπ.), για να σχηματίσουν ένα νέο ομοιοπολικό δεσμό, που τερματίζει οποιαδήποτε αλυσιδωτή αντίδραση. Το ελεύθερο ηλεκτρόνιο σε μια ημικινόνη μπορεί να εντοπιστεί μεταξύ του πρώην υδροξυλίου και των θέσεων ορθο- και πάρα-σε αυτό (θέση δύο, τέσσερα ή έξι του δακτυλίου). Έτσι δημιουργείται ένα μίγμα διμερισμένων προϊόντων. Εάν ο νέος δεσμός εντοπίζεται σε έναν από τους άνθρακες

του δακτυλίου, το φαινολικό ιόν αναδημιουργείται. Η οξειδωση μπορεί στη συνέχεια όχι μόνο να επαναληφθεί αλλά η νέα φαινόλη συχνά οξειδώνεται πιο εύκολα από την αρχική. Στις περιπτώσεις που η ποσοτικοποίηση των φαινολών στηρίζεται στην ιδιότητα της οξειδωσιμότητάς τους, θα πρέπει η μέτρηση να γίνεται γρήγορα ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο πολυμερισμός τους. Ο σημαντικός ρόλος της παρουσίας φαινολικού ανιόντος φαίνεται από το γεγονός ότι η πρόσληψη του οξυγόνου από τις φαινόλες μπορεί να ολοκληρωθεί γρήγορα, κοντά ή πάνω από την pK της φαινόλης (συνήθως κοντά σε pH 10) και γι αυτό, οι αντιδράσεις προσδιορισμού τους λαμβάνουν χώρα σε αλκαλικό pH (Singleton and Rossi 1965). Βασίζεται στην οξειδωση των φαινολικών σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος (μέθοδος Folin-Ciocalteu) (Waterman et al., 1994). Τα ολικά φαινολικά συστατικά συστατικά προσδιορίζονται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου υπεριώδους – ορατού (UV-vis), με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm.

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 $y = 2,1423x + 0,0289$, όπου y η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων σε (g/L) και x η τιμή της απορρόφησης.

2.4.5 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.

2.4.6 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, FreeAminoNitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος 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 $4 (\pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Αντιδραστήριο αραιώσης (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 $4 (\pm 0,5)^\circ\text{C}$.

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 $4 (\pm 0,5)^\circ\text{C}$.

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 δοκιμαστικούς 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 αραίωσης 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 $y=0,185x-0,2371$, όπου y η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων σε g/L και x η τιμή της απορρόφησης.

2.4.7. Προσδιορισμός ολικού αζώτου

Η μέτρηση του ολικού αζώτου κατά Kjeldahl (Total Kjeldahl Nitrogen, TKN) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της απόσταξης και εκφράζει το άθροισμα του οργανικού και του αμμωνιακού αζώτου ενός δείγματος (APHA AWWA, 1998). Το υπό εξέταση δείγμα θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία με περίσσεια πυκνού θειικού οξέος παρουσία καταλύτη, όπου το οργανικό άζωτο και η ελεύθερη αμμωνία μετατρέπονται σε αμμωνιακό άλας (NH_4HSO_4), αφού προηγηθεί χώνευση του οργανικού υλικού. Από το όξινο θειικό αμμώνιο που σχηματίζεται, ελευθερώνεται αμμωνία, σε αλκαλικό περιβάλλον, η οποία αποστάζεται και κατακρατείται από διάλυμα δείκτη βορικού οξέος και στη συνέχεια προσδιορίζεται με τιτλοδότηση χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα υδροχλωρίου. Από τη συγκέντρωσή της υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε οργανικώς δεσμευμένο άζωτο (APHA AWWA, 1998).

Για τη χώνευση του δείγματος τοποθετείται 1 g ξηρού δείγματος, 0,5-1 g καταλύτη kjeldahl και 25 mL H_2SO_4 . Οι σωλήνες kjeldahl τοποθετούνται στη συσκευή χώνευσης, όπου θερμαίνονται για 3 ώρες στους $400 \pm 0,5$ °C. Μετά το τέλος της χώνευσης προστίθενται 50 mL απιονισμένο H_2O , σταγόνες δείκτη ερυθρού του μεθυλίου και 6N διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (μέχρι την αλλαγή χρώματος του υγρού) για την ανύψωση της τιμής του pH και ακολουθεί η απόσταξη, η οποία διαρκεί 5 λεπτά. Το προϊόν της απόσταξης συλλέγεται σε κωνική φιάλη 250 mL που περιέχει 50 mL διαλύματος βορικού οξέος 4% και προστίθενται 2-4 σταγόνες δείκτη ερυθρού του μεθυλίου. Τέλος, ακολουθεί η τιτλοδότηση του δείγματος, με διάλυμα 0,1 N HCl, με τη χρήση προχοΐδας μέχρι ο δείκτης να αποκτήσει κόκκινο χρωματισμό. Το ολικό άζωτο υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$\% \text{Nολ} = (\text{κατανάλωση HCl στο δείγμα} - \text{κατανάλωση HCl στο τυφλό}) \times 0,1 \times 1,4007 / \text{βάρος δείγματος}$

Παρασκευή αντιδραστηρίων: Διάλυμα δείκτη βορικού οξέος: 40 g βορικού οξέος διαλύονται σε 1000 mL απιονισμένου νερού. Δείκτης Tashiro: 0,01 g ερυθρού του μεθυλίου, 0,02 g κυανού βρωμοθυμόλης και 0,06 g πράσινο βρωμοκρεσόλης διαλύονται σε 100 mL αιθυλικής αλκοόλης.

Υπολογισμός ολικής πρωτεΐνης (%): $TKN \times 6,25$.

2.4.8. 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 ± 1 °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.

2.4.9. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

Στη παρούσα εργασία η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του *P. Pulmonarius* και αξιολογήθηκε σε ότι αφορά την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•]. Η διαδικασία της μεθόδου στηρίχτηκε σε αυτήν που περιγράφεται από τους Bondet et al. (1997) τους Molyneux et al. (2004) και από τους Musa et al. (2013) με μικρές τροποποιήσεις.

Η ελεύθερη ρίζα DPPH[•] είναι ένα μία από τις λίγες σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου, η οποία φέρει ένα βαθύ μωβ χρώμα. Διατίθεται εμπορικά και δε χρειάζεται να δημιουργηθεί πριν από τη δοκιμή όπως η ρίζα ABTS[•]. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγικής δράσης των αντιοξειδωτικών προς τη ρίζα DPPH[•]. Η ικανότητα αυτή μπορεί να αξιολογηθεί με μέτρηση της μείωσης της απορρόφησης, φασματοφωτομετρικά. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή είχε πρωτίστως αναφερθεί από τους Brand-Williams et al. (1997). Η αντιοξειδωτική δοκιμή βασίζεται στη μέτρηση της απώλειας του μωβ χρώματος της DPPH[•] στα 515 nm μετά από αντίδραση με μια αντιοξειδωτική ένωση-δότη υδρογόνου (AH) και παραγωγή της

ανηγμένης μορφή της ρίζας (DPPH-H) και μιας νέας ελεύθερης ρίζας A[•]. Η ταυτόχρονη μείωση της απορρόφησης παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά (Ronald et al., 2005). Η προκύπτουσα ρίζα A[•] είναι λιγότερο ενεργή και υπό αυτήν τη μορφή μπορεί να αναγεννηθεί και να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση (Natella et al., 1999).

Παρασκευή αντιδραστηρίου

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH 60 μM ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Σε 1 l MeOH προστίθενται 27,84 mg αντιδραστηρίου και αναδεύονται μέχρι το διάλυμα να ομογενοποιηθεί πλήρως. Το σκεύος είναι τυλιγμένο μέχρι πάνω με αλουμινόχαρτο γιατί πρόκειται για ένα φωτοξείδωτο διάλυμα. Το αντιδραστήριο έχει έντονο μοβ χρώμα και πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια μέρα και υπό συνθήκες σκότους.

Εφαρμογή της μεθόδου

Ποσότητα 5 μl εκχυλίσματος τοποθετείται στην μικροπλάκα και ακολούθως προστίθενται 245 μl αντιδραστηρίου DPPH με παράλληλη ανάδευση με χρήση πιπέτας. Στην συνέχεια, τα μείγματα αφήνονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συνθήκες σκότους. Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης σε όλες τις θέσεις της μικροπλάκας στα 490 nm στον αναγνώστη μικροπλάκας (Infinite M1000 PRO, Tecan, Italy) με προηγούμενη επιλογή του κατάλληλου προγράμματος ανάγνωσης. Επιπλέον, μία θέση πληρώνεται με 250 μl αντιδραστήριο DPPH για να υπολογιστεί η απορρόφησή του (~0,700) ώστε να προκύψουν στην συνέχεια λογικές απορροφήσεις.

Επειδή οι αντιοξειδωτικές μέθοδοι έχουν αρνητικό αποτέλεσμα, δηλαδή υπολογίζεται κατά πόσο μπορεί να εξουδετερωθεί η βάση του DPPH από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, αφαιρείται από το τυφλό ο μέσος όρος των απορροφήσεων του δείγματος, για να υπολογιστεί η απορρόφηση του αντιοξειδωτικού. Οπτικά αυτό φαίνεται κατά πόσο μπορεί να αποχρωματίσει το διάλυμα από μωβ σε διάφανο. Τέλος, η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox σύμφωνα με την εξίσωση $y=0,2575x+0,1511$, όπου y η τιμή της απορρόφησης και x η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών σε (g/L).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κινητική παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης

Ο μακρομύκητας *P. pulmonarius* καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων (**Πίνακας 12**), έχοντας έτσι την ζύμωση ΥΠ1Α και ΥΠ2Α με 40 g/L και 60 g/L αντίστοιχα (μάρτυρες). Επίσης σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης έγινε προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 10% v/v, 20% v/v και 30% v/v με σκοπό να έχουμε θρεπτικά μέσα με τελικές φαινολικές ενώσεις 1 g/L, 2 g/L και 3 g/L, έχοντας έτσι τις ζυμώσεις ΥΠ1Β, ΥΠ1Γ και ΥΠ1Δ να έχουν 40 g/L γλυκόζη και 1g/L, 2 g/L και 3 g/L φαινολικές ενώσεις, ομοίως οι ζυμώσεις ΥΠ2Β, ΥΠ2Γ και ΥΠ2Δ με 60 g/L γλυκόζη και 1 g/L, 2 g/L και 3 g/L φαινολικές ενώσεις.

Πίνακας 12: Σχεδιασμός πειραμάτων και παρουσίαση της σύστασης των θρεπτικών μέσων με τις συγκεντρώσεις γλυκόζης 40 g/L και 60 g/L και φαινολικών ουσιών 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L και 3 g/L (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

| | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ | | | |
|--------|------------------------|-------|-------|-------|
| | 0 g/l | 1 g/l | 2 g/l | 3 g/l |
| 40 g/l | ΥΠ 1Α | ΥΠ 1Β | ΥΠ 1Γ | ΥΠ 1Δ |
| 60 g/l | ΥΠ 2Α | ΥΠ 2Β | ΥΠ 2Γ | ΥΠ 2Δ |

Οι καλλιέργειες ήταν κλειστού τύπου και σε μη αναδεδυόμενη (στατική) κατάσταση σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C, με διάρκεια 43 ημέρες. σε επτά επιλεγμένα σημεία έγινε προσδιορισμός κατά την διάρκεια της ζύμωσης: της παραγόμενης βιομάζας (X, g/L), της εναπομείνουσας ποσότητας γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο (S, g/L), των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L) καθώς και την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων τόσο στο θρεπτικό μέσο, όσο και στη παραγόμενη βιομάζα. Τέλος μετρήθηκε η ικανότητα του μακρομύκητα στον αποχρωματισμό του ΥΑΕ στα οχτώ θρεπτικά μέσα, η παραγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων. Επιπλέον, γινόταν μέτρηση του pH και η αγωγιμότητα του θρεπτικού μέσου.

Στον παρακάτω **Πίνακα 13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας (X , g/L), ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L; % w/w), την αντίστοιχη εναπομείνουσα γλυκόζη (TS_{cons}) και την επίδραση του περιεχόμενου ΥΑΕ (%) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 13**), για κάθε ένα από τα υπό μελέτη θρεπτικά μέσα. Επίσης στον ίδιο **Πίνακα 13** ο συντελεστής απόδοσης $Y_{x/s}$ (g/g) παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα.

Πίνακας 13: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης γλυκόζης και συντελεστή απόδοσης του *P. pulmonarius* σε στατικές καλλιέργειες με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 40 και 60 g/L μετά από προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30%) για 43 ημέρες στους 26 (± 1) °C.

| <i>P. pulmonarius</i> | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------|-----------|-------|---------|--------------|-----------|-------------|-----------------|
| Θρεπτικό μέσο | | | Ημέρα | X (g/L) | TScons (g/L) | IPS (g/L) | IPS (% w/w) | $Y_{x/s}$, g/g |
| Συγκέντρωση Φαινολικών Ενώσεων | Συγκέντρωση Γλυκόζης | | | | | | | |
| 0 g/L | 40 g/L ΥΠ1Α | β,γ,ε | 37 | 14,44 | 17,86 | 3,25 | 22,51 | 0,80 |
| | | α,ε | 43 | 14,53 | 18,83 | 2,08 | 14,34 | 0,77 |
| | 60 g/L ΥΠ2Α | α,β,γ,δ,ε | 43 | 19,62 | 30,09 | 4,01 | 20,41 | 0,65 |
| 1 g/L | 40 g/L ΥΠ1Β | β,γ | 37 | 19,51 | 24,84 | 3,92 | 20,08 | 0,78 |
| | | α | 43 | 22,66 | 29,22 | 2,83 | 12,79 | 0,77 |
| | 60 g/L ΥΠ2Β | β,γ,δ,ε | 29 | 21,73 | 27,41 | 4,03 | 18,55 | 0,79 |
| | | α | 43 | 24,39 | 31,35 | 3,44 | 14,09 | 0,77 |
| 2 g/L | 40 g/L ΥΠ1Γ | β,γ,δ,ε | 37 | 24,86 | 31,59 | 4,32 | 17,39 | 0,78 |
| | | α | 43 | 25,11 | 32,53 | 3,10 | 12,35 | 0,77 |
| | 60 g/L ΥΠ2Γ | α,β,γ,δ,ε | 43 | 29,82 | 41,65 | 4,38 | 14,70 | 0,71 |
| 3 g/L | 40 g/L ΥΠ1Δ | α,β,γ,δ,ε | 43 | 30,61 | 34,69 | 4,30 | 14,04 | 0,88 |
| | 60 g/L ΥΠ2Δ | α,β,γ,δ,ε | 43 | 32,76 | 42,07 | 3,63 | 11,01 | 0,77 |

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

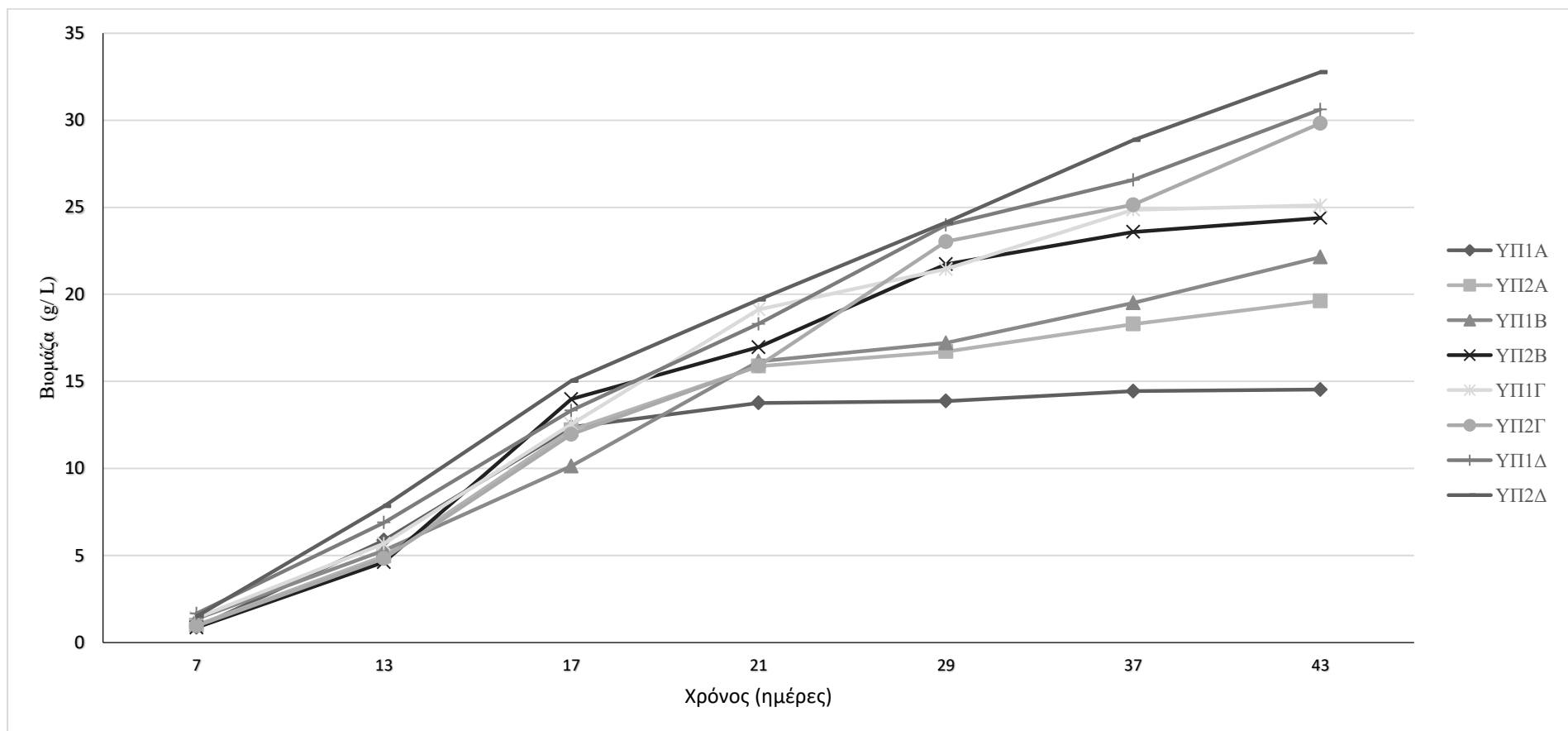
β: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο εναπομείνουσα γλυκόζη στο υπόστρωμα (TS_{cons})

γ: Τιμές που αντιστοιχούν στην μέγιστη ποσότητα παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L)

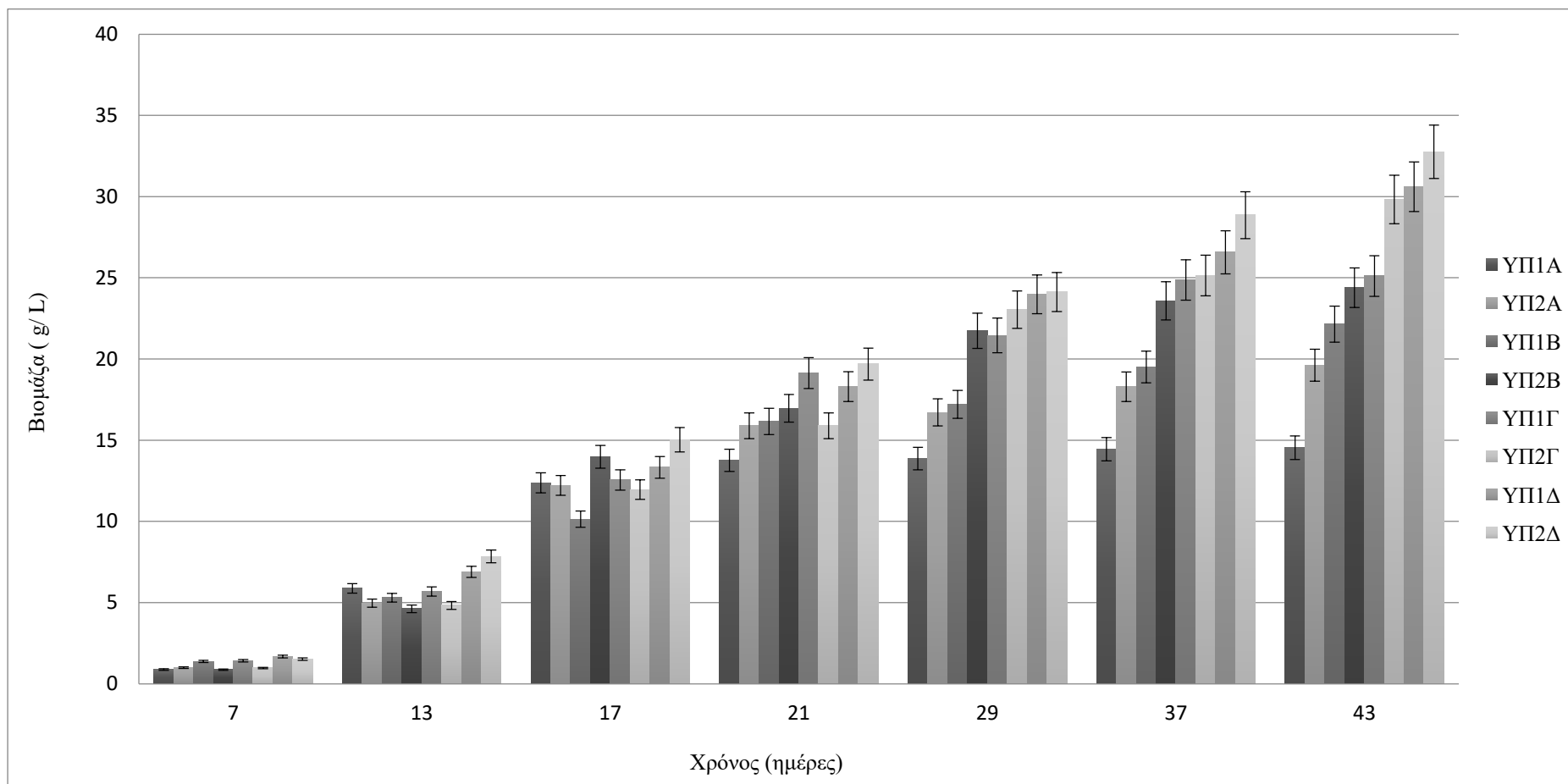
δ: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας IPS (% w/w)

ε: Τιμές που αντιστοιχούν στην μέγιστη απόδοση παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{x/s}$.

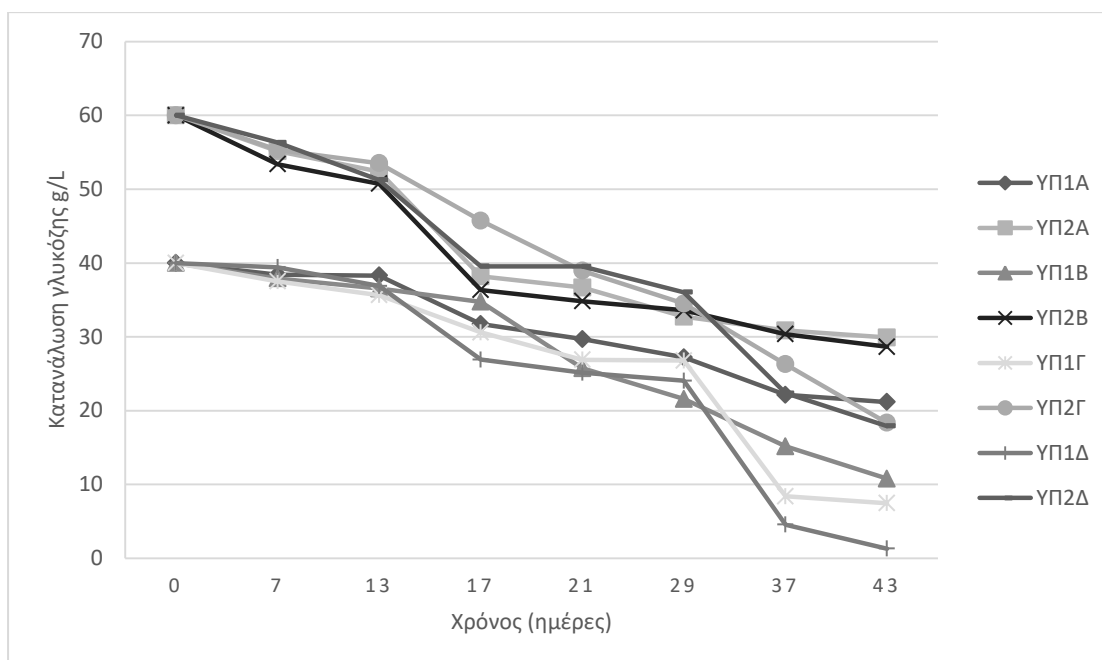
Σύμφωνα με τον **Πίνακα 13** για το στέλεχος *P. pulmonarius* η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (32,76 g/L) παρατηρήθηκε την 43^η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 30% ΥΑΕ (ΥΠ2Δ), η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (4,38 g/L) ομοίως, σημειώθηκε την 43^η ημέρα στο θρεπτικό μέσο με 20% ΥΑΕ (ΥΠ2Γ). Όσον αφορά στο pH, κυμάνθηκε για το συγκεκριμένο στέλεχος από 2,48 έως 5,71. Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του ΥΑΕ επίδρασε θετικά στην παραγωγή βιομάζας. Στη συνέχεια, ακολουθούν Διαγράμματα που παρουσιάζουν την κινητική παραγωγή βιομάζας και κατανάλωσης γλυκόζης στα 8 διαφορετικά θρεπτικά μέσα.



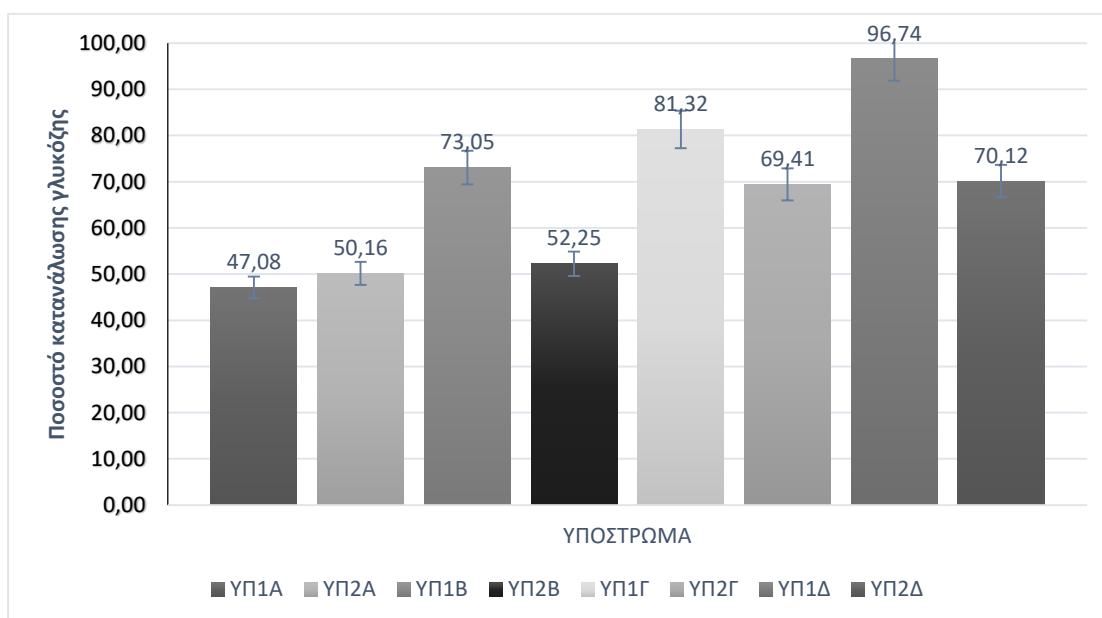
Διάγραμμα 1: Κινητική Παραγωγής Βιομάζας (g/L) συναρτήσει του χρόνου του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0,10,20,30 % v/v φαινολικά συστατικά (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).



Διάγραμμα 2: Παραγωγή Βιομάζας g/L συναρτήσεως του χρόνου του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (\pm 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0,10,20,30 % v/v φαινολικά συστατικά (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά)



Διάγραμμα 3: Κινητική Κατανάλωσης γλυκόζης (g/L) συναρτήσει του χρόνου του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδόμενες καλλιέργειες στους 26 (\pm 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0,10,20,30 % v/v φαινολικά συστατικά (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).



Διάγραμμα 4: Ποσοστό Κατανάλωσης (%) γλυκόζης στο τέλος της ζύμωσης του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδόμενες καλλιέργειες στους 26 (\pm 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ 0, 10, 20, 30 % v/v φαινολικά συστατικά (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

Με βάση, το παραπάνω **Διάγραμμα 3**, καθίσταται σαφές ό,τι η προσθήκη ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, είχε θετική επίδραση καθώς οι τιμές της κυμάνθηκαν από 22 έως 30 g/L στην παραγόμενη βιομάζας, καθώς στα θρεπτικά μέσα με 10% v/v, 20% v/v και 30% v/v ΥΑΕ οι μέγιστες τιμές ήταν 22,14 g/L και 24,39 g/L (ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη), 24,39 g/L και 29,82 g/L (ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη), 30,61 g/L και 32,76 g/L (ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη) αντίστοιχα. Ενώ, στο θρεπτικό μέσο, στο οποίο δεν έγινε προσθήκη ΥΑΕ, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν μικρότερη 14,53 g/L και 19,62 g/L (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη).

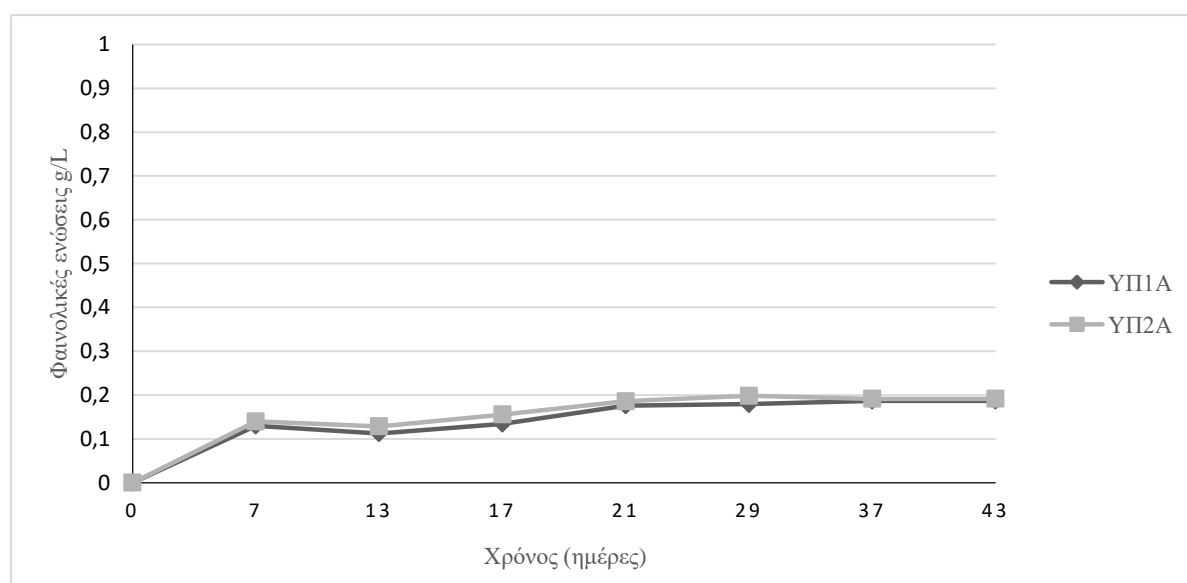
Στα θρεπτικά μέσα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (40 g/L) παρατηρήθηκε ό,τι στο ΥΠ1Δ (3g/L φαινολικά συστατικά) υπήρξε η μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης (38,69 g/L) ενώ ακολουθεί το ΥΠ1Γ (2 g/L φαινολικά συστατικά) με κατανάλωση 32,53 g/L. Η μικρότερη κατανάλωση παρουσιάστηκε στο ΥΠ1Α (μάρτυρας) με 18,84 g/L. Στα θρεπτικά μέσα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (60 g/L) παρατηρήθηκε στο θρεπτικό μέσο ΥΠ2Δ (3g/L φαινολικά συστατικά) η μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης (42,10 g/L) και ακολουθεί το ΥΠ2Γ (2 g/L φαινολικά συστατικά) με κατανάλωση 41,65 g/L. Το ΥΠ2Β (1 g/L φαινολικά συστατικά) με κατανάλωση 31,35 g/L και το ΥΠ2Α (μάρτυρας) με σχεδόν την ίδια κατανάλωση 30,10 g/L. Από όλα τα παραπάνω θρεπτικά μέσα και σύμφωνα με το **Διάγραμμα 4** όπου εκφράστηκε σε ποσοστό κατανάλωσης με σκοπό την σύγκριση των διαφορετικών υποστρωμάτων σε αυτό που καταναλώθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης είναι στα ΥΠ1Δ(3g/L φαινολικά συστατικά και 40 g/L) και ΥΠ1Γ (2g/L φαινολικά συστατικά και 40 g/L) με ποσοστό κατανάλωσης 96,74% και 81,32 % αντίστοιχα. Γενικά σε όλα τα υποστρώματα καταναλώθηκε πάνω το 47% της συνολικής γλυκόζης του υποστρώματος.

3.2. Κατανάλωση φαινολικών και αποχρωματισμός στο θρεπτικό μέσο όπου είχε γίνει προσθήκη ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας

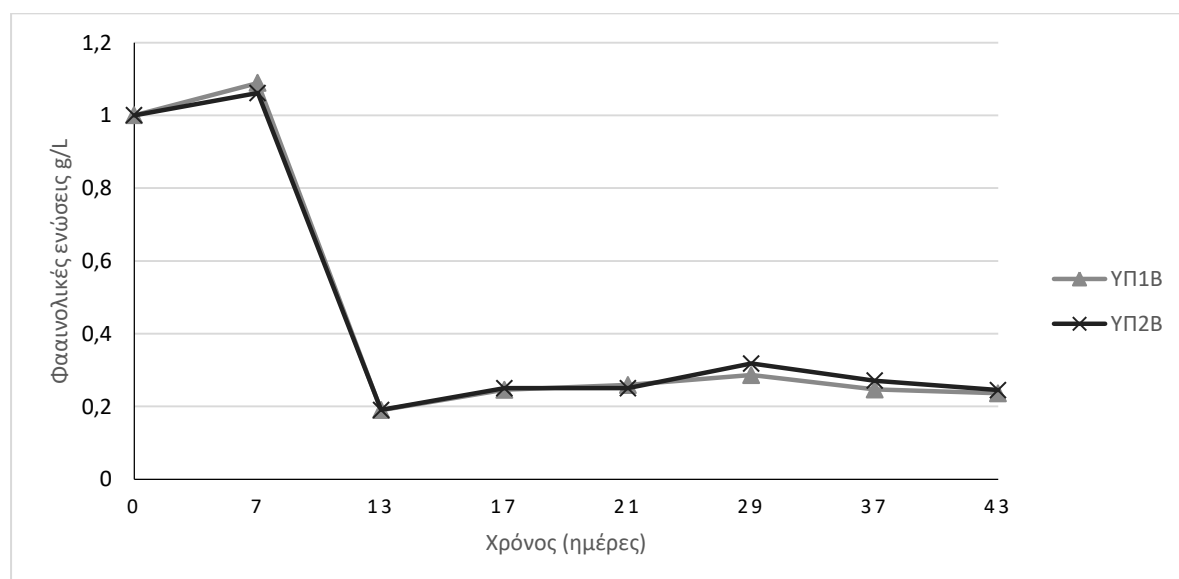
Κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *P. pulmonarius* γινόταν παραλαβή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας με σκοπό τον προσδιορισμό της μείωσης των φαινολικών ενώσεων και του αποχρωματισμού στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας

στο οποίο είχε προηγηθεί προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 10% v/v, 20% v/v και 30% v/v.

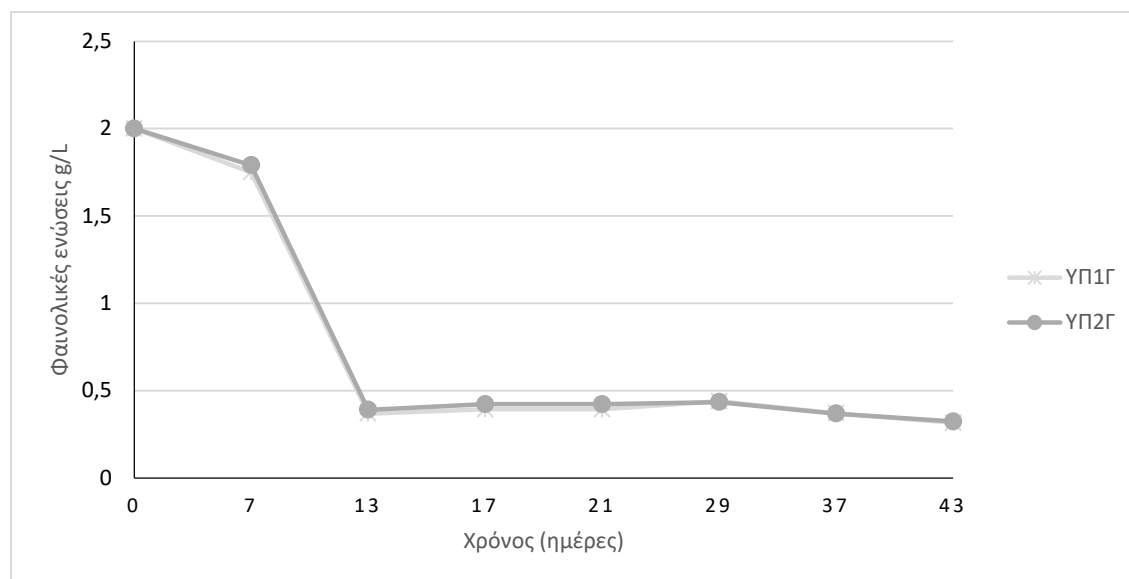
Στη συνέχεια παρατίθενται τα **Διαγράμματα 5-9** που παρουσιάζουν την μείωση του φαινολικού φορτίου και τα % ποσοστά αποχρωματισμού του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μετά το τέλος της ζύμωσης με τα ΥΑΕ, για κάθε θρεπτικό μέσο χωριστά καθώς και συνολικά για όλα τα θρεπτικά μέσα.



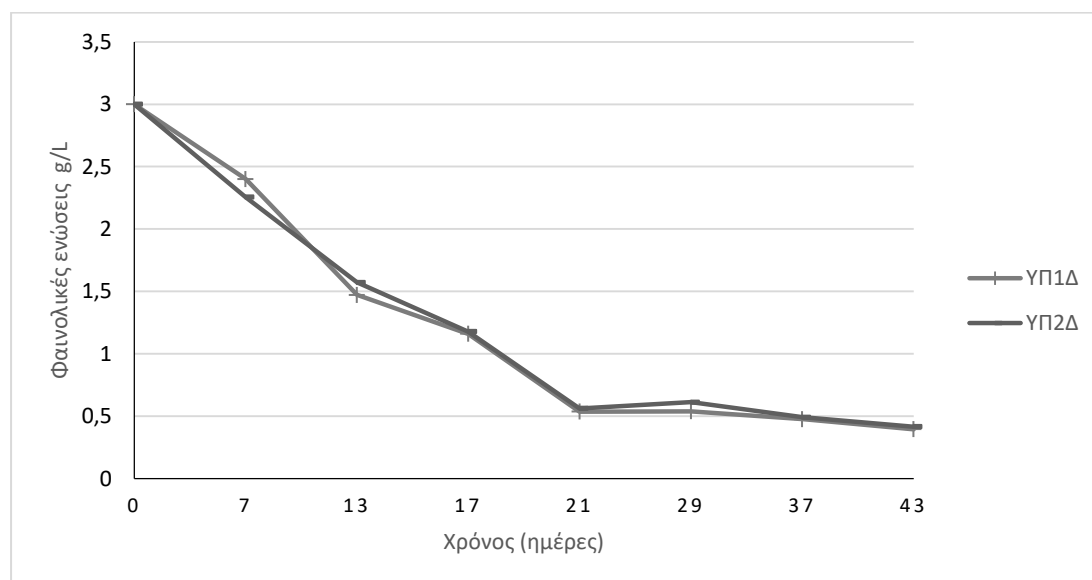
Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση Ολικών φαινολικών (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. putnomanarius* AMRL 177 στους 26 (\pm 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L (YΠ1A-40 g/L γλυκόζη, YΠ2A-60 g/L γλυκόζη).



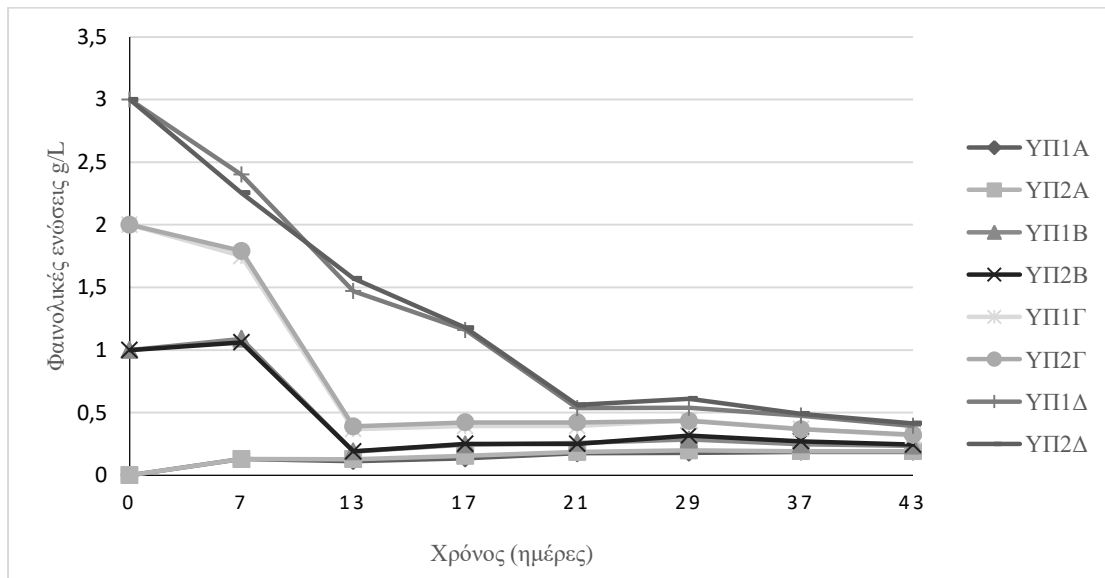
Διάγραμμα 6: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελεχούς *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L (ΥΠ1B) και 60 g/L (ΥΠ2B) και προσθήκη ΥΑΕ (10% v/v).



Διάγραμμα 7: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελεχούς *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L (ΥΠ1Γ) και 60 g/L (ΥΠ2Γ) και προσθήκη ΥΑΕ (20% v/v).



Διάγραμμα 8: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (± 1) °C του στελεχούς *P. pulmonarius* AMRL 177 με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L (ΥΠ1Δ) και 60 g/L (ΥΠ2Δ) και προσθήκη ΥΑΕ (30% v/v).

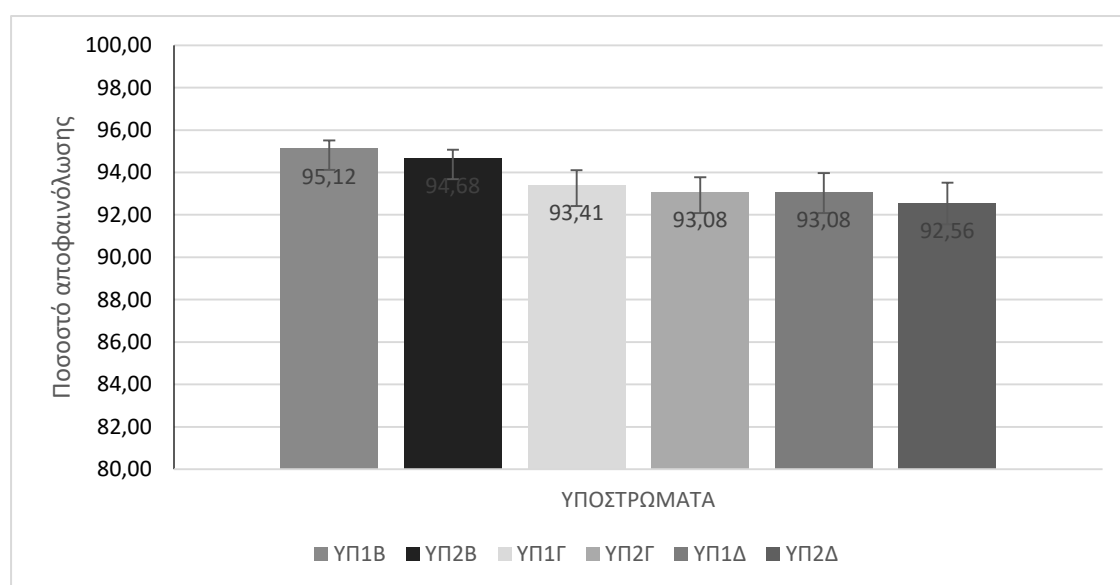


Διάγραμμα 9: Κινητική εξέλιξης φαινολικών ενώσεων (g/L) σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (\pm 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 9** παρατηρήθηκε ότι στα θρεπτικά μέσα που είχαν φαινολικά συστατικά 1 g/L και κάτω μέχρι την 7^η ημέρα που έγινε η πρώτη μέτρηση υπήρξε παραγωγή φαινολικών ενώσεων σε αντίθεση με τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν 2 g/L και πάνω που δεν έγινε κάτι αντίστοιχο. Συγκεκριμένα στους μάρτυρες (**Διάγραμμα 5**) παρατηρήθηκε παραγωγή ολικών φαινολικών της τάξης 0,35 g/L μέχρι την 7^η ημέρα τα οποία στη συνέχεια καταναλώθηκαν από τον μικροοργανισμό. Όπως έγινε και στα θρεπτικά μέσα με 1 g/L που περιείχαν παραγωγή φαινολικών της τάξης 0,18 g/L, έχοντας συνολικά 1,18 g/L μέχρι την 7^η ημέρα τα οποία καταναλώθηκαν τις επόμενες μέρες της ζύμωσης. Σε όλα τα θρεπτικά μέσα για την επεξεργασία των δεδομένων και όπως φαίνεται στη διαγραμματική τους απεικόνιση έγινε αφαίρεση των παραγόμενων ολικών φαινολικών ενώσεων των μαρτύρων για τις δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Από την 13^η ημέρα παρουσιάστηκε σημαντική κατανάλωση των φαινολικών ενώσεων όπου η κατανάλωση ξεπέρασε το 50% της αρχικής συγκέντρωσης. Τέλος παρατηρήθηκε μια

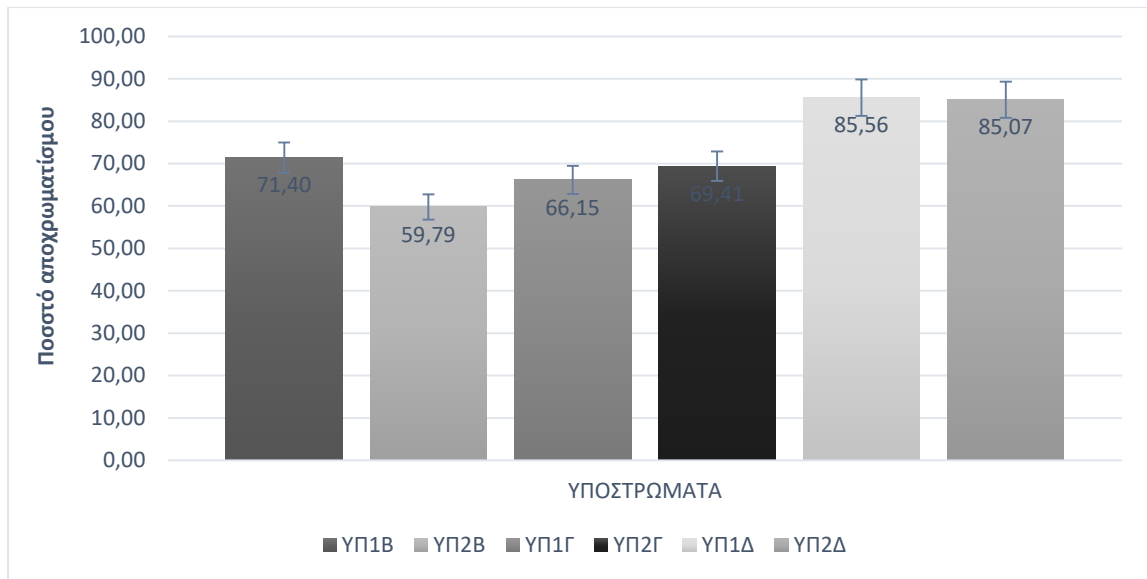
αργή κατανάλωση μετά την 17^η ημέρα στα θρεπτικά μέσα με 1 g/L φαινολικά συστατικά στο εύρος τιμών 0,05-0,11 g/L, στο θρεπτικό μέσο με 2 g/L φαινολικά συστατικά στο εύρος τιμών 0,13-0,26 g/L και στο θρεπτικό μέσο με 3 g/L φαινολικά συστατικά κατέληξε σε παρόμοια κατανάλωση με εύρος τιμών 0,20-0,41 g/L μετά την 21^η ημέρα. Επίσης η διαφορετική συγκέντρωση γλυκόζης δεν έδειξε να επηρεάζει σημαντικά την αποφαινόλωση.

Παρακάτω παρουσιάζεται το ποσοστό αποφαινόλωσης για κάθε θρεπτικό μέσο στο τέλος της ζύμωσης.



Διάγραμμα 10: Ποσοστό Αποφαινόλωσης υποστρωμάτων σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (10, 20, 30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

Παρατηρήθηκε σύμφωνα και με το **Διάγραμμα 10** μεγάλο ποσοστό (93%) αποφαινόλωσης σε όλα τα θρεπτικά μέσα ανεξαρτήτου της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης. Επίσης το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωση παρατηρήθηκε στο θρεπτικό μέσο YP1B (1g/L φαινολικά συστατικά- 40g/L γλυκόζης) το οποίο ήταν 95,12 % και στο θρεπτικό μέσο YP2B (1g/L φαινολικά συστατικά- 60g/L γλυκόζης) με τα ίδια φαινολικά συστατικά αλλά διαφορετική συγκέντρωση γλυκόζης είχε ποσοστό αποφαινόλωσης 94,68 %.



Διάγραμμα 11: Ποσοστό Αποχρωματισμού (%) υποστρωμάτων σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0,10,20,30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

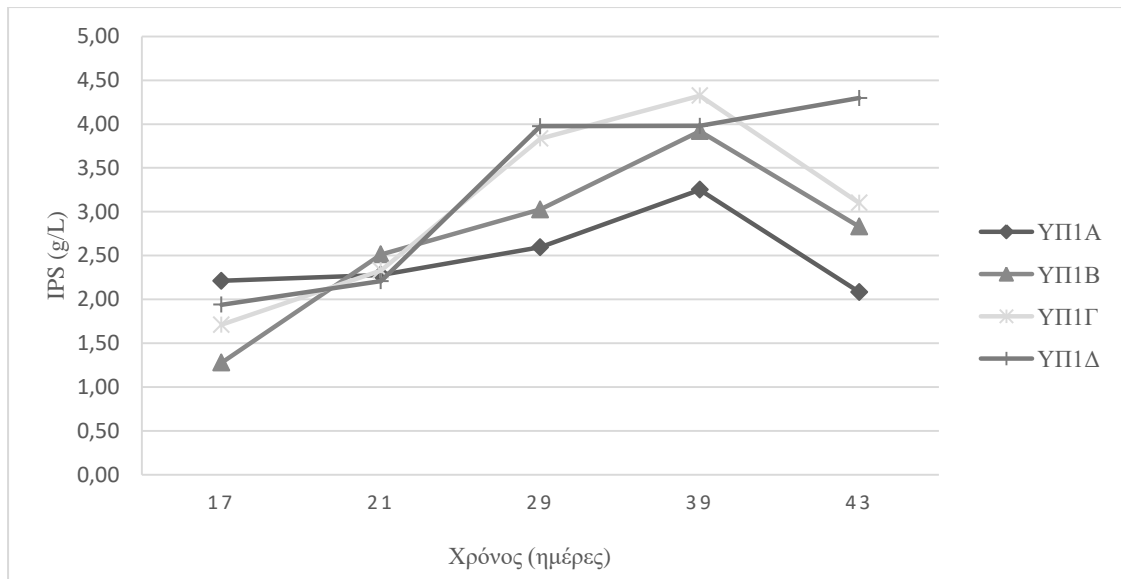
Παρατηρήθηκε σύμφωνα με το **Διάγραμμα 11** υψηλό ποσοστό αποχρωματισμού σε όλα τα θρεπτικά μέσα όπου στο τέλος της ζύμωσης (43^η ημέρα) έχει επιτευχθεί αποχρωματισμός άνω του 50% του αρχικού. Με βάση το παραπάνω διάγραμμα ο μεγαλύτερος αποχρωματισμός επιτευχθεί στο θρεπτικό μέσο ΥΠ1Δ σε ποσοστό 85,56 %

3.3. Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

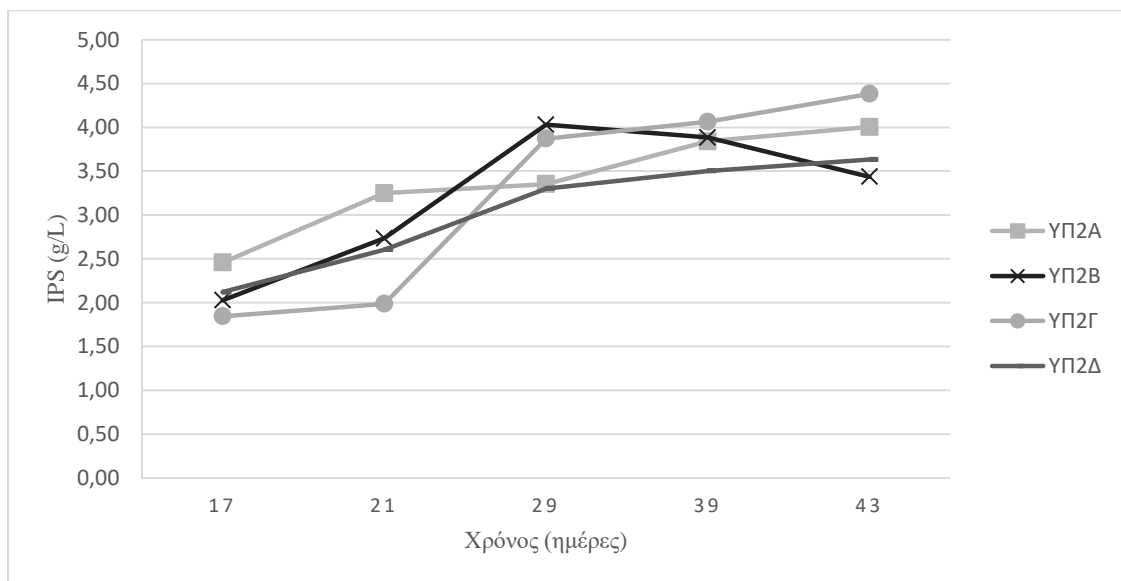
Κατά την καλλιέργεια του *P. pulmonarius* γινόταν παραλαβή και ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών παραγόμενων πολυσακχαριτών σε 5 σημεία της κινητικής του. Τα αποτελέσματα του πειράματος δίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 14** όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των ενδοπολυσακχαριτών που παράχθηκαν κατά την διάρκεια της καλλιέργειας στα οχτώ διαφορετικά θρεπτικά μέσα και εκφράζονται σε g/L και σε % w/w (g IPS /g ξηρής βιομάζας x 100).

Πίνακας 14: Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (g/L; %, w/w) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδόμενες καλλιέργειες στους 26 (\pm 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη YAE (0, 10, 20, 30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

| DAY 43 | 0% YAE | | 10% YAE | | 20% YAE | | 30% YAE | |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ | ΥΠ1Α | ΥΠ2Α | ΥΠ1Β | ΥΠ2Β | ΥΠ1Γ | ΥΠ2Γ | ΥΠ1Δ | ΥΠ2Δ |
| IPS % w/w | 14,34 | 20,99 | 12,79 | 14,09 | 12,35 | 16,16 | 11,09 | 14,04 |
| IPS g/L | 2,08 | 4,01 | 2,83 | 3,44 | 3,1 | 4,38 | 4,3 | 3,63 |
| DAY 37 | 0% YAE | | 10% YAE | | 20% YAE | | 30% YAE | |
| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ | ΥΠ1Α | ΥΠ2Α | ΥΠ1Β | ΥΠ2Β | ΥΠ1Γ | ΥΠ2Γ | ΥΠ1Δ | ΥΠ2Δ |
| IPS % w/w | 22,51 | 20,41 | 20,08 | 16,47 | 17,39 | 14,7 | 14,97 | 12,14 |
| IPS g/L | 3,25 | 3,84 | 3,92 | 3,88 | 4,32 | 4,06 | 3,98 | 3,5 |
| DAY 29 | 0% YAE | | 10% YAE | | 20% YAE | | 30% YAE | |
| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ | ΥΠ1Α | ΥΠ2Α | ΥΠ1Β | ΥΠ2Β | ΥΠ1Γ | ΥΠ2Γ | ΥΠ1Δ | ΥΠ2Δ |
| IPS % w/w | 18,71 | 20,06 | 17,59 | 18,55 | 17,88 | 16,81 | 16,58 | 13,69 |
| IPS g/L | 2,59 | 3,35 | 3,03 | 4,03 | 3,84 | 3,87 | 3,98 | 3,3 |
| DAY 21 | 0% YAE | | 10% YAE | | 20% YAE | | 30% YAE | |
| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ | ΥΠ1Α | ΥΠ2Α | ΥΠ1Β | ΥΠ2Β | ΥΠ1Γ | ΥΠ2Γ | ΥΠ1Δ | ΥΠ2Δ |
| IPS % w/w | 16,57 | 20,46 | 15,56 | 16,12 | 12,18 | 12,51 | 12,07 | 13,23 |
| IPS g/L | 2,28 | 3,25 | 2,51 | 2,73 | 2,33 | 1,99 | 2,21 | 2,6 |
| DAY 17 | 0% YAE | | 10% YAE | | 20% YAE | | 30% YAE | |
| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ | ΥΠ1Α | ΥΠ2Α | ΥΠ1Β | ΥΠ2Β | ΥΠ1Γ | ΥΠ2Γ | ΥΠ1Δ | ΥΠ2Δ |
| IPS % w/w | 17,87 | 20,13 | 12,61 | 14,5 | 13,64 | 15,43 | 14,55 | 14,1 |
| IPS g/L | 2,21 | 2,46 | 1,28 | 2,03 | 1,71 | 1,84 | 1,94 | 2,12 |



Διάγραμμα 12: Η Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (g/L) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδόμενες καλλιέργειες στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 40 g/L και προσθήκη YAE (0, 10, 20, 30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).



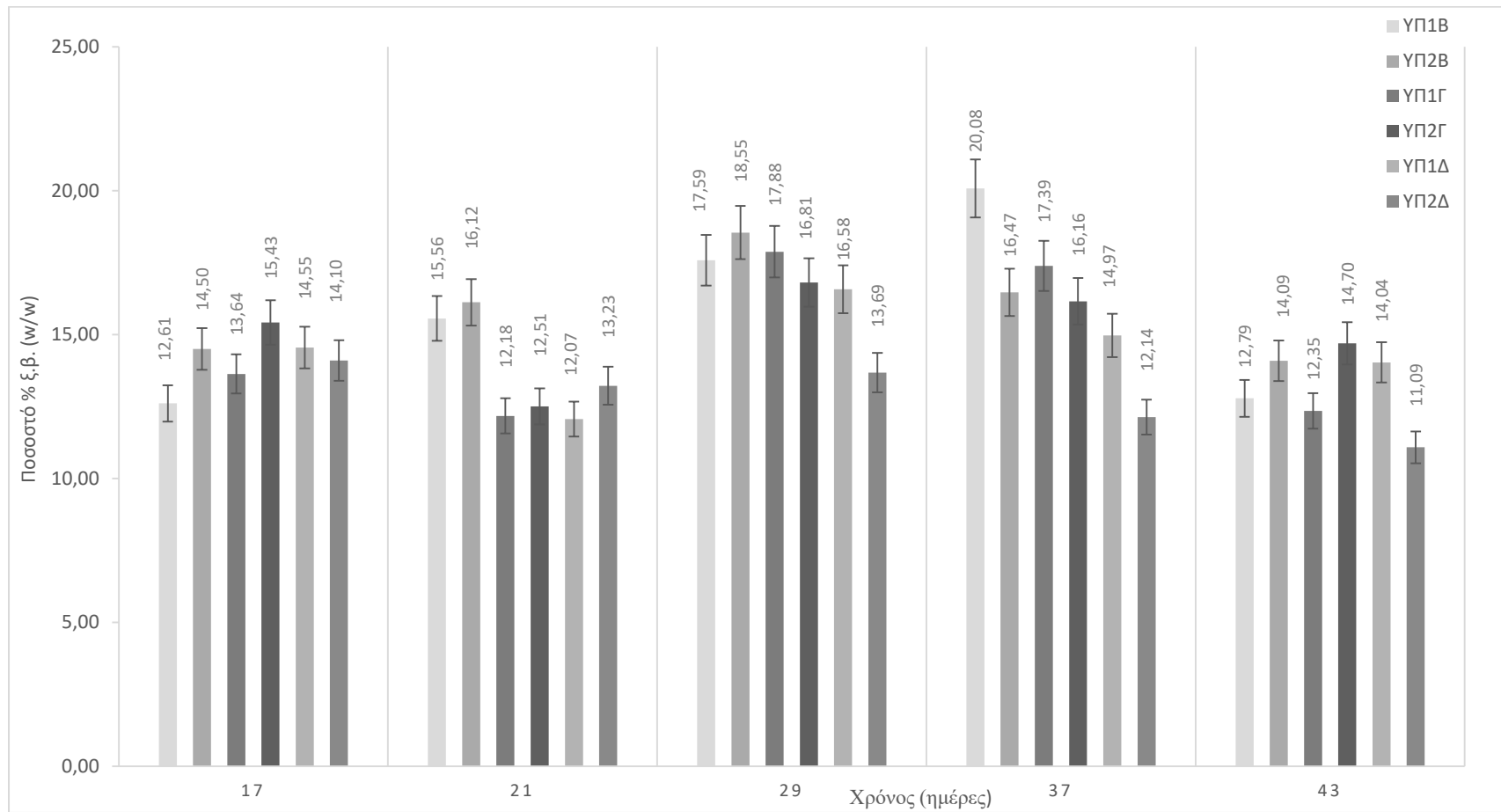
Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (g/L) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδόμενες καλλιέργειες στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L και προσθήκη YAE (0, 10, 20, 30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

Οι τιμές των ολικών ενδοπολυσακχαριτών που παράχθηκαν από τα οχτώ διαφορετικά θρεπτικά μέσα κυμάνθηκαν από 2,08 g/L έως 4,38 g/L (Διαγράμματα 12, 13). Γενικά παρατηρήθηκε ότι στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη YAE

σε σχέση με τους μάρτυρες παρουσίασαν μεγαλύτερη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών.

Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης του υποστρώματος επίδρασε θετικά στην αύξηση των ενδοπολυσακχαριτών IPS). Όπως φαίνεται και τον **Πίνακα 14**, υπήρξε αυξητική πορεία μέχρι και την 43^η ημέρα καλλιέργειας σε αντίθεση με τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν 40 g/L συγκέντρωση γλυκόζης (αρχική) όπου παρατηρήθηκε αύξηση μέχρι την 37^η ημέρα και στην οποία παρουσίασαν μέγιστη τιμή. Η μέγιστη παραγόμενη συγκέντρωση IPS εμφανίστηκε στο θρεπτικό μέσο ΥΠ2Γ με σύνθεση 20% ΥΑΕ και 60 g/L γλυκόζης και ήταν 4,38 g/L. Από τα θρεπτικά μέσα με αρχική συγκέντρωση 40 g/L εμφάνισε μέγιστη παραγόμενη τιμή ενδοπολυσακχαριτών την 43^η ημέρα σε ΥΠ1Δ (με 30% ΥΑΕ) και τιμή 4,30 g/L ενώ την 37^η ημέρα σε ΥΠ1Γ (με 20% ΥΑΕ) και με τιμή 4,32 g/L.

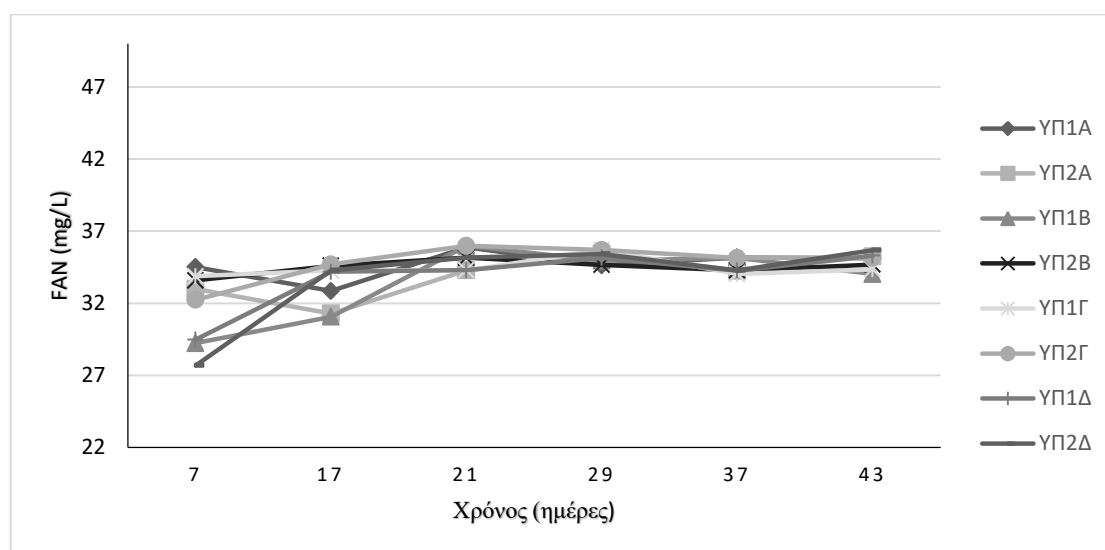
Σε ό,τι αφορά τις σχετικές τιμές (% w/w; **Διάγραμμα 14**), αυτές επηρεάστηκαν αρνητικά από την παρουσία των ΥΑΕ καθώς οι μέγιστες τιμές καταγράφηκαν στους μάρτυρες (0 g/L ΥΑΕ) και στη χαμηλή συγκέντρωση ΥΑΕ 10% v/v και ήταν ~20 % w/w, ενώ στα υποστρώματα που περιείχαν 20 και 30% ΥΑΕ οι μέγιστες τιμές κυμάνθηκαν από 12 % έως 17% w/w και μειώνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των ΥΑΕ .



Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση των ολικών ενδοπολυσακχαριτών IPS (% w/w) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (±1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0,10,20,30 % v/v). για τα 5 σημεία της ζύμωσης (YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά

3.4. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων έγινε για όλα τα θρεπτικά μέσα (Διάγραμμα 15). Παρατηρήθηκε ότι μετά την 17^η μέρα η τιμή έμεινε σταθερή (~35 mg/L) άσχετα από την συγκέντρωση ΥΑΕ. Επίσης διαπιστώθηκε αυξητική πορεία στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη ΥΑΕ μέχρι την 17^η μέρα και καθοδική για τους μάρτυρες. Η συγκέντρωση γλυκόζης δεν έδειξε να επηρεάζει σημαντικά. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 27- 36 mg/L.

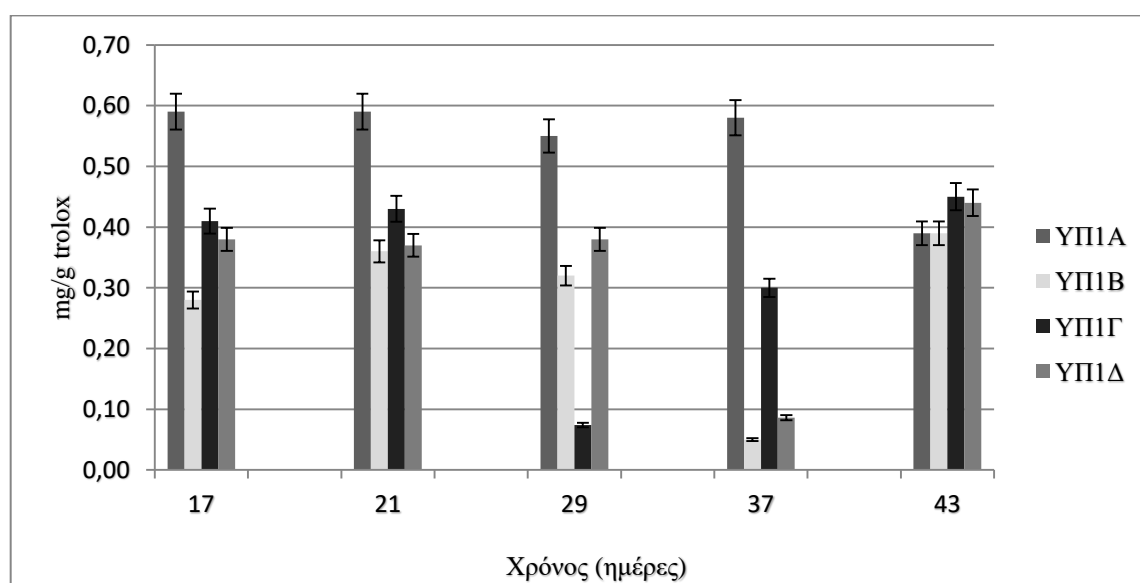


Διάγραμμα 15: Συγκριτική αξιολόγηση της πορείας παραγωγής αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0, 10, 20, 30% v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (ΥΠ1Α-40 g/L γλυκόζη, ΥΠ2Α-60 g/L γλυκόζη, ΥΠ1Β-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Β-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20% v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, ΥΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30% v/v φαινολικά συστατικά).

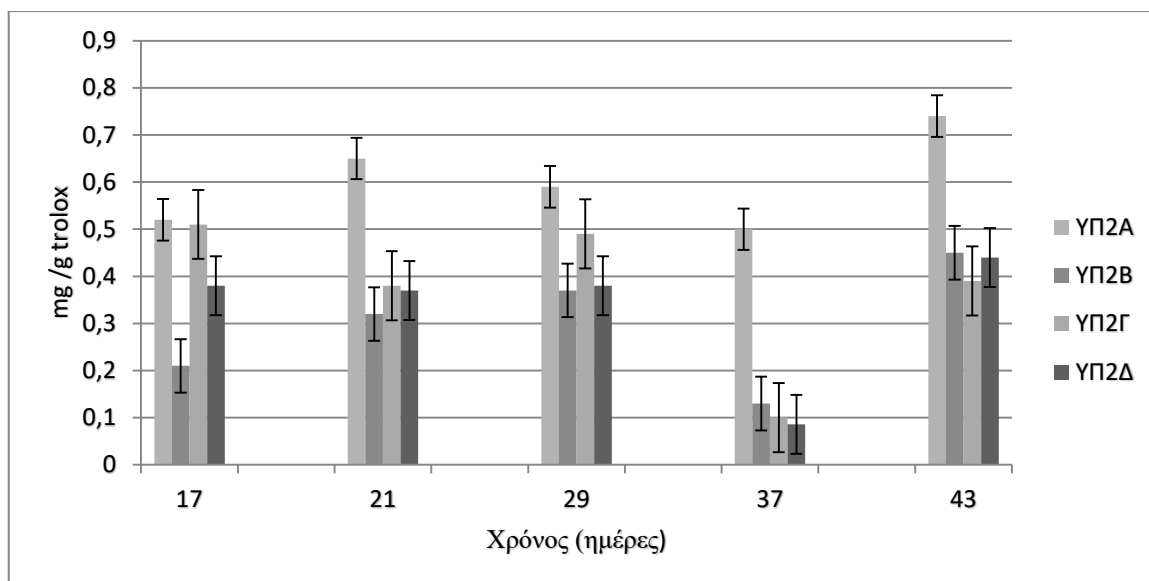
3.5. Παραγωγή ολικών φαινολικών ενώσεων στην βιομάζα και προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Κατά την καλλιέργεια του μακρομύκητα *Pleurotus pulmonarius* γινόταν παραλαβή της βιομάζας στην οποία γινόταν ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών καθώς και των αντιοξειδωτικών στα 5 σημεία της κινητικής του.

Στα παρακάτω **Διαγράμματα 16, 17** παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης (mg Trolox/g ξηρής βιομάζας) και αντιοξειδωτική ικανότητα (δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH) στην πάροδο των ημερών σε κάθε θρεπτικό μέσο βάση την αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης.



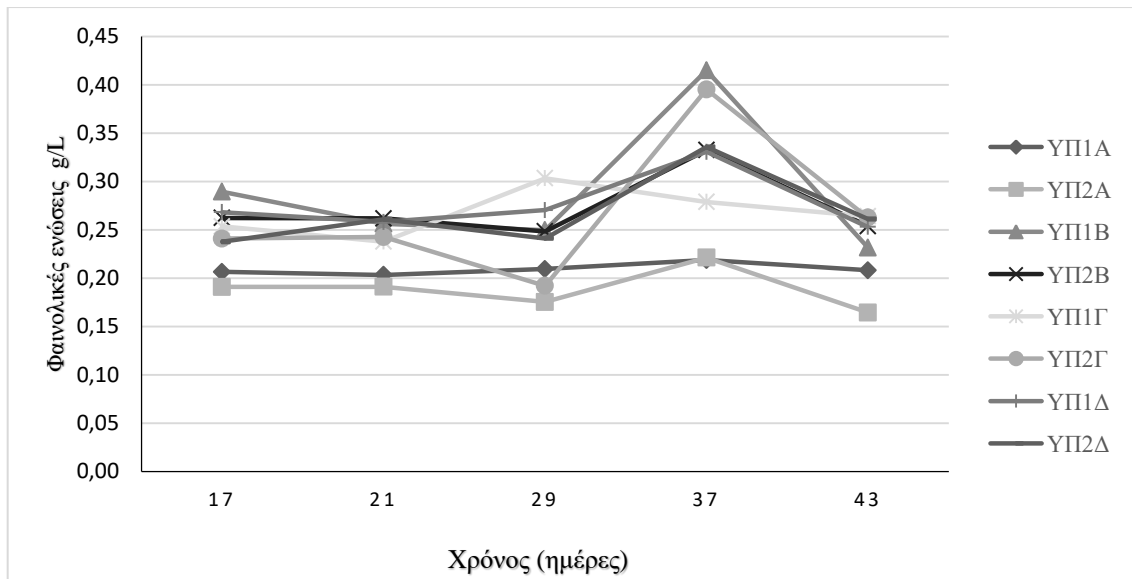
Διάγραμμα 16: Οι τιμές συγκέντρωσης (mg Trolox/g ξηρής βιομάζας) και αντιοξειδωτική ικανότητα (δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH) στα 5 σημεία της ζύμωσης (YP1A-40 g/L γλυκόζη, YP1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).



Διάγραμμα 17 : Οι τιμές συγκέντρωσης (mg Trolox/g ξηρής βιομάζας) και αντιοξειδωτική ικανότητα (δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH) στα 5 σημεία της ζύμωσης (YΠ2A-60 g/L γλυκόζη, YΠ2B-60 g/L γλυκόζη και 10% v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30% v/v φαινολικά συστατικά).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη ΥΑΕ δεν επίδρασε θετικά στην παραγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων, με αποτέλεσμα οι μάρτυρες να παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές έναντι των άλλων υποστρωμάτων. Επίσης παρατηρήθηκε μια γενική διακύμανση με την πάροδο του χρόνου στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη ΥΑΕ, την 37^η ημέρα παρουσιάστηκε σημαντική μείωση των αντιοξειδωτικών και εν συνέχεια την αύξηση τους την 43^η ημέρα, εξαίρεση ήταν στο θρεπτικό μέσο YΠ1Γ που εμφάνισε αυτή την απότομη μείωση την 29^η ημέρα και στη συνέχεια είχε αυξητική πορεία.

Παρακάτω δίνεται το διάγραμμα την παραγωγής φαινολικών ενώσεων στην παραχθείσα βιομάζα.

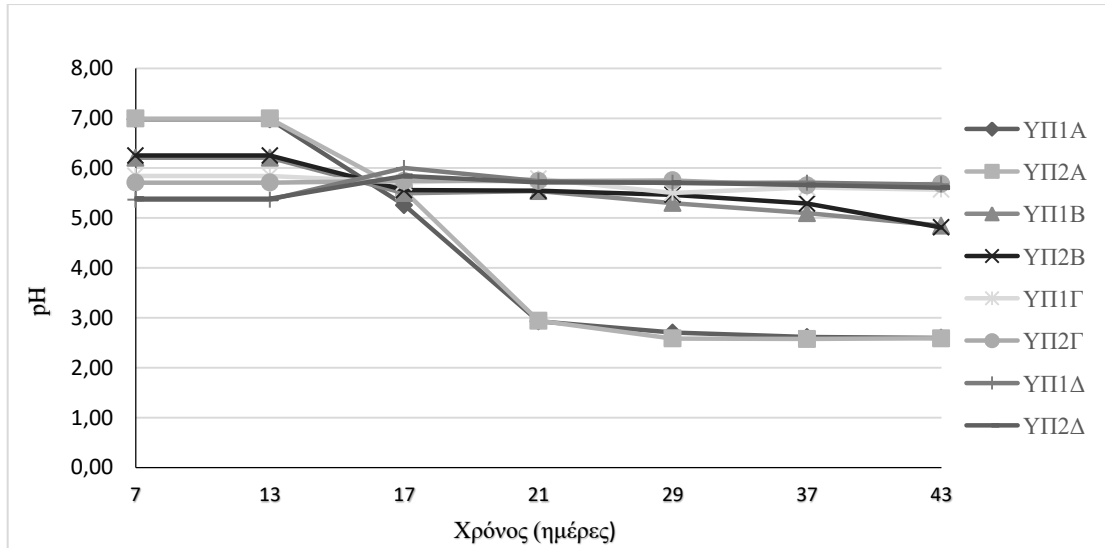


Διάγραμμα 18: Ολικά φαινολικά συστατικά της βιομάζας στα 5 σημεία της ζύμωσης (YP2A-60 g/L γλυκόζη, YP2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YP2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

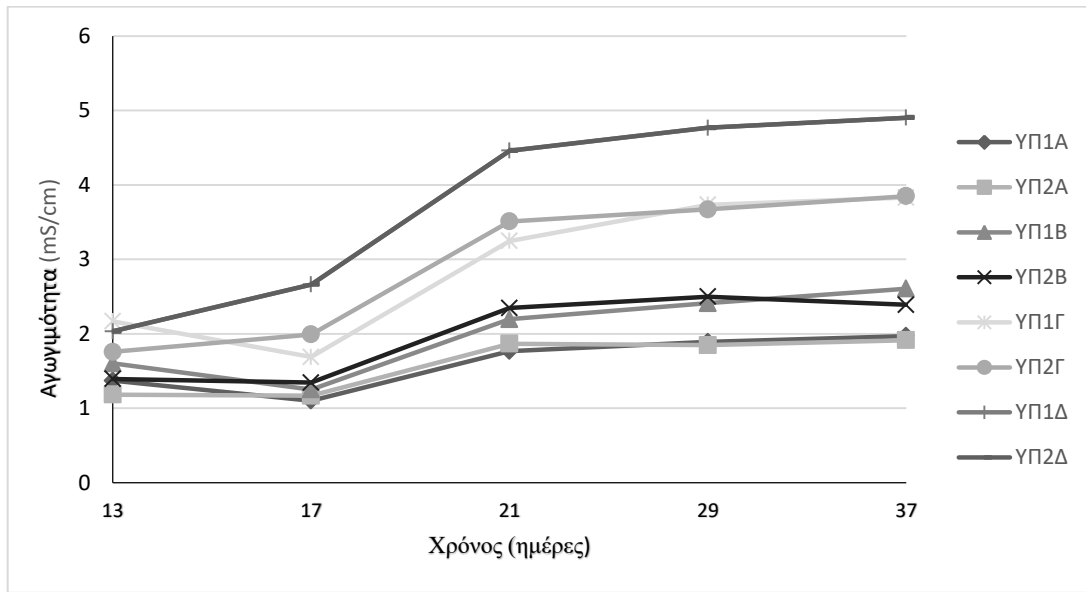
Παρατηρήθηκε αύξηση φαινολικών ενώσεων κατά την 37^η ημέρα σε όλα τα θρεπτικά μέσα εκτός του YP1Γ που η αύξηση αυτή έγινε την 29^η ημέρα κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τις μετρήσεις των αντιοξειδωτικών καθώς στα μέγιστα των ολικών φαινολικών παρουσιάζεται το ελάχιστο των αντιοξειδωτικής ικανότητας (δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH).

3.6. Αγωγιμότητα και pH

Καθόλη την διάρκεια μετρήθηκε το pH και η αγωγιμότητα των θρεπτικών μέσων και παρουσιάζονται στα παρακάτω **Διαγράμματα 19 και 20** αντίστοιχα. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός της διακύμανσης του pH, όπου στους μάρτυρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του φτάνοντας κάτω από την τιμή του τρία μετά την 21^η ημέρα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη ΥΑΕ (10%, 20%, 30% v/v) που διατήρησαν την τιμή του pH σχεδόν σταθερή (~5,5). Ενώ η αγωγιμότητα μειωνόταν μέχρι την 21^η ημέρα και στη συνέχεια αυξήθηκε.



Διάγραμμα 19: Προσδιορισμός pH του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0,10,20,30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (YΠ1A-40 g/L γλυκόζη, YΠ2A-60 g/L γλυκόζη, YΠ1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).



Διάγραμμα 20: Προσδιορισμός αγωγιμότητας (mS/cm) του στελέχους *P. pulmonarius* AMRL 177 σε μη αναδεδυόμενες καλλιέργειες στους 26 (± 1) °C με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40 g/L και 60 g/L και προσθήκη ΥΑΕ (0,10,20,30 % v/v) για όλα θρεπτικά μέσα (YΠ1A-40 g/L γλυκόζη, YΠ2A-60 g/L γλυκόζη, YΠ1B-40 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2B-60 g/L γλυκόζη και 10 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ1Γ-40 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2Γ-60 g/L γλυκόζη και 20 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ1Δ-40 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά, YΠ2Δ-60 g/L γλυκόζη και 30 % v/v φαινολικά συστατικά).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρκετές εργασίες έχουν γίνει για τη μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς στελεχών βασιδιομυκήτων (στελέχη του γένους *Pleurotus* και άλλα στελέχη μυκήτων λευκής σήψης) παρουσία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου με ενδιαφέροντα αποτελέσματα (Ntougias et al., 2012; Kissi et al., 2001; Fountoulakis et al., 2002). Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε το στέλεχος των ανωτέρων μυκήτων *P. pulmonarius* κατά την καλλιέργεια του σε οχτώ διαφορετικά υγρά θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις και την προσθήκη υγρού αποβλήτου ελαιουργίας (ΥΑΕ) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις σε μη αναδεδυμένες συνθήκες, με σκοπό την παρατήρηση και μελέτη της κινητικής παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών καθώς και αν η προσθήκη του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας επηρεάζει τις παραπάνω κινητικές. Επίσης έγιναν μετρήσεις ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικών στην βιομάζα και προσδιορισμός των ελεύθερων αμινομάδων των θρεπτικών μέσων. Τέλος μελετήθηκε και η ικανότητα του μελετώμενου στελέχους να αποχρωματίσει και να μειώσει το φαινολικό φορτίο του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.

Σε προηγούμενες εργασίες έχει παρατηρηθεί μείωση του pH με την καλλιέργεια στελεχών του γένους *P. ostreatus*, αύξηση από τα στελέχη *Ganoderma australe* και *Ganoderma carnosum* και μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Ntougias et al., 2012), ενώ αύξηση του pH έχει καταγραφεί στην καλλιέργεια του *Pleurotus sajor-caju* (Yesilada et al., 1999). Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε μείωση του pH σε όλα τα στα θρεπτικά μέσα. Επίσης παρατηρήθηκε στα θρεπτικά μέσα δίχως προσθήκη ΥΑΕ το pH μειώθηκε σημαντικά (~2,6), σε αντίθεση στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ όπου λειτούργησε ρυθμιστικά και το pH μειώθηκε ως το ~5. Στην ηλεκτρική αγωγιμότητα παρατηρήθηκε μείωση της μέχρι και την 21^η ημέρα και στη συνέχεια εκ νέου αύξηση σε όλα τα θρεπτικά μέσα.

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., 2001; Lee κ.α., 2004). Στις περισσότερες μελέτες, ο συνήθης τρόπος ανάπτυξης των εδώδιμων μυκήτων σε υγρά θρεπτικά μέσα για παραλαβή μυκηλιακής βιομάζας και διαφόρων μεταβολιτών (ενζύμων, πολυσακχαριτών, λιπιδίων) είναι χρησιμοποιώντας απλές πηγές άνθρακα με κυρίαρχη πηγή τη γλυκόζη (Higashiyama κ.α. 2002; Gern κ.α., 2008; Fernandes κ.α., 2001; 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., 2011; Kim κ.α., 2010).

Στην παρούσα μελέτη ως κυρία πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 40g/L και 60 g/L και ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα ζύμης. Σε πολλές προηγούμενες μελέτες, έχει χρησιμοποιηθεί η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για τη μέγιστη παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας για το *Pleurotus* spp. (Elisashvilli et al., 2009, Gern, 2008) επίσης στο θρεπτικό θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας έγινε προσθήκη ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 10%, 20% και 30% με σκοπό να διερευνηθεί αν και κατά ποσό η παρουσία του ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας επηρεάζει την ανάπτυξη και την φυσιολογική συμπεριφορά του μελετώμενου στελέχους. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ εμφάνισαν υψηλή παραγωγή βιομάζας, παρόλο που τα ΥΑΕ είναι ιδιαίτερα τοξικά, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινολών (Mulinacci et al., 2001). Η αυξημένη παραγωγή βιομάζας του εξεταζόμενου στελέχους πιθανός να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ΥΑΕ πέρα από την υψηλή τοξικότητα τους περιέχουν επίσης και διάφορα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία) (Roig et al., 2006; Mekki et al., 2006) τα οποία προφανώς προάγουν την κυτταρική αύξηση.

Αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει για το γένος του μύκητα της παρούσας μελέτης σε καλλιέργειες βυθού κατέγραψαν σε ορισμένες περιπτώσεις παρεμφερή αποτελέσματα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις υπήρχε σημαντική διακύμανση μεταξύ των τιμών. Συγκεκριμένα, αναφορικά με τους μύκητες του γένους *Pleurotus*, οι Gern κ.α. (2008) κατέγραψαν σε καλλιέργεια βυθού διάρκειας 8-14 ημερών του *P. ostreatus* σε αναδεδυόμενες φιάλες (120 rpm) και σε θρεπτικό μέσο 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 του στελέχους *P. pulmonarius* που μελετήθηκε

στην παρούσα ερευνητική εργασία. Αντίθετα, οι Ardon κ.α. (1996) ανέφεραν για τον ίδιο μύκητα σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας (4,8 g/L) σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης (5g/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 (120rpm), 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 αναδεδυμένους 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. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν και οι Foundoulakis κ.α. (2002), οι οποίοι κατά την καλλιέργεια του μύκητα *P. ostreatus*, σε θερμικά επεξεργασμένο, μη αραιωμένο ΥΑΕ αλλά και σε αποστειρωμένο, αραιωμένο 50% (v/v) ΥΑΕ, κατέγραψαν τιμές παραγόμενης βιομάζας 5,5 g/L και 5 g/L αντίστοιχα, στο τέλος της ζύμωσης. Στα θρεπτικά μέσα που μελετήθηκαν, σε μη αναδεδυμένη κατάσταση, τις μεγαλύτερες τιμές βιομάζας εμφάνισαν τα θρεπτικά μέσα ΥΠ2Δ και ΥΠ1Δ οι οποίες ήταν 30,61 g/L και 32,76 g/L αντίστοιχα (30% ΥΑΕ/60 g/L και 30% ΥΑΕ/60 g/L) εμφανώς μεγαλύτερες από την υπάρχουσα βιβλιογραφία αλλά αξίζει να αναφερθεί ότι οι μάρτυρες του στελέχους είναι εξίσου υψηλά (14,53 g/L και 19,62 g/L).

Όσον αφορά στην κατανάλωση υποστρώματος, όλα τα θρεπτικά μέσα παρουσίασαν παρόμοια εικόνα κατανάλωσης γλυκόζης, με μεγαλύτερη κατανάλωση να παρατηρείται στα θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ και μικρότερη σε αυτό που δεν είχε γίνει προσθήκη ΥΑΕ, γεγονός που δικαιολογείται καθώς η παραγωγή βιομάζας στα θρεπτικά μέσα ήταν αυξημένη στα υποστρώματα μέσα που περιείχαν ΥΑΕ σε σχέση με αυτά που δεν είχε γίνει προσθήκη. Με μια εξαίρεση να παρουσιάζεται στο μάρτυρα των υποστρωμάτων με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 60 g/L που παρουσίασε αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης 50,16%. Στα θρεπτικά μέσα με προσθήκη ΥΑΕ 10% v/v, τα ποσοστά καταναλωμένης γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση 40 g/L και 60 g/L ήταν 73,05% , 52,25% αντίστοιχα. Στα θρεπτικά μέσα με προσθήκη ΥΑΕ 20% v/v τα ποσοστά καταναλωμένης γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση 40 g/L και 60 g/L ήταν 81,32%, 69,41% αντίστοιχα. Στα θρεπτικά μέσα με προσθήκη ΥΑΕ 30% v/v τα ποσοστά καταναλωμένης γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση 40 g/L και 60 g/L 96,74%, 70,12% αντίστοιχα.

Σε ότι αφορά τον συντελεστή απόδοσης $Y_{X/S}$ και με γνώμονα ότι μέγιστη θεωρητική τιμή είναι το 0,8 g/g, στην παρούσα μελέτη στον μακρομύκητα *P.pulmonarius* παρατηρήθηκε αυξημένος συντελεστής απόδοσης μεγαλύτερος του 0,65 g/g, γεγονός που υποδεικνύει πολύ καλή εκμετάλλευση του υποστρώματος προς παραγωγή βιομάζας. Επίσης παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ο συντελεστής απόδοσης μειώθηκε, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχες έρευνες όπως αυτή των Diamantopoulou et.al. (2016) στο *Volvariella volvacea* όπου η αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης είχε ως αποτέλεσμα μείωση του συντελεστή απόδοσης.

Επίσης μελετήθηκε η παραγωγή των ενδοπολυσακχαριτών σε 5 σημεία της κινητικής τους και παρουσιάστηκαν οι τιμές από τα δύο τελευταία σημεία 37η και 43η ημέρα για όλα τα θρεπτικά μέσα. Η μεγαλύτερη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών αρχικά παρουσιάστηκε σε όλα τα θρεπτικά μέσα με αρχική 60 g/L συγκριτικά με τα θρεπτικά μέσα αρχικής συγκέντρωσης 40 g/L, όπως επίσης η προσθήκη YAE αύξηση της συγκέντρωσης του επίδρασε θετικά στην αύξηση των ενδοπολυσακχαριτών (σε απόλυτες τιμές, g/L). Μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 20% YAE (4,38 g/L) και μετέπειτα στην συγκέντρωση 30% v/v YAE (4,30 g/L), ενώ στο θρεπτικό μέσο δίχως YAE εμφάνισε τις χαμηλότερες τιμές (2,08 g/L). Τα θρεπτικά μέσα με αρχική συγκέντρωση 40 g/L παρουσίασαν την 37^η ημέρα μέγιστη τιμή ενώ τα θρεπτικά μέσα με αρχική συγκέντρωση 60 g/L είχαν αυξητική πορεία μέχρι και την 43^η ημέρα που παρουσίαζαν και την μέγιστη τιμή τους. Όσον αφορά στο (%) ποσοστό IPS επί ξηρού βάρους στα θρεπτικά μέσα που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές για τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν συγκέντρωση γλυκόζης (60 g/L) σε σχέση με αυτά που είχαν αρχική συγκέντρωση 40 g/L γλυκόζης. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και οι Diamantopoulou et.al. (2016) όπου με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των IPS (g/L; % w/w). Επίσης παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού (%) IPS επί ξηράς βιομάζας μετά την 37^η ημέρα, με τις μεγαλύτερες τιμές να εμφανίζονται σε αρχικά στάδια της ζύμωσης σε σχέση με το τέλος της ζύμωσης. Μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίστηκε στις συγκεντρώσεις 20% v/v και 30% v/v YAE (16,16% και 14,04%). Συγκεκριμένα οι Diamantopoulou κ.α. (2014) κατά την καλλιέργεια του στελέχους του μύκητα *P. pulmonarius* σε αναδεδόμενες και στατικές φιάλες, με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, κατέγραψαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές παραγωγής IPS (10,9 g/L και ποσοστό IPS επί ξηρή βιομάζα 48,4% w/w) κατά την

καλλιέργεια τους υπό συνθήκες ανάδευσης. Επίσης έχουν αναφερθεί αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις πολυσακχαριτών και στα καρποσώματα των μακρομυκήτων 61-64% w/w σε *P. ostreatus*, *P. cystidiosus* (Yang κ.α., 2001), 46,6-81,8 % w/w *P. ostreatus* (Bano και Rajarathaman, 1998; Chang και Miles, 2004), 50,7% w/w *P. cystidiosus* (Chang και Miles, 2004)

Επιπρόσθετα μελετήθηκε η ικανότητα του στελέχους να μειώνει στην συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (αποφαινόλωση) καθώς και να αποχρωματίσουν το υγρό απόβλητο ελαιουργείου (ΥΑΕ) που έγινε προσθήκη στα θρεπτικά μέσα της καλλιέργειας, καθώς οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης είναι ικανοί να παράγουν λιγνολυτικά ένζυμα τα οποία μπορούν να αποδημήσουν 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, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΑΕ (25%) αποτελέσματα του *P. citrinopileatus* να επιτυγχάνει μέγιστη μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά (86,4%) και μέγιστο αποχρωματισμό κατά (79.1%) μετά από ζύμωση με διάρκεια 22 ημέρες. Οι Yesalida et al. (1999) κατέγραψαν ποσοστό μείωσης 60% από το στέλεχος *Pleurotus sajor-caju* και 35-45% από τα *P. ostreatus*. Επίσης οι Ntougias κ.α. (2012), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού διαφόρων στελεχών του γένους *Pleurotus*, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΑΕ (25% v/v). Η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων μειώθηκε σημαντικά, παρουσιάζοντας καλύτερα αποτελέσματα τα στελέχη *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* και *P. eryngii* με ποσοστά μείωσης των φαινολικών ενώσεων κατά 70,3%, 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 ± 1 °C, το δεύτερο περιείχε 50% ΥΑΕ και 50% νερό και επεξεργάστηκε θερμικά στους 100 ± 1 °C και το τρίτο περιείχε μόνο ΥΑΕ και επεξεργάστηκε θερμικά στους 100 ± 1 °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. Εξαιρετικά υψηλό ποσοστό μείωσης παρατηρήθηκε από το

στέλεχος *Ganoderma applanatum* (94%) σε υγρές καλλιέργειες με 20% συγκέντρωση αποβλήτου (Matos et al., 2007). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι βασιδιομύκητες διαθέτουν μεγάλη ικανότητα απορρόπησης 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. Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μεγάλη ικανότητα μείωσης του φαινολικού φορτίου του αποβλήτου και στα έξι θρεπτικά μέσα που περιείχαν ΥΑΕ σε συγκεντρώσεις 10 %, 20% και 30% v/v. Συγκεκριμένα τα ποσοστά μείωσης των φαινολικών ενώσεων έφτασαν με μέγιστη τιμή 85,56% και ελάχιστη 59,79%. Η συγκέντρωση της γλυκόζης (40 g/L-60 g/L) δε φάνηκε να επηρέασε σημαντικά την μείωση των φαινολικών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο μακρομύκητας *Pleurotus pulmonarius* είναι ικανός να αναπτυχθεί σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ) και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις (30%), και μάλιστα 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. Επίσης η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από την παρουσία των ΥΑΕ στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, με τα μελετώμενα θρεπτικά μέσα να εμφανίζουν λίγο μεγαλύτερες τιμές παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών σε αυτά που περιείχαν ΥΑΕ, χωρίς όμως οι διαφορές μεταξύ των τιμών να είναι σημαντικές. Επίσης, ικανοποιητικές τιμές φαινολικών (0,3 g/L) και αντιοξειδωτικών συστατικών (~0,4 mg/g trolox) παράχθηκαν σε όλα τα υποστρώματα με παρόμοιες τιμές ανεξαρτήτου της σύστασης του υποστρώματος. Τέλος, ο μακρομύκητας παρουσίασε μεγάλη ικανότητα αποφαινώσεως (90%) του περιεχόμενου ΥΑΕ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μειώνοντας σημαντικά το φαινολικό φορτίο καθώς και την ένταση του χρώματος του αποβλήτου (~60-85%), 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, αντιοξειδωτικά).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, 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).
- Ali Mekki, Abdelhafidh Dhouib, Sayadi S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater, *Microbiological Research*, Volume 161, Issue 2, Pages 93-101, ISSN 0944-5013
- Arienzo, M., De Martino, A., Capasso, R., Di Maro, A., & Parente, A. (2003). Analysis of carbohydrates and amino acids in vegetables waste waters by ion chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14(2), pp. 74-82.
- Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglou, A., Sengul, F., & Ozer, A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews on Environmental Science and Technology*, 34(3), pp. 209-247.
- 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.
- Barros, L., Ferreira, M.-J., Queiros, B., Ferreira, I.C., Baptista, P., 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.* 103, 413–419.
- Bennett, R.N., Wallsgrave, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 127, 617–633.
- Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*. John Wiley & Sons.
- 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.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH^{*} Free Radical Method. *FOOD Sci. Technol.-ZURICH-* 30, 609–615.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- Breene, W. M. (1990). Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53(10), 883-894.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1993). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 47, pp. 3535-3540.
- 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.

- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective pytoxic effects of polyphenols from vegetables waste waters. *Phytochemistry*, 31(12), pp. 4125-4128.
- Carbera, F., Lopez, R., Martinez, A., Dupuy de Lome, E., & Murillo, J. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), pp. 215-225.
- Cassano, A., Conidi, C., Giorno, L., & Drioli, E. (2013). Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249, pp. 185-193.
- Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., & Garcia, D. (1996). Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), pp. 193-203.
- Chang & Milles, 1997 *Mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments*
- 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.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact (2nd ed.). *CRC Press*.
- Chen A.W., 2002. Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst (Reishi) in North America (3). *MushWorld Cultivation*
- Cheung, P. C. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*.
- Chevalier Auguste. L'origine de l'Olivier cultivé et ses variations. In: Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale, 28^e année, bulletin n°303-304, Janvier-février 1948, pp. 1-25.
- Chien, Y.L., Ho, C.T., Chiang, B.H., Hwang, L.S., 2011. Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid fermentation medium. *Food Chem.* 126, 1586–1592.
- 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.
- Cirillo, V. P., Crestwood, W. A., Hardwick, O. and Seeley, R. D. Fermentation process for producing edible mushroom mycelium. *U.S. Patent 2*. 1960. 928,210
- D' Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., & Sermanni, G. G. (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61, pp. 209-218.
- 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.

- Delmas, J. (1989). *Les champignons et leur culture. Paris: Flammarion.*
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Aggelis, G., Philippoussis, A. (2016). Adaptation of *Volvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food Chemistry*, Volume 196, Pages 272-280,
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A., 2012. Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied. Biochemistry. Biotechnology*. 167, 536–551.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Katsarou, E., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A. (2012). Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea* . *Applied Biochemistry Biotechnology* 167, 1890–1906 (2012)
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A., 2014. Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 1385–1400.
- 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
- Drysdale, G., Kasan, H., & Bux, F. (1999). Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA*, 25, pp. 357-362.
- E. Levy & Peter E. Fugendi (Ed.), *CRC Press*, New York, Ch. 2, pp. 44-71
- Elisashvili, V.I., Kachlishvili, E.T., Wasser, S.P., 2009. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Appl. Biochemical. Microbiology*. 45, 531–535.
- 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.
- Fernanda Grison Confortin, Rosane Marchetto, Fernanda Bettin, Marli Camassola, Mirian Salvador & Aldo José Pinheiro Dillon (2008) Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35 (N.1149).
- 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.
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Parrella, A., & Temussi, F. (2004). Olive oil mill wastewater treatment using a chemical and biological approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), pp. 5151-5154.
- 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*. *Water Research*, 36(19), 4735-4744.

- Furue, H., & Kitoh, I. (1981). Phase 111-study on Lentinan. Japanese. *Journal of Cancer Chemotherapy*, 8, 944-960.
- Genedebien, A., Ferguson, R., Brink, J., Horth, H., Sullivan, M., & Davis, R. (2001). *Survey of waste spread on land*.
- 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.
- Ginterova, A. (1973). Nitrogen fixation by higher fungi. *Biologia (Bratislava)*, 28, 199-202.
- Hammel, K. E. (1997). Fungal Degradation of lignin. Cab International, pp. 33-45.
- Hasegawa, R. H., Kasuya, M. C., & Vanetti, M. C. (2005). Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(2), 212-217.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y., & Shimizu, S. (2002). Production of Arachidonic Acid by *Mortierella* Fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 252-262.
- Ikekawa, T. (1995). Enokitake, *Flammulina velutipes*: Host-mediated antitumor polysaccharides. *Food Reviews International*, 11(1), 203-206.
- Israilides, C. J., Vlyssides, A., Mourafeti, V. N., & Karvouni, G. (1997). Olive oil wastewater treatment with the use of an electrolysis system. *BioSource Technology*, 61, pp. 163-170.
- 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.
- 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.
- Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., & Crowther, J. C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science (7)*.
- 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.
- 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.
- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., & Sannia, G. (2001). Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 221-226.
- Knupp, G., Rucker, G., Ramos-Cormenzana, A., Hoyos, S. G., Neugebauer, M., & Ossenkop, T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of

olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3), pp. 277-282.

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.

Kuszmán, J. (2006). Introduction to Carbohydrates, *In: Organic Chemistry of Sugars*, Daniel

Lacko, N., Bux, F., & Kasan, C. H. (1999). Survey of filamentous bacteria in activated sludge plants in KwaZulu-Nata. *Water SA*, 25(1), pp. 63-68.

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.

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.

Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., Blackburn, J.W., 2010. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource. Technology*. 101, 6745–6750.

Litchfield, J. H. (1968). The production of fungi. *Single Cell Protein*, 309.

Litchfield, J. H. (1977). Single cell proteins. *Food Technology*, 31(5), 175-179.

Litchfield, J. H., & Overbeck, R. C. (1965). Submerged culture growth of *Morchella* species in food processing waste substances. *Food Science and Technology*, 511-520.

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.

Lull, C., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, 2005(2), 63-80.

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.

Matos Luis Carlos, José A. Pereira, Paula B. Andrade, Rosa M. Seabra, M. Beatriz P.P. Oliveira, Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils, *Food Chemistry*, Volume 102, Issue 3, 2007, Pages 976-983.

- 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.
- Mau, J.-L., Tsai, S.-Y., Tseng, Y.-H., Huang, S.-J., 2005. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.* 93, 641–649.
- 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.
- McNamara, C. C., Anastasiou, C. C., Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Mekki, A., Dhoub, A., & Sayadi, S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological research*, 161(2), pp. 93-101.
- 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.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytic. Chemistry*. 31(3), pp. 426–428.
- 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.
- Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11(1), 5-21.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26, 211–219.
- Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., & Vincieri, F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), pp. 3509-3514.
- Musa, K.H., Abdullah, A., Kuswandi, B., Hidayat, M.A., 2013. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chem.* 141, 4102–4106.
- Natella F., Nardini M., Di Felice M. and Scaccini C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1453-1459.
- Ngai, P. H., Zhao, Z., & Ng, T. (2005). Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26(2), 191-196.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). Olive processing waste management: *Literature Review and Patent Survey (Second edition ed.)*. Elsevier.

- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautová, V., & Iakakis, 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.
- Ntougias, S., Gaitis, F., Katsaris, P., Skoulika, S., Iliopoulos, N., & Zervakis, I. G. (2013). The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties-Evaluation of *Pleurotus* strains as bioindicators of the effluents toxicity. *Chemosphere*, 92, pp. 399-405.
- Ouzounidou, G., Zervakis, G. I., & Gaitis, F. (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, 4, pp. 21-38.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189-259.
- Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., & Aggelis, G. (2011a). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1138-1150.
- Paraskeva, C. A., Papadakis, V. G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D. G., & Koutsoukos, P. G. (2007). Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination*, 213(1-3), pp. 218-229.
- Paredes, C., Bernal, M. P., Cegarra, J., & Roig, A. (2002). Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 85(1), pp. 1-8.
- Patel, Y., Naraiyan, R., & Singh, V. (2012). Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3(1), 1-12.
- 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.
- 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.
- Roig, M.L. Cayuela, M.A. Sánchez-Monedero, An overview on olive mill wastes and their valorisation methods, *Waste Management*, Volume 26, Issue 9, 2006, Pages 960-969.
- Ronald L. P., Xianli W., Schaich K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rozzi, A., & Malpei, F. (1996). Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, pp. 135-144.

- Ruiz-Rodriguez A, Soler-Rivas C, Polonia I, Wichers HJ (2010) Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64:638–645.
- Sayadi, S., & Radhouane, E. (1992). Decolourization of olive mill waste waters by the white rot fungus *Phanerochate chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiology and biotechnology*, 37, pp. 813-817.
- 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.
- 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.
- Sierra, J., Marti, E., Montserrat, G., Cruannas, R., & Garrau, M. (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *The Science of the Total Environment* (279), pp. 207-214.
- Singleton V. L. and J. A. Rossi (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *V Am. J. Enol. Vitic. Volume* 16(3), 144.
- Song, C. H., Yiang, J. Y., Vine, J. H., Tattum, B., & Cho, K. Y. (1989). Lipid profile of *Pleurotus sajor caju*. *Annual Appliace of Microbiology*, 114, 167-176.
- Stamets F., 1993, Growing goyrmnet and medicinal mushrooms, *Ten Speed Press*, Barkeley C.A. Cheung, 2010;
- Sun, J., He, H., Xie, B.J., 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6646–6652.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Turkoglu, A., Kivrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K., Turkoglu, H., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *Afr. J. Biotechnology*. 5.
- Vermerris, W., & Nickolson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer.
- Vetter, J., and Rimóczi, I. (1993). Crude, digestible and indigestible fruit body proteins in oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 197, 427-428.
- 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.
- Vladimir Elisashvili, Michel Penninckx, Eva Kachlishvili, Nino Tsiklauri, Eka Metreveli, Tamar Kharziani, Giorgi Kvesitadze. *Lentinus edodes and Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 3, 2008, Pages 457-462, ISSN 0960-8524
- 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
- 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.
- Waterman, P., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *In Methods in ecology* (pp. 83-85). Oxford: Lawton JH.
- Wood DA & Smith JF (1987) The cultivation of mushrooms. In: Norris JR & Pettipher GL (Eds) *Essays in Agricultural and Food Microbiology* (pp 309–343).
- Wui, S. A., & Elimelech, M. (2008). Fatty acid fouling of reverse osmosis membranes: Implication for wastewater reclamation. *Water research*, 42, pp. 4393-4403.
- 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.
- 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.
- Yang, L., & Zhang, L. (2009). ChemInform abstract: chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *ChemInform*, 40(33).
- Yesilada, O., Sam, M. (1998) *Toxicol. Environ. Chem.* 65, 87.

- Yesilada, O., Sik, S., Sam, M. (1998) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 37.
- Zadražil, F. (1975). Influence of CO₂ concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *European Journal of Applied Microbiology*, 1(4), 327-335.
- Zadražil, F. (1978). Cultivation of *Pleurotus*. *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, 521-557.
- Zenjari, B., Hajjouji, E., Baddi, G. A., Bailly, J. R., Revel, J. C., Nejmeddine, A., & Hafidi, M. (2006). Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater–straw mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3), pp. 433-437.
- 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.
- Zervakis GI, Ntougias S, Ouzounidou G, Gaitis F (2011). Treatment of two-phase olive mill wastes through commercial-scale composting and evaluation of the end-product for agricultural use. In *Lekkas TD (ed) Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST2011)*. Global NEST, Rhodes (Greece), pp A2083–A2089.
- Zervakis, G. & Balis, C. (1996). A pluralistic approach on the study of *Pleurotus* species, with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research* 100, 717-731.
- Zervakis, G.I., Koutrotsios, G. & Katsaris, P. (2013). Composted versus raw olive mill waste as substrates for the production of medicinal mushrooms - An assessment of selected cultivation and quality parameters. *BioMed Research International*, 13 pp.
- 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.
- Zhong, J., & Tang, Y. (2004). Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Biomanufacturing Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 25-59.
- Γεωργία και Κτηνοτροφία(6/2009).
- Θεριός, Ι. Ν. (2005). Ελαιοκομία
- Κυριτσάκης, Α. (2009). Το ελαιόλαδο, το πυρηνέλαιο και τα υπόπροϊόντα ελαιουργίας.
- Μπαλατσούρας, Γ. Δ. (1999). Σύγχρονη Ελαιοκομία-Η ελαιουργία.
- Μπαλατσούρας, Γ. Δ. (1999). Σύγχρονη Ελαιοκομία-Το ελαιόδενδρο.
- Ποντίκης, Κ. Α. (2000). Ειδική Δενδροκομία - Ελαιοκομία (Τόμ. 3). Αθήνα: Αθ. Σταμούλης.
- Σαρλής, Γ. Π. (1999). Συστηματική Βοτανική. Αθήνα: Σταμούλης.

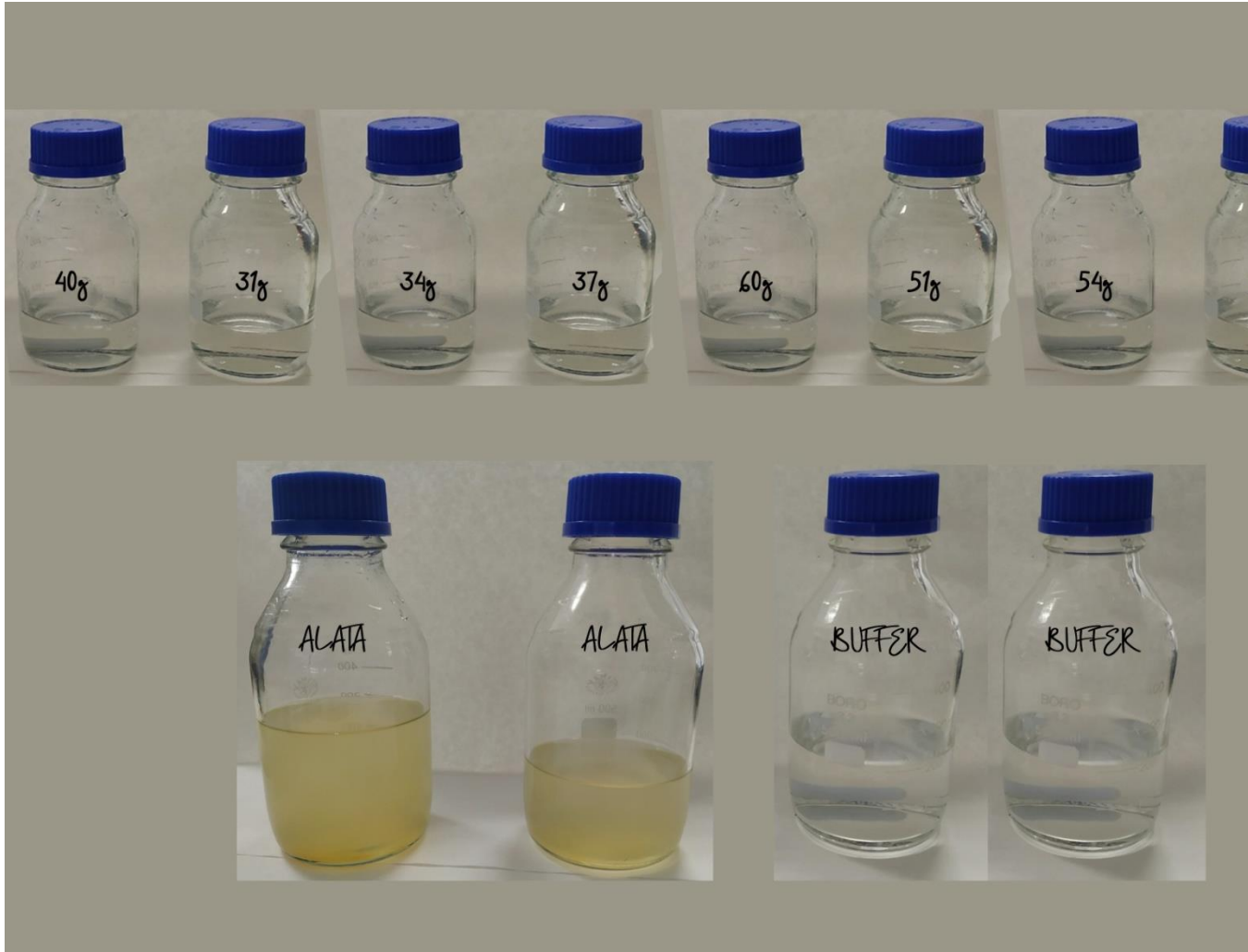
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



Εικόνα 13: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. pulmonarius* σε τρυβλία Petri 90mm με PDA



Εικόνα 14: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. pulmonarius* σε τρυβλία Petri 90mm με PDA



Εικόνα 15: Τα 8 διαφορετικά διαλύματα γλυκόζης, τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού οξέος και τα διαλύματα της πηγής αζώτου, μακροστοιχείων, ιχνοστοιχείων



Εικόνα 16: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. pulmonarius* σε μη αναδευόμενες στατικές καλλιέργειες στα 8 διαφορετικά θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη



Εικόνα 17: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. pulmonarius* σε μη αναδεδόμενες στατικές καλλιέργειες. Αριστερά είναι οι μάρτυρες 40 g/L και 60 g/L γλυκόζη και δεξιά έχει γίνει προσθήκη ΥΑΕ 10% v/v



Εικόνα 18: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. pulmonarius* σε μη αναδεδόμενες στατικές καλλιέργειες. Αριστερά είναι οι μάρτυρες 40 g/L και 60 g/L γλυκόζη και δεξιά έχει γίνει προσθήκη ΥΑΕ 20% v/v



Εικόνα 19: Ανάπτυξη του μακρομύκητα *P. pulmonarius* σε μη αναδεδυόμενες στατικές καλλιέργειες. Αριστερά είναι οι μάρτυρες 40 g/L και 60 g/L γλυκόζη και δεξιά έχει γίνει προσθήκη ΥΑΕ 30% v/v



Εικόνα 20: Επώση της καλλιέργειας σε θάλαμο θερμοκρασίας $26 (\pm 1) ^\circ\text{C}$