



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας
με έμφαση στα εμπορικά ένζυμα μέσω ζυμώσεων υγρής κατάστασης
με χρήση μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma*

Παρασκευή Χ. Αντωνοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας
με έμφαση στα εμπορικά ένζυμα μέσω ζυμώνσεων υγρής κατάστασης
με χρήση μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma*

"Identification and quantification of value-added metabolites with emphasis
on commercial enzymes through liquid-state fermentations using macrofungi
of the genus *Ganoderma*"

Παρασκευή Χ. Αντωνοπούλου

Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)
Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Αναπληρώτρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
Αργυρόπουλος Δημήτρης, Ερευνητής ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας με έμφαση στα εμπορικά ένζυμα μέσω ζυμώσεων υγρής κατάστασης με χρήση μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma*

ΠΜΣ: Επεξεργασία, Συντήρηση & Βιοτεχνολογικές Διεργασίες
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής μελέτης διερευνήθηκε η ανάπτυξη (ζύμωση) μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma* σε υγρές καλλιέργειες με διαφορετικά υποστρώματα για παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και εμπορικών ενζύμων (λιγνινολυτικών και υδρολυτικών) με δράση στην αποδόμηση σύνθετων υδατανθράκων και πολυμερών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν υγρά ελαιουργικά απόβλητα (ΥΕΑ), κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, άμυλο και λιγνίνη για την ανάπτυξη των τεσσάρων φαρμακευτικών μυκήτων *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* και *Ganoderma resinaceum*. Τα τέσσερα μανιτάρια αναπτύχθηκαν σε διάφορες πηγές άνθρακα (γλυκόζη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, άμυλο), με πηγή αζώτου πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, λόγο C/N=20 σε υγρές, κλειστού τύπου καλλιέργειες. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά αναλύσεων στα διηθήματα και στη παραγόμενη βιομάζα και με γνώμονα την απόδοση και τα ποιητικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα. Αρχικά, μετρήθηκε η παραγωγή μυκηλιακής μάζας, ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, ολικών φαινολικών ενώσεων, πρωτεϊνών και η κατανάλωση υποστρώματος (ολικά σάκχαρα και άζωτο ελευθέρων αμινομάδων), καθώς και ο βαθμός αποφαινώσεως και αποχρωματισμού στα υποστρώματα λιγνίνης και υγρών ελαιουργικών αποβλήτων. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ενεργότητα των λιγνινολυτικών ενζύμων όπως της λακκάσης, υπεροξειδασών εξαρτημένων και μη εξαρτημένων από το μαγγάνιο και υπεροξειδάσης εξαρτημένης της λιγνίνης αλλά και των υδρολυτικών ενζύμων, δηλαδή των ολικών κυτταρινασών, της αμυλάσης, ενδογλυκανάσης και ξυλανάσης. Τα δείγματα που εξετάστηκαν προέρχονταν από διαφορετικές ημέρες καλλιέργειας (διάρκεια ζύμωσης 32 ή 37 ημέρες αναλόγως το θρεπτικό μέσο και τον κύκλο ανάπτυξης του μύκητα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ό,τι αφορά την παραγωγή μυκηλιακής μάζας και τα 4 μανιτάρια εμφάνισαν μεγάλες τιμές παραγόμενης βιομάζας (από 13,20 έως 26,92 g/l) με το θρεπτικό υπόστρωμα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων να έχει παράξει τις μεγαλύτερες βιομάζες και στα 4 μανιτάρια και με τη μεγαλύτερη τιμή να παρουσιάζεται στο είδος *G. adspersum*. Όσο αυξανόταν η μυκηλιακή μάζα, η παραγωγή IPS αυξανόταν επίσης, παρουσιάζοντας τιμές $IPS_{max} = 0,33-12,64$ g/l με τις μεγαλύτερες τιμές IPS για όλα τα μανιτάρια, να εμφανίζονται στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης και με την μεγαλύτερη τιμή να παρουσιάζει το είδος *G. lucidum*. Επίσης, οι μεγαλύτερες τιμές %, κ.β. IPS (επί ξηρού) $IPS_{max}\% = 58,33-65,44$ % με το είδος *G. resinaceum* να παρουσιάζει την μέγιστη τιμή στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης. Όσον αφορά στην κατανάλωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης κατανάλωσε το μεγαλύτερο ποσοστό (64,48– 85,55%) στο μανιτάρι *G. adspersum*. Παρατηρήθηκε μεγάλη ικανότητα μείωσης του φαινολικού φορτίου του αποβλήτου και στα δύο θρεπτικά μέσα με μέγιστα ποσοστά αποφαινώσεως στο θρεπτικό μέσο των ΥΕΑ (66,58 – 72,12%) και ποσοστό (52,07 – 66,58%) για το θρεπτικό μέσο της λιγνίνης, την τελευταία ημέρα της ζύμωσης. Επιπλέον, τα μέγιστα ποσοστά αποχρωματισμού, στο υπόστρωμα λιγνίνης, (42,34– 78,59%) και ΥΕΑ (24,72 - 45,37%), καταγράφηκαν την τελευταία ημέρα της ζύμωσης. Η παραγωγή πρωτεϊνών κυμάνθηκε σε τιμές (9,31-15,16 % w/w) με τις μεγαλύτερες τιμές στο υπόστρωμα της κυτταρίνης και μέγιστη τιμή στο είδος *G. adspersum*. Όσον αφορά στην παραγωγή ενζύμων, μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας ενζύμου παρουσιάστηκαν στα λιγνολυτικά ένζυμα και συγκεκριμένα η λακκάση παρουσίασε τις μεγαλύτερες τιμές για τα υποστρώματα των

ΥΕΑ και για τα τέσσερα είδη (37,26 – 62,72 U/ml), με μεγαλύτερη τιμή να καταγράφεται στο είδος *G. lucidum* ενώ για το υπόστρωμα της λιγνίνης, παρουσίασε μέγιστες τιμές (3,63-8,99 U/ml) με μεγαλύτερη τιμή στο είδος *G. resinaceum*. Η υπεροξειδάση ανεξάρτητη του Μn παρουσίασε χαμηλές μέγιστες τιμές ενεργότητας για το υπόστρωμα ΥΕΑ (0,11-0,35 U/ml) με μέγιστη τιμή στο είδος *G. applanatum*, ενώ για το υπόστρωμα της λιγνίνης παρουσίασε τιμές (1,22-2,03 U/ml) με μέγιστη τιμή στο είδος *G. lucidum*. Προμοίως, η υπεροξειδάση εξαρτημένη του Μn παρουσίασε χαμηλές μέγιστες τιμές ενεργότητας για το υπόστρωμα ΥΕΑ (0,11-0,32 U/ml) με μέγιστη τιμή στο είδος *G. applanatum*, ενώ για το υπόστρωμα της λιγνίνης παρουσίασε τιμές (1,18-2,05 U/ml) με μέγιστη τιμή στο είδος *G. resinaceum*. Η υπεροξειδάση εξαρτημένη της λιγνίνης, παρουσίασε χαμηλές μέγιστες τιμές στο θρεπτικό υπόστρωμα της λιγνίνης (0,08 – 0,21 U/ml) με μέγιστη τιμή να παρουσιάζει το είδος *G. applanatum* όπως και για το θρεπτικό υπόστρωμα ΥΕΑ, παρουσίασε χαμηλές τιμές (0,11 – 0,26 U/ml) με μέγιστη τιμή στο είδος *G. adspersum*. Όσον αφορά στα υδρολυτικά ένζυμα, οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν χαμηλές. Οι μέγιστες τιμές ενεργότητας της ημικυτταρινάσης ήταν (0,94-1,87 U/ml) με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου να καταγράφεται στο είδος *G. resinaceum*. Οι μέγιστες τιμές ενεργότητας της αμυλάσης ήταν (1,05-2,12 U/ml), με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου να καταγράφεται στο είδος *G. lucidum*. Οι μέγιστες τιμές ενεργότητας των ολικών κυτταρινάσεων ήταν (0,97-1,36 U/ml), με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου στο είδος *G. applanatum*. Η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης ήταν πολύ χαμηλή (0,014-0,034 U/ml), με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου στο είδος *G. applanatum* ενώ στο υπόστρωμα αμύλου, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης παρουσίασε τιμές (0,008-0,046 U/ml) με μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου, στο είδος *G. applanatum*. Επιπλέον, στο υπόστρωμα κυτταρίνης, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης παρουσίασε τιμές (0,0029-0,0061 U/ml) με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, στο είδος *G. resinaceum*. Η προτεινόμενη μελέτη προσέφερε μια αποτελεσματική βιοδιεργασία αξιοποίησης υγρών ζυμώσεων των φαρμακευτικών μακρομυκκήτων του γένους *Ganoderma* για την παραγωγή προϊόντων υψηλής διατροφικής και οικονομικής αξίας με ταυτόχρονη μείωση του ρυπαντικού φορτίου των υποστρωμάτων στα οποία αναπτύχθηκαν.

Επιστημονική περιοχή: Υγρές καλλιέργειες Γανoderματος

Λέξεις κλειδιά: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma resinaceum*, υγρές καλλιέργειες, λιγνινολυτικά ένζυμα, υδρολυτικά ένζυμα, άμυλο, υγρά ελαιουργικά απόβλητα, ημικυτταρίνη, κυτταρίνη, λιγνίνη, πρωτεΐνες

Identification and quantification of value-added metabolites with emphasis on commercial enzymes through liquid-state fermentations using macrofungi of the genus *Ganoderma*

MSc: Processing, Preservation & Biotechnological Processes
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Microbiology & Food Biotechnology

ABSTRACT

The purpose of this research is to investigate the growth (fermentation) of macrofungi of the genus *Ganoderma* in liquid cultures with different substrates for the production of metabolic products and commercial enzymes (ligninolytic and hydrolytic) with action in the degradation of complex carbohydrates and polymers. More specifically, olive mill wastewater (OMW), cellulose, hemicellulose, starch and lignin were used to grow the four medicinal fungi *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma resinaceum*. The four mushrooms were grown on different carbon sources (glucose, cellulose, hemicellulose, lignin, starch), with nitrogen source peptone and yeast extract, with a C/N=20 ratio in liquid, closed-type cultures. A series of analyzes was carried out on the filtrates and on the produced biomass, and based on the yield and the poetic characteristics of the crop, the results were evaluated. Initially, the production of mycelial mass, intracellular polysaccharides, total phenolic compounds, proteins and substrate consumption (total sugars and free amino group nitrogen) were measured, as well as the degree of dephenolization and decolorization on lignin and OMW substrates. Then, the activity of ligninolytic enzymes such as laccase, manganese-dependent and non-dependent peroxidases and lignin-dependent peroxidase, but also hydrolytic enzymes, namely total cellulases, amylase, endoglucanase and xylanase, was determined. The samples examined came from different cultivation days (fermentation duration 32 or 37 days depending on the nutrient medium and the growth cycle of the fungus). The results showed that in terms of the production of mycelial mass, all 4 mushrooms showed high values of biomass produced (from 13.20 to 26.92 g/l) with the nutrient substrate of OMW having produced the highest biomass in all 4 mushrooms and with the highest value being presented of *G. adspersum* strain. As the mycelial mass increased, the IPS production also increased, presenting IPS_{max} values = 0.33 – 12.64 g/l with the highest IPS values for all mushrooms appearing on the hemicellulose substrate and with the highest value showing the strain *G. lucidum*. Also, the highest % values, by weight of IPS (dry basis) presented values of $IPS_{max}\%$ = 58.33-65.44% with the species *G. resinaceum* showing the maximum value on the hemicellulose substrate. Regarding the nitrogen consumption of free amino groups, the cellulose medium consumed the largest percentage (64.48 – 85.55%) with the species *G. adspersum* showing the maximum value. A great ability to reduce the phenolic load of the waste was observed in both nutrient media with maximum percentages of dephenolization in the nutrient medium of OMW (66.58 – 72.12%) and percentage (52.07 – 66.58%) for the nutrient medium of lignin, on the last day of fermentation. In addition, the maximum percentages of decolorization, in the lignin substrate, (42.34-78.59%) and percentage for OMW (24.72 - 45.37%), which were recorded on the last day of fermentation. Protein production ranged in values (9.31 – 15.16% w/w) with the highest values in the cellulose substrate and a maximum value of *G. adspersum* strain. Regarding the production of enzymes, higher values of enzyme activity were presented in the ligninolytic enzymes and in particular laccase showed the highest values for the substrates of the OMW for all four species (37.26 – 62.72 U/ml), with a higher value being recorded of *G. lucidum* strain, while for the lignin substrate it presented values (3.63-8.99 U/ml) with a maximum value of *G. resinaceum* strain. The Mn-independent peroxidase presented low maximum activity values for the OMW substrate (0.11-0.35 U/ml) with a maximum value of *G. applanatum* strain, while for the lignin

substrate it presented values (1.22-2.03 U/ml) with a maximum value of *G. lucidum* strain. Similarly, the Mn-dependent peroxidase showed low maximum activity values for the OMW substrate (0.11-0.32 U/ml) with a maximum value of *G. applanatum* strain, while for the lignin substrate it showed values (1.18-2.05 U/ml) with a maximum value of *G. resinaceum* strain. The lignin-dependent peroxidase presented low maximum values in the lignin nutrient medium (0.08–0.21 U/ml) with a maximum value presented by *G. applanatum* as for the OMW nutrient medium, it presented low values (0.11–0.26 U/ml) with a maximum value of *G. adspersum*. As for hydrolytic enzymes, the values recorded were low. The maximum hemicellulase activity values were (0.94–1.87 U/ml) with the highest enzyme production recorded of *G. resinaceum*. The maximum amylase activity values were (1.05-2.12 U/ml), with the highest enzyme production recorded of *G. lucidum*. The maximum activity values of total cellulases were (0.97-1.36 U/ml), with the highest enzyme production of *G. applanatum*. The endoglucanase enzyme activity in the hemicellulose substrate was very low (0.014-0.034 U/ml), with the highest enzyme production of *G. applanatum* strain, while in the starch substrate, the endoglucanase enzyme activity presented values (0.008-0.046 U/ml) with greater enzyme production, of *G. applanatum*. Furthermore, in the cellulose substrate, endoglucanase enzyme activity showed values (0.0029-0.0061 U/ml) with the highest endoglucanase enzyme production, of *G. resinaceum*. The proposed study offered an efficient bioprocess utilizing liquid fermentations of medicinal macrofungi of the genus *Ganoderma* for the production of products of high nutritional and economic value while simultaneously reducing the pollutant load of the substrates in which they were grown.

Scientific area: *Ganoderma* liquid cultures

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma resinaceum*, liquid cultures, ligninolytic enzymes, hydrolytic enzymes, starch, olive mill wastewater, hemicellulose, cellulose, lignin, proteins

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία αποτελεί τη μεταπτυχιακή μου διατριβή, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων (ΕΕΜ) του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων/ ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ υπό την αιγίδα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022. Με την ολοκλήρωση της ερευνητικής μου εργασίας, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που συνέβαλαν, ο καθένας με τον τρόπο του, στην πραγματοποίηση της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, κ. Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτή Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ και σε μεταπτυχιακό επίπεδο με το ερευνητικό αντικείμενο που με ενδιαφέρει ιδιαίτερα, αυτό της Βιοτεχνολογίας και Κυκλικής Οικονομίας και την εμπιστοσύνη του να εργαστώ υπό την επίβλεψή του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Δρ. Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές, την καθοδήγηση και φυσικά για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε γύρω από την έρευνα καθ' όλη την διάρκεια τόσο της εκπόνησης του πειραματικού μέρους όσο και της συγγραφής της συγκεκριμένης μελέτης και την φιλοξενία που μου παρείχε στο εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ.

Ευχαριστώ τον κ. Αργυρόπουλο Δημήτρη Εντεταλμένο Ερευνητή ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ για την συνεργασία κατά την διεξαγωγή πειραμάτων στο Εργαστήριο Γενετικής Ταυτοποίησης (ΕΓΕΤΑ) του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του ΕΕΜ, τους υποψήφιους διδάκτορες Δεδούση Μαριάννα, Διαμάντη Ηλία, Μελανούρη Ειρήνη και την μεταδιδάκτορα Χημικό Κατερίνα Φουρτάκα για την υποστήριξη και την αποτελεσματική μας συνεργασία σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την ουσιαστική βοήθεια και υποστήριξή τους.

Αντωνοπούλου Παρασκευή
Αθήνα, 2022

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 12 |
| 1.1 Γενικά στοιχεία για τους μακρομύκητες..... | 12 |
| 1.2 Μακρομύκητας Γανόδερμα (<i>Ganoderma</i>)..... | 14 |
| 1.2.1 Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων – γένος <i>Ganoderma</i> | 17 |
| 1.3 Στερεή καλλιέργεια & υγρή καλλιέργεια..... | 24 |
| 1.3.1 Καλλιέργεια σε υγρά θρεπτικά μέσα (ζυμώσεις βυθού) | 24 |
| 1.4 Αξιοποίηση μανιταριών από τον άνθρωπο | 26 |
| 1.5 <i>Ganoderma</i> , οφέλη και ιδιότητες | 27 |
| 1.6 Αντιοξειδωτικές ουσίες μακρομυκήτων | 29 |
| 1.6.1 Σύνθεση πολυσακχαριτών | 29 |
| 1.6.2 Φαινολικά συστατικά | 31 |
| 1.7 Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα..... | 32 |
| 1.8 Αξιοποίηση γεωργο-βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων | 33 |
| 1.8.1 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου και η χρήση τους σαν συστατικά υποστρώματος καλλιέργειας μυκήτων..... | 35 |
| 1.8.2 Φυτικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά της κυτταρίνης..... | 36 |
| 1.8.3 Φυτικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά ημικυτταρίνης..... | 36 |
| 1.8.4 Λιγνίνη | 37 |
| 1.8.5 Άμυλο | 39 |
| 1.9 Ένζυμα..... | 40 |
| 1.9.1 Λιγνινολυτικά ένζυμα..... | 42 |
| 1.9.2 Ένζυμα υδρόλυσης..... | 44 |
| 1.10 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων | 45 |
| 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 47 |
| 2.1 Γενική Παρουσίαση..... | 47 |
| 2.2 Θρεπτικά υλικά καλλιέργειας | 47 |
| 2.2.1 Βιολογικό υλικό | 47 |
| 2.2.2 Θρεπτικό υλικό προκαλλιέργειας..... | 48 |
| 2.2.3 Θρεπτικό υλικό υγρής ζύμωσης | 49 |
| 2.2.4 Πειράματα υγρής ζύμωσης..... | 51 |
| 2.3 Παραλαβή και ανάλυση..... | 52 |
| 2.3.1 Αναλύσεις στο θρεπτικό υλικό - υγρό ζύμωσης..... | 52 |
| 2.3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων (Μέθοδος Folin-Ciocalteu) | 53 |
| 2.3.3 Προσδιορισμός σακχάρων στο υγρό ζύμωσης με τη μέθοδο DNS..... | 53 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 2.3.4 | Προσδιορισμός σακχάρων στο υγρό ζύμωσης με τη μέθοδο Dubois | 54 |
| 2.3.5 | Προσδιορισμός ικανότητας αποχρωματισμού..... | 55 |
| 2.3.6 | Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων με την μέθοδο FAN | 56 |
| 2.4 | Αναλύσεις στο μυκήλιο | 57 |
| 2.4.1 | Συλλογή και προσδιορισμός βιομάζας – Λυοφιλίωση | 57 |
| 2.4.2 | Προσδιορισμός πρωτεϊνών στο μυκήλιο | 57 |
| 2.4.3 | Προσδιορισμός ποσότητας παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS) | 58 |
| 2.5 | Ενζυμικές αναλύσεις | 59 |
| 2.5.1 | Προσδιορισμός Λακκάσης | 59 |
| 2.5.2 | Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη και μη του Μαγγανίου .. | 60 |
| 2.5.3 | Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) | 61 |
| 2.5.4 | Προσδιορισμός ενδογλυκανάσης | 61 |
| 2.5.5 | Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας των ολικών κυτταρινασών | 62 |
| 2.5.6 | Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της ημικυτταρινάσης..... | 62 |
| 2.5.7 | Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της αμυλάσης | 63 |
| 2.6 | Προσδιορισμός ενεργής οξύτητας (pH) | 64 |
| 3 | Αποτελέσματα | 65 |
| 3.1 | Γενική παρουσίαση | 65 |
| 3.2 | Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών βιομάζας και μεταβολιτών..... | 66 |
| 3.3 | Παραγωγή βιομάζας..... | 70 |
| 3.4 | Κατανάλωση ολικών σακχάρων/υποστρώματος | 75 |
| 3.4.1 | Κατανάλωση σακχάρων του υποστρώματος σε σύγκριση με τη βιομάζα | 79 |
| 3.5 | Κατανάλωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στα θρεπτικά μέσα | 84 |
| 3.6 | Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, αποχρωματισμός, αποφαινόλωση. | 88 |
| 3.7 | Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) | 92 |
| 3.9 | Παραγωγή Πρωτεϊνών | 98 |
| 3.10 | Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων..... | 99 |
| 3.10.1 | Προσδιορισμός ενεργότητας λακκάσης | 99 |
| 3.10.2 | Προσδιορισμός ενζύμου υπεροξειδάσης εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου. | 101 |
| 3.10.3 | Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης..... | 104 |
| 3.10.4 | Παραγωγή ενζύμου Ημικυτταρινάσης | 106 |
| 3.10.5 | Παραγωγή ενζύμου Αμυλάσης..... | 106 |
| 3.10.6 | Παραγωγή ολικών κυτταρινασών | 107 |
| 3.10.7 | Παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης..... | 108 |
| 3.11 | Ενεργός οξύτητα (pH) στα υγρά θρεπτικά μέσα..... | 109 |
| 3 | Συζήτηση..... | 112 |

| | |
|---|-----|
| 4.1 Κινητική παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης σακχάρων, συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών των τεσσάρων μανιταριών <i>Ganoderma</i> | 113 |
| 4.1.1 Παραγωγή βιομάζας..... | 113 |
| 4.1.2 Κατανάλωση υποστρώματος..... | 115 |
| 4.1.3 Προσδιορισμός παραγόμενων IPS | 116 |
| 4.2 Κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων για τα τέσσερα μανιτάρια του <i>Ganoderma</i> | 118 |
| 4.3 Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, αποφαινόλωση και αποχρωματισμός στα υγρά θρεπτικά μέσα..... | 119 |
| 4.4 Πρωτεΐνες..... | 120 |
| 4.5 Παραγωγή ενζύμων..... | 121 |
| 5 Συμπεράσματα..... | 125 |
| 6 Βιβλιογραφία..... | 126 |
| Παράρτημα φωτογραφιών..... | 136 |

Πίνακας Εικόνων

| | |
|---|-----|
| Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός μανιταριού (Lull et al.,2005) | 16 |
| Εικόνα 2: Τα μελετώμενα μανιτάρια της παρούσας εργασίας (Ευσταθιάδου, 2016) | 16 |
| Εικόνα 3. Μορφολογία του <i>Ganoderma lucidum</i> (O'Reilly P., 2016). | 18 |
| Εικόνα 4: Μορφολογία του <i>Ganoderma resinaceum</i> (O'Reilly P., 2016)..... | 20 |
| Εικόνα 5: Μορφολογία του <i>Ganoderma applanatum</i> (O'Reilly P., 2016)..... | 21 |
| Εικόνα 6: Μορφολογία του <i>G. adspersum</i> (Arulprandi & Kalaichelvan, 2013). | 23 |
| Εικόνα 7: Είδη φαρμακευτικών μυκήτων υπό μορφή εμβολίου διαμέτρου 3 mm μέσα σε αποστειρωμένο νερό στους 5±0,5 °C και φέρουν κωδικό αριθμό καταχώρησης AMRL (Athens Mushroom Research Laboratory)..... | 48 |
| Εικόνα 8: Ανάπτυξη μυκηλίου σε τρυβλία με PDA α) ανάπτυξη μύκητα 4 ημερών β) ανάπτυξη μύκητα 7 ημερών γ) ανάπτυξη μύκητα 10 ημερών | 49 |
| Εικόνα 9: Εμβολιασμός κωνικών φιαλών, για κάθε μύκητα, υπό ασηπτικές συνθήκες σε περιβάλλον laminar..... | 51 |
| Εικόνα 10: Αρχικό θρεπτικό υπόστρωμα σε δοχείο mccartney α) 2 φιαλίδια υγρών ελαιουργικών αποβλήτων,..... | 51 |
| Εικόνα 11: Επώαση της καλλιέργειας σε θάλαμο θερμοκρασίας 26±1 °C υπό στατικές συνθήκες (Velp, model FOC 225E, Italy) | 52 |
| Εικόνα 12: Μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP) | 60 |
| Εικόνα 13: Ανάπτυξη ειδών <i>Ganoderma</i> , <i>G. resinaceum</i> (αριστερά), <i>G. adspersum</i> (δεξιά) σε τρυβλία petri 90 mm με PDA (Merck, Darmstadt, Germany). | 136 |
| Εικόνα 14: Ανάπτυξη μανιταριών γένους <i>G. lucidum</i> , στο θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, 16η ημέρα ζύμωσης. | 136 |
| Εικόνα 15: Ανάπτυξη είδους <i>G. adspersum</i> στο θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης, 16η ημέρα ζύμωσης. | 137 |
| Εικόνα 16: Ανάπτυξη είδους <i>G. adspersum</i> στο θρεπτικό μέσο κυτταρίνης, 8η ημέρα ζύμωσης. | 137 |
| Εικόνα 17: Ανάπτυξη είδους <i>G. resinaceum</i> στο θρεπτικό μέσο αμύλου, 16 ^η ημέρα ζύμωσης. | 138 |
| Εικόνα 18: Ανάπτυξη είδους <i>G. adspersum</i> στο θρεπτικό μέσο λιγνίνης, την 16η ημέρα ζύμωσης. . | 139 |
| Εικόνα 19: Ανεπτυγμένα μυκήλια στην τελευταία ημέρα ζύμωσης για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης. α) <i>G. adspersum</i> β) <i>G. applanatum</i> γ) <i>G. lucidum</i> δ) <i>G. resinaceum</i> | 139 |

Πίνακας Πινάκων

| | |
|---|-----|
| Πίνακας 1: Ταξινόμηση μανιταριών <i>Ganoderma</i> (Shao et al., 2004)..... | 16 |
| Πίνακας 2: Εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της λιγνίνης (Hattaka, 2001)..... | 39 |
| Πίνακας 3: Τα είδη μακρομυκήτων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία | 48 |
| Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των πέντε θρεπτικών μέσων αμύλου, κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, λιγνίνης και υγρών ελαιουργικών αποβλήτων (A-30, K-30, Λ-30, ΥΕΑ-30, Η-30)..... | 50 |
| Πίνακας 5: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, IPS, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του <i>G. adspersum</i> στα πέντε υποστρώματα (ΥΕΑ-30 Λ-30, A-30, K-30, Η-30)..... | 67 |
| Πίνακας 6: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του <i>G. resinaceum</i> , στα πέντε υποστρώματα (ΥΕΑ-30, Λ-30, A-30, K-30, Η-30)..... | 68 |
| Πίνακας 7: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του <i>G. arplanatum</i> , στα πέντε υποστρώματα (ΥΕΑ-30, Λ-30, A-30, K-30, Η-30)..... | 69 |
| Πίνακας 8: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του <i>G. lucidum</i> , στα πέντε υποστρώματα (ΥΕΑ-30, Λ-30, A-30, K-30, Η-30)..... | 70 |
| Πίνακας 9: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και ποσοστό αποφαινόλωσης των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> κατά την καλλιέργειά τους για τα θρεπτικά μέσα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων και λιγνίνης..... | 88 |
| Πίνακας 10: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> για το θρεπτικό μέσο ΥΕΑ..... | 92 |
| Πίνακας 11: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης..... | 93 |
| Πίνακας 12: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης..... | 94 |
| Πίνακας 13: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> για το θρεπτικό μέσο άμυλο..... | 95 |
| Πίνακας 14: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνη..... | 96 |
| Πίνακας 15: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών <i>Ganoderma</i> για όλα τα θρεπτικά μέσα..... | 97 |
| Πίνακας 16: Πορεία ενεργούς οξύτητας (pH) των τεσσάρων ειδών του μύκητα <i>Ganoderma</i> στα πέντε διαφορετικά θρεπτικά μέσα..... | 110 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τους μακρομύκητες

Ως μανιτάρια ορίζονται οι μακρομύκητες με διακριτά καρποσώματα που αναπτύσσονται υπέργεια ή υπόγεια και αποτελούν μια κατηγορία της ομάδας των μυκηλιακών μυκήτων (Chang & Miles, 1997). Πιο συγκεκριμένα, μανιτάρια ονομάζονται οι μακροσκοπικές καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής, κυρίως των βασιδιομυκήτων και δευτερευόντως των ασκομυκήτων που χαρακτηρίζονται ως μακρομύκητες. Η λέξη μανιτάρι είναι παραφθορά της λέξης “αμανίτης” που χαρακτηρίζει τα είδη του γένους *Amanita* και κατ’ επέκταση είδη με σαρκώδεις καρποφορίες. Οι μύκητες (FUNGI), σύμφωνα με το πλέον αποδεκτό ταξινομικό σχήμα του Whittaker (1959), αποτελούν ένα από τα 5 Βασίλεια στα οποία κατατάσσονται τα έμβια όντα με κυτταρική δομή (τα υπόλοιπα: ANIMALIA, PLANTAE, PROTISTA, MONERA) και είναι το δεύτερο σε πλήθος ειδών άθροισμα (μετά τα έντομα) στον πλανήτη. Ο πληθυσμός των μυκήτων σε όλο το κόσμο εκτιμάται σε 140.000 είδη με τα γνωστά είδη μανιταριών που έχουν καταγραφεί να αποτελούν τουλάχιστον 14.000, γεγονός που υποδηλώνει ότι σχεδόν μόνο το 10% είναι ακόμη γνωστό (Hawksworth, 2001). Παγκοσμίως είναι γνωστά περίπου 20.000 είδη βασιδιομυκήτων και 30.000 είδη ασκομυκήτων (Groombridge et al., 2002).

Οι μύκητες είναι χημειοργανότροφοι (τρέφονται με οργανικά), ετερότροφοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι ζουν παρασιτικά και σαπροφυτικά (τρέφονται από νεκρή οργανική ύλη) απορροφώντας μόρια τροφής από τον ξενιστή και το περιβάλλον. Τα κύτταρά τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα με κύριο συστατικό τη χιτίνη ωστόσο δεν περιέχουν χλωροφύλλη, οπότε αδυνατούν να φωτοσυνθέσουν. Ο τρόπος θρέψης τους είναι χαρακτηριστικός, αφού προσλαμβάνουν την τροφή τους με απορρόφηση, σε πολλές περιπτώσεις μετά τη διάσπαση της με εξωκυτταρικά ένζυμα που εκκρίνονται από τις υφές τους.

Έχουν διαστάσεις μικρότερες από την ικανότητα του γυμνού οφθαλμού ωστόσο γίνονται ορατοί όταν σχηματίσουν καρποφορίες που μπορεί να εκτείνονται από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και μισό μέτρο. Στο μανιτάρι υπάρχουν δύο τμήματα, το καρπόσωμα είναι το σώμα το οποίο φαίνεται και το μυκήλιο ή αλλιώς θαλλός είναι το σώμα που δεν φαίνεται. Το μυκήλιο αναπτύσσεται στο υπόστρωμα και είναι το βλαστικό σώμα του μανιταριού από το οποίο θα προέλθει το καρπόσωμα. Το καρπόσωμα συνήθως έχει σχήμα

ομπρέλας και ονομάζεται πύλος ή καπέλο και στηρίζεται σε πόδι (στύπος). Το μυκήλιο είναι το φυτικό μέρος ενός μύκητα (κοινώς τα σώματα των μυκήτων), το οποίο αποτελείται από μια διακλαδωτική μάζα, με νηματώδη υφή. Οι μακρομύκητες βρίσκονται το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα του βιολογικού κύκλου ζωής τους ως μυκήλιο. Το μυκήλιο αποικεί στο υπόστρωμα απορροφώντας θρεπτικά συστατικά με σκοπό να χρησιμοποιηθούν αργότερα στο στάδιο της καρποφορίας. Ο σχηματισμός των καρποσωμάτων (μανιταριών) ξεκινά όταν αναπτυχθούν κάτω από την επιφάνεια του υποστρώματος μικροί 'κόμποι' που ονομάζονται καταβολές (primordia) οι οποίες καταβολές αυξάνονται σε μέγεθος και σε ευνοϊκές συνθήκες (επαρκές νερό και θρεπτικά συστατικά), θα δημιουργηθούν τα ώριμα μανιτάρια που φέρουν τα σπόρια, μέσω των οποίων οι μακρομύκητες αναπαράγονται εγγενώς. Το καρπόσωμα αποτελεί το αναπαραγωγικό μέρος του μακρομύκητα το οποίο συνήθως αναπτύσσεται υπέργεια και συναντάται σε ποικίλα μεγέθη, σχήματα και χρώματα, ανάλογα με το είδος του μανιταριού. Τα καρποσώματα έχουν τέτοιο μέγεθος ώστε να είναι ορατά με γυμνό μάτι και έχει διάρκεια ζωής περίπου 10-14 ημέρες με σκοπό την παραγωγή σπορίων για την διαίωσιση του είδους. Για την συνέχιση του κύκλου ζωής τους, τα μανιτάρια ελευθερώνουν τα σπόριά τους από το ώριμο πλέον καρπόσωμα, το οποίο αρχίζει να αποσυντίθεται, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του μακρομύκητα (μυκήλιο) έχει μεγάλη διάρκεια ζωής.

Οι μύκητες μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι. Οι πολυκύτταροι μύκητες αποτελούνται από τις υφές δηλαδή τις νηματοειδής κατασκευές και τα μυκήλια. Ένας μύκητας αποτελείται από μία μάζα διακλαδισμένων, κυλινδρικών νηματίων που ονομάζονται υφές. Το μυκήλιο δημιουργείται από τις υφές, οι οποίες είναι διακλαδισμένα νημάτια μικρής διαμέτρου. Οι υφές χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες είναι οι συνεχείς, οι κοινοκυτταρικές και οι πολυκυτταρικές. Οι υφές είναι τα κύτταρα των μυκήτων που αποτελούνται από το πρωτόπλασμα στο οποίο περιέχονται τα κυτταρικά οργανίδια με τον πυρήνα του κυττάρου και το πρωτόπλασμα περιβάλλεται από πρωτοπλασματική μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα. Στις κοινοκυτταρικές υφές οι πυρήνες είναι διάσπαρτοι στο κυτταρόπλασμα. Στις πολυκυτταρικές υφές, κάθε κύτταρο μπορεί να περιέχει έναν, δύο, ή πολλούς πυρήνες, ανάλογα με τον τύπο του μύκητα και το στάδιο ανάπτυξης της υφής.

Στη συντριπτική τους πλειονότητα, οι μύκητες έχουν την ιδιότητα να αναπαράγονται και να πολλαπλασιάζονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες, τα σπόρια, τα οποία κατά κανόνα σχηματίζονται από εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα. Ανάλογα με τον τρόπο εμφάνισης των σπορίων οι μακρομύκητες διαχωρίζονται σε βασιδιομύκητες, των οποίων τα σπόρια (βασιδιοσπόρια) δημιουργούνται πάνω σε μικροσκοπικά ροπαλόμορφα όργανα τα βασίδια και σε ασκομύκητες, των οποίων τα σπόρια (ασκοσπόρια)

αναπτύσσονται μέσα σε αυγόμορφους ή επιμήκεις σάκους, τους ασκούς. Για την συνέχιση του κύκλου ζωής τους, τα μανιτάρια ελευθερώνουν τα σπόριά τους από το ώριμο πλέον καρπόσωμά τους, το οποίο αρχίζει να αποσυντίθεται, ενώ το μυκήλιο συνεχίζει να επιβιώνει για χρόνια. Τα μανιτάρια στην πλειονότητα τους ανήκουν στην κλάση των Βασιδιομυκήτων (Basidiomycetes) που περιλαμβάνει περίπου το 25% του συνόλου των μυκήτων και δευτερευόντως στην κλάση των Ασκομηκήτων (Ascomycetes) (Chang & Miles, 1997).

Τα μανιτάρια χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, τα σαρκώδη- εδώδιμα μανιτάρια (π.χ. *Morchella* spp.), τα φαρμακευτικά μανιτάρια (π.χ. *Ganoderma lucidum*), τα μανιτάρια που χαρακτηρίζονται ως δηλητηριώδη (π.χ. *Amanita phalloides*) και διάφορα είδη μανιταριών των οποίων οι ιδιότητες δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, εκ των οποίων ένα μανιτάρι μπορεί να ανήκει σε πάνω από μία κατηγορία ταυτόχρονα (Miles and Chang, 2004).

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα 2.500 περίπου είδη μυκήτων, από τα οποία τουλάχιστον 900 κατατάσσονται στους μακρομύκητες με καρποσώματα που θεωρούνται μανιτάρια (Zervakis et al., 2002). Από τα γνωστά μανιτάρια, 3.000 είδη χαρακτηρίζονται ως εδώδιμα εκ των οποίων 200 συλλέγονται συστηματικά από την ύπαιθρο και περισσότερα από 1.000 ως φαρμακευτικά (Miles and Chang, 2004).

1.2 Μακρομύκητας Γανόδερμα (*Ganoderma*)

Το Γανόδερμα (*Ganoderma*) που το Ιαπωνικό του όνομα είναι Reishi ή Mannetake και σημαίνει μανιτάρι της αθανασίας είναι ένας λευκός βασιδιομύκητας (*basidiomycete macrofungus*), ευρέως διαδεδομένο γένος της Οικογένειας των Γανοδερμοειδών. Ο μυκητολόγος Karsten εμπνεύστηκε το όνομα, 1881 (Zhou κ.ά., 2015). Τα περισσότερα είδη *Ganoderma* είναι μύκητες λευκής σήψης και είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι και οι πιο αποδοτικοί αποδομητές στη φύση, αποδομώντας τα συστατικά των τοιχωμάτων των κυττάρων του ξύλου (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη) (Adaskaveg & Gilbertson 1994).

Το γένος *Ganoderma* ανήκει στην τάξη Πολυπορώδη *Polyporales*, οικογένεια Γανοδερμοειδή *Ganodermataceae* και απαρτίζεται από 6 κύριες ομάδες στις οποίες εντάσσονται περισσότερα από 200 είδη (Hong και Jung, 2004).

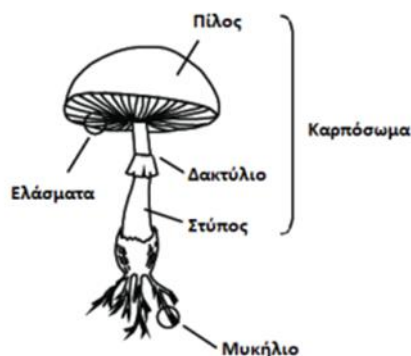
Η ετυμολογία της λέξης γένους *Ganoderma* προέρχεται από την Ελληνική λέξη γάνος και δέρμα που σημαίνει λαμπερό δέρμα ενώ παράλληλα, τα μανιτάρια αυτά έχουν σκληρή και δερματώδη υφή, καθιστώντας τα μη εδώδιμα. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτει σκληρό και

δερματώδες έως ξυλώδες βασιδιοκάρπιο που ονομάζονται πολύποροι και το χρώμα του είναι σκούρο με γυαλιστερή και ξυλώδη υφή και αρκετά πικρή γεύση. Οι μύκητες λευκής σήψης αποτελούν σαπροφυτικούς βασιδιομύκητες στην συντριπτική τους πλειοψηφία, απορροφώντας μόρια τροφής από τον ξενιστή και το περιβάλλον.

Το γένος *Ganoderma* μπορεί να επιβιώσει σε ζεστά και υγρά περιβάλλοντα όπως είναι οι υποτροπικές και οι τροπικές περιοχές ενώ λίγα είδη συναντάει κανείς στα βόρεια κλίματα (Moncalvo & Ryvarden 1998). Ωστόσο, ευδοκμεί σε εύκρατες περιοχές και αναπτύσσεται συνήθως πάνω σε νεκρούς κορμούς και θαμμένες ρίζες πλατύφυλλων φυλλοβόλων και σπανιότερα κωνοφόρων δέντρων έχοντας διπλά τοιχώματα, εντός των οποίων βρίσκονται σπόρια με κίτρινο έως καφέ χρώμα. Όσον αφορά στις υφές του, είναι τριμιτικές και ως μύκητες λευκής σήψης, μπορούν να αποδομούν ξυλώδη κυτταρικά τοιχώματα με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της επιλεκτικής αποξύλωσης και ταυτόχρονης σήψης (Schwarze και Ferner, 2003).

Τα καρποσώματα των μανιταριών *Ganoderma*, αναπτύσσονται είτε ως βιοτροφικά σε ζωντανά δέντρα, είτε ως νεκρότροφα σε νεκρά δέντρα, κορμούς και κούτσουρα και προκαλούν χαρακτηριστική λευκή σήψη όταν αναπτύξουν το μυκήλιο τους σε νεκρή οργανική ύλη όπως ξύλα και γενικά υποστρώματα πλούσια σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Τα καρποσώματα των βασιδιομυκήτων αποτελούνται στη βασική τους μορφή από τον πύλο, τον στίπο και στην κάτω επιφάνειά του βρίσκεται ο υμενοφόρος, ο οποίος φέρει ελάσματα και περιέχει τα αναπαραγωγικά όργανα των βασιδιομυκήτων (Εικόνα 1).

Η πιο αποτελεσματική αποδόμηση στη φύση γίνεται από τους μύκητες που έχουν την δυνατότητα να αποδομήσουν τις κυτταρίνες αλλά και τη λιγνίνη. Ο *Ganoderma* είναι ένας μύκητας λευκής σήψης, ο οποίος εμπλέκεται στη θεμελιώδη διαδικασία της αποικοδόμησης λιγνοκυτταρίνης στη φύση (Paterson, 2006). Οι μύκητες λευκής σήψης αρχικά διασπούν τη λιγνίνη ώστε να έχουν πρόσβαση στις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες και ακόμη, μπορούν να αποδομήσουν και τις φαινολικές ενώσεις, λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν με τη λιγνίνη (Eriksson, et al., 1990). Είναι υπεύθυνα για την αποσύνθεση των κωνοφόρων και των σκληρών ξύλων σε όλο τον κόσμο. Η σήψη των ριζών και των στελεχών που προκαλείται από το γένος *Ganoderma* έχει ως αποτέλεσμα παγκόσμιες απώλειες πολλών καλλιεργειών και δέντρων (Martinez et al. 1994, Miller et al. 1995).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός μανιταριού (Lull et al., 2005)

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, επικεντρώνεται στην μελέτη τεσσάρων φαρμακευτικών μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma* που κατατάσσονται στην κατηγορία των βασιδιομυκήτων λευκής σήψης και έχουν χρησιμοποιηθεί για ιατρικούς σκοπούς εδώ και αιώνες κυρίως στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Κορέα (Russell και Paterson, 2006). Αυτοί είναι οι εξής: *G. adspersum*, *G. resinaceum*, *G. applanatum* και *G. lucidum*, απεικονίζονται στην Εικόνα 2 και η συστηματική ταξινόμηση τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 2: Τα μελετώμενα μανιτάρια της παρούσας εργασίας (Ευσταθιάδου, 2016)

Πίνακας 1: Ταξινόμηση μανιταριών *Ganoderma* (Shao et al., 2004).

| | |
|-------------------------|--|
| Βασίλειο | Μύκητες |
| Ταξινομική ομάδα | Βασιδιομύκητες (<i>Basidiomycota</i>) |
| Ομοταξία | Αγαρικομύκητες (<i>Agaricomycetes</i>) |
| Τάξη | Πολυπορώδη (<i>Polyporales</i>) |
| Οικογένεια | Γανοδερμοειδή (<i>Ganodermataceae</i>) |
| Γένος | Γανόδεσμα (<i>Ganoderma</i>) |

1.2.1 Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων – γένος *Ganoderma*

Τα μανιτάρια του γένους *Ganoderma* αναπτύσσονται σαπροφυτικά (λαμβάνουν την τροφή τους από νεκρή οργανική ύλη) ή παρασιτικά (απορροφούν θρεπτικές ουσίες από ζωντανούς οργανισμούς) σε φυλλοβόλα και κωνοφόρα δέντρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία κινητοποίησης των θρεπτικών στοιχείων των ξυλωδών φυτών. Οι βασιδιομύκητες αναπαράγονται εγγενώς και η αναπαραγωγική δομή είναι το βασίδιο. Το καλοκαίρι και το φθινόπωρο τα καρποφόρα σώματα απελευθερώνουν εκατομμύρια σπόρια στον αέρα. Στο φυσικό περιβάλλον, ένα βασιδίωμα έχει την ικανότητα να παράγει αναρίθμητα βασιδιοσπόρια που μπορούν να εξαπλωθούν από τον αέρα ή τη βροχή ή μέσω εντόμων (Tuno 1999, Kadowaki et al. 2011, Almaguer et al. 2014, Sadyś et al. 2014). Αυτά τα σπόρια εμψυθούνται σε νέα μέρη και εάν οι συνθήκες είναι κατάλληλες, το σπόριο μπορεί να βλαστήσει σχηματίζοντας μια πρωτογενής υφή. Υφή χαρακτηρίζεται καθένα από τα διακλαδιζόμενα νημάτια που αποτελούν το μυκήλιο ενός μύκητα. Η μόλυνση ενός φυτού ξεκινά από το παθογόνο είδος *Ganoderma* ξεκινά με την προσγείωση του βασιδιοσπορίου στον κορμό ή τη ρίζα του τραύματος, ακολουθούμενη από βλάστηση και αποικισμό (Rees et al. 2009, Hushiarian et al. 2013, Ayin et al. al. 2019). Ο μύκητας βρίσκεται σε δικαρυονική κατάσταση ($n+n$) μην μπορώντας να παράγει δευτερεύουσα υφή για να βοηθήσει στην ανάπτυξη. Αυτή η δευτερεύουσα υφή παράγει μια πολύ ισχυρή χημική ουσία αποσύνθεσης που ονομάζεται υδρολάση για να βοηθήσει στη διάσπαση του ξύλου. Εφόσον η πηγή ξύλου είναι επαρκής, η δευτερεύουσα υφή μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται για πολλά χρόνια. Αυτές οι υφές μπορούν να διακλαδωθούν προκειμένου να αυξήσουν την επιφάνεια για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Όλες αυτές οι υφές συνδυασμένες μαζί είναι γνωστές ως μυκήλιο. Όταν οι συνθήκες τελικά γίνουν ακατάλληλες για βέλτιστη ανάπτυξη, ο μύκητας πρέπει να παράγει ένα καρποφόρο σώμα για να απελευθερώσει τα σπόρια που μπορούν να εξαπλωθούν σε πιο ευνοϊκές συνθήκες. Τα καρποφόρα σώματα, παράγουν βασίδιο. Οι πυρήνες συνδυάζονται με την διαδικασία που ονομάζεται καρογαγμία ($2n$). Στη συνέχεια, μέσω της διαδικασίας της μείωσης, τα διπλοειδή κύτταρα διασπώνται σε τέσσερα απλοειδή (n) σπόρια, επαναφέροντας τους πυρήνες στον απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Τα προϊόντα της μείωσης είναι τα βασιδιοσπόρια και κάθε βασίδιο παράγει τέσσερα βασιδιοσπόρια τα οποία δεν έχουν ικανότητα μετακίνησης και διασπείρονται με τον αέρα. Από τη στιγμή που βρεθούν στο κατάλληλο μέρος εκβλαστάνουν και δίνουν ένα νέο μυκήλιο.

1.2.1.1. *Ganoderma lucidum*

Το είδος *Ganoderma lucidum* (Εικόνα 3) περιεγράφηκε το 1781 από τον Βρετανό μυκητολόγο William Curtis (1746 - 1799), ο οποίος του έδωσε την επιστημονική ονομασία *Boletus lucidus*. Στη συνέχεια, ο διάσημος Φινλανδός μυκολόγος Peter Karsten (1834 - 1917) άλλαξε την ονομασία του στο σημερινό του γένος το 1881, μετονομάζοντάς το σε *Ganoderma lucidum*. Η λέξη 'lucidum' στα λατινικά σημαίνει γυαλιστερό ή λαμπρό. Ο χαρακτηρισμός αυτός περιγράφει εύστοχα το καρπόσωμα του μανιταριού το οποίο έχει πρότυπη, ανάγλυφη και λουστραρισμένη εμφάνιση.



Εικόνα 3. Μορφολογία του *Ganoderma lucidum* (O'Reilly P., 2016).

Η περίοδος καρποφορίας του ξεκινά τέλη καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου, ενώ σπάνια καρποφορεί την άνοιξη. Όταν αρχίζει να απελευθερώνει νέφος καφέ σπορίων, αυτά προσκολλώνται στην άνω επιφάνεια του πύλου (και στο φλοιό του δέντρου στο οποίο επισυνάπτεται) παρουσιάζοντας έτσι μια λακαρισμένη όψη. Απελευθερώνει σπόρια το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, αλλά τα σκληρά καρποφόρα σώματα επιμένουν για αρκετούς μήνες.

Ο πύλος του εκτείνεται έως 25 εκατοστά κατά μήκος και έχει 4 εκατοστά πάχος. Τις περισσότερες φορές εμφανίζεται στύπος, αλλά μπορεί να εμφανιστεί και άμισχο. Η όψη του παραπέμπει σε σχήμα βεντάλιας ή σχήμα νεφρού. Επίσης, πιο συχνά προσκολλάται πλευρικά και όταν βρίσκεται σε άμισχη μορφή (δεν έχει στύπο) προσκολλάται κεντρικά. Όταν υπάρχει στύπος, συνδέεται έκκεντρα με τον πύλο και μπορεί να εκτείνεται μέχρι 20 εκατοστά σε μήκος, αν και συνήθως το μήκος κυμαίνεται από 5 έως 15 εκατοστά. Ο κόκκινο-καφέ μίσχος και η άνω επιφάνεια του έχουν μια βερνικωμένη γυαλάδα, που γίνεται θαμπή και ματ, όταν καλύπτεται από σπόρια. Οι σωλήνες της κάτω επιφάνειας αρχικά είναι λευκοί 5 έως 20 χιλιοστά βάθους και τυπικά απέχουν κατά 4 έως 6 πόρους ανά χιλιοστό. Σχηματίζει ομόκεντρα αυλάκια με ζώνες σκίασης κίτρινες, πορτοκαλί, κόκκινες και μωβ. Τα χρώματα

γίνονται ώχρα προς το περιθώριο με υπόλευκο αναπτυσσόμενο άκρο και όσο μεγαλώνει ηλικιακά όλη η άνω επιφάνεια του μετατρέπεται σε μωβ-καφέ χρώμα, μέχρι τελικά να μαυρίσει.

Όσον αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, είναι σχετικά άοσμο, ενώ η γεύση του είναι πικρή. Αποτελεί πηγή πολλών βιοδραστικών και φαρμακευτικών ουσιών. Οι κυριότερες ουσίες στις οποίες οφείλει τις φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες (κυρίως οι β-γλυκάνες). Έχει αναφερθεί ότι το *G. lucidum* περιέχει περισσότερες από 400 βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες έχουν αρκετές φαρμακευτικές επιδράσεις, αξιοσημείωτες, όπως αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντικές (ειδικά κατά του έρπητα και HIV), αντιοξειδωτικές και ριζοσπαστικές επιδράσεις (Ko et al 2008).

Χαρακτηρίζεται ως φυτοπαθογόνος μύκητας, αφού προκαλεί σήψη σε πολλούς κορμούς δέντρων και συναντάται σε: δάση, πάρκα, κήπους, κάτω από θάμνους, κοντά σε μονοπάτια και σε κομποστοποιημένα υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, αναπτύσσεται σε φυλλοβόλα δέντρα όπως: δρυς, σφενδάμι, φτελιά, ιτιά, μανόλια και χαρουπιά (*Quercus, Acer, Alnus, Betula, Castanea, Corylus, Fagus, Fraxinus, Populus, Pyrus, Magnolia, Tilia*). Λιγότερο συχνά εντοπίζεται σε κωνοφόρα δέντρα (όπως: *Larix, Picea, Pinus*). Εμφανίζεται σε όλη την ηπειρωτική Ευρώπη καθώς και σε πολλά μέρη της Ασίας και της Βόρειας Αμερικής (στις εύκρατες και όχι υποτροπικές περιοχές). Στην Ανατολή, αναπτύσσεται κατά κύριο λόγο σε δαμασκηινές ενώ έχει βρεθεί και σε πρέμνα, και γενικά μπορεί να εντοπιστεί κοντά στην επιφάνεια του εδάφους, και περιστασιακά σε εδάφη στα οποία αναδύονται θαμμένες ρίζες (Wasser, 2005).

Το *G. lucidum* έχει καλλιεργηθεί τεχνητά διατηρώντας παραμέτρους ανάπτυξης όπως η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε νερό, η σχετική υγρασία, το pH και η ένταση φωτός μαζί με τη χρήση πολλών διαφορετικών υποστρωμάτων ανάπτυξης (Chang και Miles, 2004). Διατίθεται στο εμπόριο με διαφορετικές μάρκες θρεπτικών ουσιών, με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής, ποτών υγείας και σκονών, καθώς και ειδικών λειτουργικών παραγόντων (Jong and Birmingham, 1992).

1.2.1.2. *Ganoderma resinaceum*

Το *Ganoderma resinaceum* περιεγράφηκε το 1889 από τον Γάλλο μυκητολόγο Jean Louis Emile Boudier (1828 – 1920,), όπου ‘resinaceum’ σημαίνει «ρητινώδες» και είναι μια αναφορά στο σκληρό κολλώδες υγρό που εκκρίνεται από τα ταλαιπωρημένα σώματα των κορμών (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μορφολογία του *Ganoderma resinaceum* (O'Reilly P., 2016).

Είναι ένας σπάνιος ποροειδής μύκητας που παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια του έτους σε βελανιδιά (*Quercus*) και οξιά (*Fagus*) σε διάσπαρτα δένδρα δάσους ή σε μεγάλου ύψους ξύλα στην Ευρώπη. Συναντάται πιο συχνά σε ορισμένες βόρειες και κεντρικές περιοχές της ηπειρωτικής Ευρώπης, ωστόσο έχει ευρεία εξάπλωση σε τροπικές και εύκρατες περιοχές έχοντας αναφερθεί στην Αφρική, Ασία, Αυστραλία καθώς και στη Νότια και Βόρεια Αμερική. Απαντάται όλο το χρόνο αλλά καρποφορεί το καλοκαίρι και το φθινόπωρο απελευθερώνοντας σπόρια το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

Οι πόροι είναι αρχικά υπόλευκοι ή πιο συχνά αχροκίτρινοι όταν το καρποφόρο σώμα είναι νεαρό και καθώς το καρποφόρο σώμα μεγαλώνει ηλικιακά, ο μύκητας γίνεται μαύρος. Συνήθως μεγαλώνει στη βάση ζωντανών κορμών παρασιτικά 1 – 2 μέτρα από το έδαφος (Kues, 1961). Προκαλεί λευκή σήψη ξύλου και οδηγεί σε θάνατο τα προσβεβλημένα δέντρα. Παρόλα αυτά ο μύκητας εξακολουθεί να επιβιώνει στις νεκρές πρέμνες παρουσιάζοντας και σαπροβιοτικό χαρακτήρα. Όταν ο σκληρός βραχίονας σπάσει ή κοπεί, μια παχιά κίτρινη ρητίνη αναβλύζει από τους μύκητες και πήζει γρήγορα για να σχηματίσει μια σκληρή γυαλιστερή επιφάνεια. Η κίτρινη ρητίνη από τις άκρες αυτού του μεγάλου βραχίονα σκληραίνει γρήγορα. Τα σπόρια, έχουν κόκκινο-καφέ χρώμα με ελλειψοειδή διάσταση, 9-11 x 5-7 μm . Η διαστασιολόγηση του βραχίονα κυμαίνεται από 15 έως 35 εκατοστά κατά μήκος και 4 έως 8 εκατοστά κατά πάχος, έχοντας σχήμα βεντάλιας όταν αναπτυχθεί πλήρως. Ο

πίλος του καρποσώματος έχει χρώμα συνδυασμού κόκκινου-καφέ με ανοιχτού κίτρινου. Η κάτω επιφάνεια φέρει καφέ σωλήνες με βάθος από 8 έως 20 χιλιοστό βάθους, που καταλήγουν σε σφαιροειδείς πόρους.

Όσον αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, το *G. resinaceum* έχει πικάντικη οσμή και μια πικρή γεύση. Συγκριτικά με τα άλλα μέλη του γένους του έχει αρκετά πιο λαμπερή εμφάνιση, αρκεί να ξεπλυθεί η σκόνη από σπόρια που σχηματίζεται στη πάνω επιφάνεια του πύλου του. Αποτελεί πηγή διαφόρων ουσιών, όπως τερπενοειδή ή πολυφαινόλες. Το *G. resinaceum* χρησιμοποιείται συνήθως για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού, υπεργλυκαιμία και ηπατική νόσο. Το *G. resinaceum* χρησιμοποιείται για τη θεραπεία οξειδωτικών και φλεγμονωδών ασθενειών όπως καρδιαγγειακές και ηπατικές παθήσεις.

1.2.1.3 *Ganoderma applanatum*

Το *Ganoderma applanatum* περιγράφηκε το 1800 από τον μυκητολόγο Christiaan Hendrik Persoon, ο οποίος του έδωσε την επιστημονική ονομασία *Boletus applanatus* και το 1887 ο διάσημος Γάλλος μυκητολόγος Narcisse Theophile Patouillard (1854 - 1926) καθιέρωσε την ονομασία *G. applanatum*, όπου το 'applanatum' παραπέμπει σε πεπλατυσμένη (επίπεδη) μορφή (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μορφολογία του *Ganoderma applanatum* (O'Reilly P., 2016).

Το συγκεκριμένο μανιτάρι βρίσκεται στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη και είναι ευρέως διαδεδομένο και αρκετά κοινό στη Βρετανία και την Ιρλανδία. Συνήθως αναπτύσσεται σε κορμούς πλατύφυλλων δέντρων και σε κορμούς - κούτσουρα, σε κλαδιά, κυρίως σε δρυ και οξιά, αλλά και σε κωνοφόρα δέντρα και πιο συχνά σε πεσμένους ή κομμένους κορμούς και μεγάλα κλαδιά. Η διαστασιολόγηση του σε διάμετρο κυμαίνεται από 15 έως 50 εκατοστών σε μήκος και σε πάχος από 5 έως 10 εκατοστών. Όταν απελευθερώνει σπόρια, χρωματίζεται η γύρω περιοχή με πυκνή καφέ σκόνη.

Το *G. applanatum* είναι ένας πολύ κοινός πολυετής μύκητας αναπτύσσοντας αξιοσημείωτες ετήσιες κορυφογραμμές ανάπτυξης στην άνω επιφάνειά του, η οποία έχει χρώμα καφέ και το κάτω μέρος είναι κρεμώδες λευκό. Απελευθερώνει σπόρια στα τέλη του καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου.

Οι σωλήνες της κάτω επιφάνειας, εκτείνονται μέχρι 12 χιλιοστά σε βάθος και οι μικροί στρογγυλοί πόροι, είναι συνήθως πέντε ανά χιλιοστό, έχοντας λευκό χρώμα όταν το καρποφόρο σώμα είναι ηλικιακά νέο, ενώ όσο μεγαλώνει μαυρίζει ή μελανιάζει. Τα σπόρια του είναι ελλειψοειδή, μεγέθους 6,5-8,5 x 4,5-6μm. Όσον αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, έχει την τυπική μανιταρώδη οσμή και μια πικρή γεύση.

Το *G. applanatum* είναι ένα φαρμακευτικό μανιτάρι και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων χρόνιων παθήσεων όπως για τη θεραπεία της ρευματικής φυματίωσης και του καρκινώματος του οισοφάγου, και έχει χρησιμοποιηθεί πιο συχνά για την επίλυση της δυσπεψίας, την ανακούφιση του πόνου και της μείωσης των φλεγμάτων (Luo et al, 2016).

1.2.1.4 *Ganoderma adspersum*

Το *G. adspersum* το οποίο είναι γνωστό με πολλά ονόματα βρίσκεται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, ειδικά στην Κεντρική και στη Βόρεια Ευρώπη (Εικόνα 6). Ο μύκητας βρέθηκε αρχικά να αναπτύσσεται στο δέντρο *Carpinus betulus* στην Κροατία και δημοσιεύτηκε από τον Schulzer το 1878 ως *Polyporus adspersus*. Ωστόσο, έχει βρεθεί επίσης στην Αργεντινή, τη Βραζιλία, την Αμερικανική Σαμόα και πρόσφατα στις ΗΠΑ (Καλιφόρνια). Μετά από μελέτη όλων των δειγμάτων με τα διαφορετικά ονόματα ειδών, το 1969, ο Donk κατέληξε στο συμπέρασμα για το σωστό όνομα για τον μύκητα, *G. adspersum* (Tortici, 1971). Σε ευρωπαϊκές μονογραφίες πολυπόρου, το *G. adspersum* βρέθηκε με το όνομα, *G. australe* (Fr.) Pat. 1889. Ωστόσο, μέσω της μοριακής ανάλυσης, η ευρωπαϊκή ταξινομική ταξινόμηση (*G. adspersum*) διαφοροποιήθηκε από την αυστραλιανή ταξινόμηση (*G. australe*). Το *G. adspersum* είναι τελικά το όνομα του ευρωπαϊκού είδους (Papp & Szabó, 2013)

Είναι ένας πολυετής μύκητας από τον οποίο τα περισσότερα πλατύφυλλα είδη δένδρων μπορούν να προσβληθούν, όπως είναι τα *Quercus* (βελανιδιές), *Fagus* (οξιά), ενώ το συναντάμε πιο συχνά στην οξιά. Λειτουργεί ως παρασιτικός μύκητας, στα πρώτα στάδια του αποικισμού του, ωστόσο καθώς το δέντρο πεθαίνει γίνεται σαπροφυτικός (De Simone & Annesi, 2012). Τα βασιδιοσπόρια μετακινούνται με αερομεταφερόμενα και εισέρχονται στις πληγές στις ρίζες και τις βάσεις του κορμού. Τα βασιδιοκάρπια συνήθως αναπτύσσονται στην περιοχή των πληγών, με τα βασιδιοσπόρια να παράγονται σε μεγάλους αριθμούς τις βραδινές

ώρες που ο αέρας είναι υγρός. Το *G. adspersum* προκαλεί αποσύνθεση του ξύλου και σήψη των ριζών, μειώνοντας έτσι τη δομική αντοχή, την ανάπτυξη και την ορθοστασία των μολυσμένων δέντρων. Προκαλεί λευκή σήψη στη βάση του μίσχου και στις ρίζες των πλατύφυλλων δέντρων ενώ το ξύλο των δέντρων που έχουν προσβληθεί από το *G. adspersum* γίνεται μαλακό μετά την αποσύνθεση. Ακόμα κι αν τα καρποφόρα σώματα δεν υπάρχουν, το δέντρο ξενιστής μπορεί συχνά να εμφανίσει σημάδια κακής υγείας από τον μύκητα, όπως μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης και μερικές φορές κιτρίνισμα ή μαρασμό των φύλλων (Sinclair & Lyon, 2005). Σε αντίθεση με άλλα στενά συγγενικά είδη, το *G. adspersum* είναι ένα επιθετικό είδος που μπορεί να διεισδύσει και να διαπεράσει άθικτες ζώνες αντίδρασης μολυσμένου ξύλου προκαλώντας προοδευτική και εκτεταμένη αποσύνθεση σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (De Simone & Annesi, 2012). Μερικά μολυσμένα δέντρα μπορεί να πεθάνουν, ενώ άλλα εξασθενούν και πέφτουν από ανεμοθύελλες ως αποτέλεσμα της αποσύνθεσης.



Εικόνα 6: Μορφολογία του *G. adspersum* (Arulpandi & Kalaichelvan, 2013).

Ο πύλος είναι σκληρός, μη βρώσιμος και κατά την ανάπτυξη του εμφανίζει αυξανόμενες κορυφογραμμές στην άνω επιφάνεια η οποία έχει χρώμα σκούρο καφέ ή σκούρο γκρι. Η επιφάνεια καλύπτεται συχνά από μια απόθεση σπορίων που μοιάζει με σκόνη κακάο. Η κατά μήκος επιφάνεια φτάνει τα 25 εκατοστά και σπάνια τα 50, ενώ το πάχος του κυμαίνεται από 5 έως 25 εκατοστά. Τα πολυετή καρποσώματα εμφανίζονται κυρίως στη κάτω όψη του κορμού, συνήθως κοντά στη βάση. Στο άκρο του βραχίονα έχει λευκό περιθώριο που οδηγεί σε μια λευκή και σβολιώδη κάτω επιφάνεια.

Στη κάτω επιφάνεια του μύκητα, το στρώμα όπου εντοπίζονται οι σωλήνες είναι λευκό όταν αυτό είναι έτοιμο να απελευθερώσει τα σπόρια του, τα οποία είναι λεπτά και λευκά με καφέ σκόνη, καλύπτοντας την γύρω περιοχή με πυκνή καφέ σκόνη. Οι μικροί στρόγγυλοι πόροι, συνήθως είναι τρεις ή τέσσερις ανά mm, είναι λευκοί όταν το καρπόσωμα αυξάνεται και πλησιάζει την στιγμή που θα απελευθερώσει σπόρια, ενώ όσο μεγαλώνει ηλικιακά γίνεται καφέ ή μαυρίζει. Τα σπόρια του είναι καστανά, ωοειδή, με δύο

μονά τοιχώματα, διάστασης 8 - 13 x 5.5 - 9 μm. Όσον αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, φέρει ελαφριά οσμή και μια πικρή γεύση.

1.3 Στερεή καλλιέργεια & υγρή καλλιέργεια

Η καλλιέργεια των μυκήτων μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κατηγορίες. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο αν η καλλιέργεια υποστρώματος είναι στερεής φάσης ή αν είναι καλλιέργεια σε υπόστρωμα υγρής φάσης. Η πρώτη περίπτωση περιλαμβάνει τη παραγωγή καρποσωμάτων, σπορίων και βιομάζας μυκηλίου και η δεύτερη μόνο την παραγωγή μυκηλίου.

Για το γένος *Ganoderma*, η παραγωγή καρποσωμάτων των μυκήτων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τον παραδοσιακό τρόπο καλλιέργειας επάνω σε φυσικούς κορμούς δένδρων (που είναι χρονοβόρος), ή με την πλέον σύντομη και διαδεδομένη μέθοδο σε σάκους με υπόστρωμα από μίγμα ξύλου, πριονιδίων και συστατικών εμπλουτισμού σε θερμοκηπιακούς χώρους με ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού και υγρασίας. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες καλλιέργειες είναι χρονοβόρες.

Έτσι, αναπτύχθηκαν καλλιεργητικές τεχνικές όπως είναι η καλλιέργεια βυθού, ως μια εναλλακτική και αποτελεσματική προσέγγιση για τη παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδερικών οξέων. Η ανάπτυξη μυκήτων σε υγρές καλλιέργειες υπερτερεί έναντι της στερεάς, για διάφορους λόγους. Αρχικά, η υγρή καλλιέργεια είναι περισσότερο αξιόπιστη ως προς το τελικό προϊόν ανάπτυξης και επαναλήψιμη, έχοντας υψηλή παραγωγικότητα, χαμηλό κόστος, ευκολία ελέγχου της ζύμωσης και εύκολη διαδικασία χειρισμού. Επίσης, η παραγωγή των μεταβολιτών είναι ανεξάρτητη των κλιματικών διακυμάνσεων, σε αντίθεση με την καλλιέργεια υποστρώματος σε στερεή κατάσταση. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για την παραγωγή καρποσώματος απαιτούνται τουλάχιστον 3-5 μήνες, ενώ για τη λήψη μιας αξιοσημείωτης ποσότητας μυκηλίου απαιτούνται μόλις 2-3 εβδομάδες (Kim κ.ά., 2002, Sanodiya κ.ά., 2009).

1.3.1 Καλλιέργεια σε υγρά θρεπτικά μέσα (ζυμώσεις βυθού)

Έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μυκηλίων των μακρομυκήτων σε υγρές καλλιέργειες καθώς φαίνεται να παράγουν προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας (Block et al., 1958) τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τρόφιμα, πρόσθετα τροφίμων ή διατροφικά συμπληρώματα (Cirillo et al., 1960). Το κύριο πλεονέκτημα που χαρακτηρίζει τις καλλιέργειες βυθού είναι η ικανότητα τους να παράγονται

μεγάλες ποσότητες μυκηλίου σε μια σχετικά σύντομη χρονικά περίοδο (Litchfield and Overbeck, 1965). Το γεγονός αυτό οφείλεται στον υψηλότερο ρυθμό αύξησης των μυκήτων στα υγρά μέσα ανάπτυξης σε σύγκριση με τα στερεά και στους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι το pH, η θρεπτική σύσταση και ο αερισμός οι οποίοι μπορούν να ελεγχθούν καλύτερα. Το τελικό προϊόν που παραλαμβάνεται είναι πιο ομοιόμορφο ποιοτικά (Taguchi, 1968).

Η καλλιέργεια υγρής κατάστασης των μακρομυκήτων έχει εφαρμοστεί σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές όπως στην παραγωγή εδώδιμων μανιταριών για ανθρώπινη και ζωική βρώση, σε προϊόντα με άρωμα μανιταριού και φυσικές αρωματικές ουσίες, στην παραγωγή ζυμώσιμων τροφίμων, στην παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού μανιταριών, στην παραγωγή ειδικών προϊόντων, όπως πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, ένζυμα, οργανικά οξέα κ.ά., στην παραγωγή θεραπευτικών ουσιών, όπως αντιβιοτικά, αντικαρκινικά και αντιμυκητιακά σκευάσματα (Fazenda et al., 2008).

Επιπρόσθετα, η καλλιέργεια υγρής κατάστασης εδώδιμων και φαρμακευτικών μακρομυκήτων έχει εφαρμοστεί και στην βιοτεχνολογική αξιοποίηση διαφόρων αποβλήτων (αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων) και υποπροϊόντων (π.χ. υγρά απόβλητα ελαιουργίας, απόβλητη γλυκερόλη κ.λ.π.) όπου επιτυγχάνεται αξιοποίηση των αποβλήτων μειώνοντας το ρυπαντικό φορτίο των αποβλήτων ή και σε πολλές περιπτώσεις μηδενίζεται και παράλληλα παράγεται εδώδιμη βιομάζα και μεταβολικά προϊόντα (π.χ. ένζυμα) χρήσιμα για τη βιομηχανία τροφίμων και τη χημική βιομηχανία (Tsioulpas κ.α., 2002; Aggelis κ.α., 2003; D'Annibale κ.α., 2004; André κ.α., 2010). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι καλλιέργειες βυθού μπορούν να δράσουν οικολογικά στο περιβάλλον μειώνοντας το απαιτούμενο βιολογικό οξυγόνο (BOD) καθώς αξιοποιούν ως θρεπτικά υποστρώματα τα βιομηχανικά απόβλητα και τα απόβλητα που προκύπτουν κατά την παραγωγή τροφίμων (JOHNSON, 1978).

Οι υγρές καλλιέργειες βυθού εφαρμόζονται συνήθως σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, με τον όγκο καλλιέργειας να είναι περιορισμένο και μικρότερο σε σχέση με αυτή που κατέχουν οι βιοαντιδραστήρες. Υπάρχουν ορισμένοι λόγοι που θα λάβει χώρα μια υγρή καλλιέργεια και για την κάθε περίπτωση οι συνθήκες καλλιέργειας προσαρμόζονται ανάλογα τον στόχο της μελέτης. Μπορεί να αποσκοπεί στη λήψη βιομάζας, είτε στη λήψη εξωπολυσακχαριτών (EPS), ενδοπολυσακχαριτών (IPS), στη λήψη γανοδερικών οξέων και αρωματικών ουσιών.

Για την ανάπτυξη των μακρομυκήτων σε βυθισμένες καλλιέργειες υπάρχουν ορισμένες γενικές αρχές που πρέπει να εφαρμόζονται. Αρχικά, για την επίτευξη υψηλής παραγωγής μυκηλιακής βιομάζας, απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων. Η

αναλογία άνθρακα: αζώτου (C:N) είναι σημαντική, δεδομένου ότι επηρεάζει την απόδοση της παραγωγής βιομάζας και των μεταβολιτών αλλά και την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λιπίδια του μυκηλίου (Lee et al. 2007, Rogalski et al. 2006). Όταν χρησιμοποιηθεί απόβλητο ως μέσο ανάπτυξης, απαιτούνται συμπληρώματα αζώτου και ανόργανων αλάτων (Hsieh and Yang 2004, Lee et al. 2007). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται συνθετικά μέσα καθορισμένης χημικής σύστασης σε σχέση με τα σύνθετα μέσα θρεπτικών συστατικών (Fan et al. 2007). Επίσης, το περιεχόμενο και η σύσταση σακχάρων οποιουδήποτε παραγόμενου πολυσακχαρίτη εξαρτάται από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται (Kim et al. 2006). Η επιπλέον προσθήκη μεταλλικών και ανόργανων αλάτων μπορεί να ενισχύσει την μυκηλιακή ανάπτυξη, αλλά και να επηρεάσει τη σύσταση των αμινοξέων. Τέλος, οποιοδήποτε υπόστρωμα επιλεγθεί για την καλλιέργεια του μακρομύκητα πρέπει να αποστειρωθεί με ατμό.

1.4 Αξιοποίηση μανιταριών από τον άνθρωπο

Για πολλά χρόνια τα μανιτάρια καταναλώνονται και εκτιμώνται για τη θρεπτική τους αξία και τις ιατρικές τους ιδιότητες. Χρησιμοποιήθηκαν από τα αρχαιότερα χρόνια για τροφή, για λατρευτικούς και για φαρμακευτικούς σκοπούς. Ο Ευριπίδης τον 5^ο π.Χ. αιώνα και ο Θεόφραστος αργότερα (372-287 π.Χ.) αναφέρουν στα έργα τους τη χρήση των μανιταριών για τροφή (Van Griensven, 1988). Έχει παρατηρηθεί ότι στην παραδοσιακή ιατρική των Ανατολικών χωρών, κατείχε πάντοτε μία θέση ως μέσο πρόληψης και θεραπείας πολλών ασθενειών καθώς και ως μέσο προώθησης της μακροβιότητας και της ευημερίας του ανθρώπου. Οι πρώτες επιτυχείς μέθοδοι καλλιέργειας μανιταριών αναπτύχθηκαν στην Κίνα και την Ιαπωνία, όπου ο μύκητας *Auricularia auricula-judae* αναφέρεται ότι καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά το 300 μ. Χ. (Delmas, 1989), ενώ ο *Lentinula edodes* το 1.300 μ. Χ. (Oei, 1993). Πλέον, η καλλιέργεια και κατανάλωση μανιταριών έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους με πρόσφατα δεδομένα του FAO (FAOStat, 2018) να παρουσιάζουν πως η συνολική παγκόσμια παραγωγή εδώδιμων και φαρμακευτικών μανιταριών ανήλθε στα 15,67 εκατομμύρια τόνους το 2018 με το 85% να παράγεται στην Κίνα, ενώ στην Ελλάδα καλλιεργείται μόλις το 0,03% και βρίσκεται στην 35^η θέση. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται σε επιχειρηματική κλίμακα δύο είδη μανιταριών, το λευκό μανιτάρι (*Agaricus bisporus*) και το πλευρωτό μανιτάρι (*Pleurotus* sp.).

Σήμερα, ορισμένες ποικιλίες μυκήτων καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα για τροφή και ποτά και άλλες ποικιλίες αποτελούν αντικείμενο έρευνας για την υγεία, για την

παραγωγή ενζύμων, φαρμάκων και άλλων χρήσιμων για τον άνθρωπο ουσιών. Επιπλέον, ορισμένοι μύκητες αξιοποιούνται για το περιβάλλον, για τη βιοαποδόμηση υπολειμμάτων και παραπροϊόντων της γεωργίας χάρη στο πλούσιο ενζυμικό δυναμικό τους και την ικανότητά τους να αποδομούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις. Έτσι, η ευεργετική δράση των μυκήτων συμβάλλει στην αντιμετώπιση τριών σύγχρονων προβλημάτων της ανθρωπότητας, της επισιτιστικής κρίσης, της υποβάθμισης της ανθρώπινης υγείας και της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

Οι μύκητες έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (20-40% επί ξηρού) φυτικές ίνες, ορισμένα μέταλλα και έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό (85-90%), με χαμηλό επίπεδο λιπιδίων (2-8% με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα οξέα) και πτωχά σε υδατάνθρακες (3-20%) και περιεκτικότητα σε θερμίδες (περίπου 30 θερμίδες/100 γραμμάρια) (Furlani & Godoy, 2007; Silva, Costa, & Clemente, 2002). Επιπλέον, τα μανιτάρια είναι πλούσια σε βιταμίνες του συμπλόκου Β και C, όπως θειαμίνη (B₁) και ασκορβικό οξύ (C), ριβοφλαβίνη και βιταμίνη Κ, καθώς και σε ανόργανα στοιχεία, ιδιαίτερα σε φωσφόρο, σίδηρο, μαγνήσιο και χαλκό. Αποτελούν μια εξαιρετική πηγή διαιτητικών ινών, επειδή το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται κυρίως από χιτίνη, ημικυτταρίνη, μαννάνες και β-γλυκάνες, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν την εντερική κινητικότητα και να αυξήσουν τον όγκο των κοπράνων, μειώνοντας την απορρόφηση επιβλαβών τοξικών, καρκινογόνων ουσιών, οδηγώντας σε χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Manzi & Pizzoferrato, 2000). Τα φαρμακευτικά μανιτάρια, αντιπροσωπεύουν μία κύρια πηγή διατροφολογικών ουσιών που προκαλούν μετατροπές στη βιολογική αντίδραση του οργανισμού και διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα διάφορες θεραπευτικές δράσεις. Επίσης, διαθέτουν ένζυμα αποσύνθεσης λιγνοκυτταρίνης με αποτελεσματικούς μηχανισμούς βιοαποκατάστασης (Cheung, 2008).

1.5 *Ganoderma*, οφέλη και ιδιότητες

Τα μανιτάρια *Ganoderma* έχουν χαρακτηριστεί ως η υπερτροφή του 21ου αιώνα, ενώ έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών και ιατρών διότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε πληθώρα διαταραχών και παθήσεων. Παρόλο που είναι μανιτάρι, αρκετοί είναι εκείνοι που συγγέουν τη φύση του θεωρώντας το βότανο (Russell και Paterson, 2006). Η αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και χοληστερόλη, καθώς και με πλούσια θρεπτικά συστατικά αναμένεται να κλιμακώσει την παγκόσμια αγορά. Τα μανιτάρια *Ganoderma* περιέχουν φυτικές ίνες και πεπτικά ένζυμα που υποστηρίζουν την

υγεία του εντέρου και του ανοσοποιητικού, γεγονός που οδήγησε στην ενσωμάτωσή του σε διάφορα συμπληρώματα διατροφής. Εντατικές μελέτες έδειξαν ότι διαφορετικά βιοενεργά συστατικά του *Ganoderma* έχουν αρκετές φαρμακευτικές επιδράσεις, όπως αλκαλοειδή, τερπενοειδή, πολυσακχαρίτες, στεροειδή, λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες (Mizuno et al.1995, Russel & Paterson 2006, Ihayere et al. 2010). Αυτές οι ενώσεις έχουν ανοσοτροποποιητικές, υπογλυκαιμικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, καρδιαγγειακές και άλλες θεραπευτικές επιδράσεις (Lin et al.1995, Park et al. 1997, Wasser & Weis 1999, Gao et al. 2005, Jiang et al. 2005, Ofodile et al. 2005). Ταξινομείται μεταξύ των σπάνιων προσαρμογόνων βοτάνων καθώς παρέχει στο σώμα αυτό ακριβώς που χρειάζεται τη δεδομένη χρονική στιγμή.

Πιο συγκεκριμένα, η κατανάλωση των μανιταριών *Ganoderma*, ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, προλαμβάνει τον σακχαρώδη διαβήτη, την υπέρταση, την ηπατίτιδας Β, μειώνει την χοληστερόλη και συμβάλει στο χάσιμο βάρους. Επίσης, βελτιώνει την μνήμη, αυξάνει την αντοχή, μειώνει τις αλλεργίες του αναπνευστικού, διαφόρων αλλεργιών και φλεγμονών, αντιμετωπίζει την χρόνια βρογχίτιδα, του νευρωτικού συνδρόμου, μειώνει το Stress και αντιμετωπίζει την υπερένταση. Επιπλέον, συμβάλει στην βελτίωση του κυκλοφορικού συστήματος, την σκλήρυνσης κατά πλάκας και της σκληροδερμίας. Επίσης, είναι παραγωγός διαφόρων ενζύμων με διαφορετικά θεραπευτικά αποτελέσματα (π.χ. μικροβιακό, αντιοξειδωτικό, αντικό, υπογλυκαιμικό, θρομβολυτικό) (Bilal, 2010).

Τα αντιοξειδωτικά συστατικά ανευρίσκονται στα καρποσώματα, στο μυκήλιο και στο ζωμό της υγρής καλλιέργειας τα οποία μπορεί να είναι κυρίως φαινολικά συστατικά, τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ και καροτενοειδή. Επίσης, το συστατικό που υπάρχει σε αφθονία στο σώμα των μανιταριών είναι οι πολυσακχαρίτες (Ferreira et al.,2009).

Καταναλώνοντας τα μανιτάρια *Ganoderma* διατηρούνται τα επίπεδα του SOD στο σώμα σε ικανοποιητικό βαθμό για περισσότερο χρόνο. Το υπεροξειδίο της δισμουτάσης (SOD) είναι ένα ένζυμο που επιδιορθώνει τα κύτταρα και μειώνει τη ζημιά που γίνεται σ' αυτά από το υπεροξειδίο, την πιο κοινή ελεύθερη ρίζα στο σώμα. Αυτό βοηθάει στην άμυνα κατά της επίθεσης από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που αποδεδειγμένα προκαλούν μια μεγάλη σειρά κοινών ασθενειών, περιλαμβανομένου και του καρκίνου (Pan et al.,1997).

Στο εμπόριο διατίθεται ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων υπό το όνομα Ling Zhi ή Reishi. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να είναι: ποτά υγείας, σούπες, σιρόπια, τσάι, δισκία, κάψουλες, βάμμα, σκόνες (φαρμακευτικές σκόνες με μέλι), συμπληρώματα διατροφής, εκχυλίσματα μυκηλίου ή καρποσωμάτων, καθώς και σκευάσματα σχετικά με ενδο/εξω-κυτταρικούς πολυσακχαρίτες, αλλά και σπόροι (Sanodiya κ.ά., 2009; Deepalakshmi και Mirunalini, 2011).

Το *G. lucidum* είναι ένας βασιδιομύκητας, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως ως «το μανιτάρι της μακροζωίας» σε διάφορες ασιατικές χώρες εδώ και 2000 χρόνια για την ενίσχυση της καλής ποιότητας ζωής και της μακροζωίας. Συμβάλλει στην αποβολή συσσωρευμένων τοξινών ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Είναι πιο δραστικό όταν χρησιμοποιηθεί για πρόληψη παρά για θεραπεία. Χρησιμοποιείται για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως η ηπατίτιδα, η υπέρταση, η υπερχοληστερολαιμία, η ηπατοπάθεια, η αρθρίτιδα, η βρογχίτιδα και ο καρκίνος (Fujita et al.,2005). Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ατονίας και της αδυναμίας, της αϋπνίας, του γαστρικού έλκους και των διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος (Liu et al.,2002). Το *G. lucidum* έχει χαρακτηριστεί ως ένας ισχυρός φαρμακευτικός μύκητας που περιέχει περίπου 400 διαφορετικά βιοενεργά συστατικά περιλαμβάνοντας κυρίως τριτερπενοειδή, πολυσακχαρίτες, νουκλεοτίδια, στερόλες, λιπαρά οξέα, αλκαλοειδή, πρωτεΐνες, αμινοξέα και άλλα ανόργανα στοιχεία. Ανάμεσα στο ευρύ φάσμα των ασθενειών που υποστηρίζεται ότι αντιμετωπίζει επιτυχώς το *G. lucidum* είναι: η ηπατίτιδα, η ανοσοανεπάρκεια, η λευκοπενία, η αθηροσκλήρωση, οι αιμορροΐδες, η χρόνια κόπωση, η αϋπνία και η ζάλη που προκαλούνται από νευρασθένεια, επιπλέον των προαναφερθέντων καρκίνος, βρογχίτιδα και υπέρταση (2001, Fujita et al., 2005, Gao et al., 2002).

1.6 Αντιοξειδωτικές ουσίες μακρομυκήτων

1.6.1 Σύνθεση πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή, τα οποία αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες τους μονοσακχαρίτες. Τα τελευταία χρόνια, έχει στραφεί η προσοχή σε μεγάλο βαθμό στους πολυσακχαρίτες λόγω της φαρμακευτικής σημασίας τους καθώς έχουν εντοπιστεί αντικαρκινικές ιδιότητες των συστατικών τους (Chien et al., 2004). Έχουν απομονωθεί, περισσότεροι από 200 πολυσακχαρίτες από τη φρουτώδη σάρκα, τους σπόρους, τα μυκήλια και την καλλιέργεια του *Ganoderma* (Huie & Di, 2004). Τα συγκεκριμένα μακρομόρια παρουσιάζουν την υψηλότερη συμμετοχή σε βιολογικές λειτουργίες σε σχέση με τα υπόλοιπα χάρη στην υψηλή πολυμορφικότητα της δομής τους. Στους πολυσακχαρίτες οφείλεται κυρίως η βιολογική δραστηριότητα του μανιταριού και οι θεραπευτικές του χρήσεις (Fang et al., 2002) αλλά και οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, όπως ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων και η παραγωγή αντισωμάτων (Liu et al.,2002).

Οι βιολογικές λειτουργίες που εξυπηρετούν οι πολυσακχαρίτες ποικίλουν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποθήκες άνθρακα (π.χ. άμυλο, γλυκογόνο). Αποτελούν δομικά

συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων (π.χ. κυτταρίνη, χιτίνη) και οι β-γλυκάνες (ομο- και ετερο-γλυκάνες με $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ και $\beta(1-6)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς) (Manzi et. al., 2000), παρέχουν προστασία και στήριξη στα κύτταρα (π.χ. γλυκοζαμινογλυκάνες), ως δείκτες αναγνώρισης (π.χ. πολυσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και είναι συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες ή λιπίδια). Η χιτίνη είναι πολυμερές παράγωγο της χυτοβιόζης, είναι πολυ-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και θεωρείται προβιοτική ουσία που επιδρά στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στον ορό του αίματος. Οι β-γλυκάνες (πολυμερή της γλυκόζης ενωμένα με $\beta-1,3$ και $\beta-1,6$ γλυκοζιτικούς δεσμούς), σε *in vitro* πειράματα έχουν δείξει κυτταροτοξική δράση εναντίον καρκινικών κυττάρων, ενώ σε *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα έχουν επιδείξει αντικαρκινική δράση μέσω της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Smith κ.ά., 2002).

Η ύπαρξη των πολυσακχαριτών είναι σημαντική, διότι αποτελούν τη βάση για το σχηματισμό του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος, υπό μορφή ενός τρισδιάστατου πλέγματος (Latgé, 2007). Ακόμα, σημειώνεται ότι οι πολυσακχαρίτες μπορούν να εκκρίνονται εκτός κυττάρου (εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες) (Giavasis, 2013). Το κυτταρικό τοίχωμα δεν είναι απλά ένας εξωσκελετός, αλλά μια δυναμική δομή που αλλάζει συνεχώς αναλόγως των συνθηκών καλλιέργειας και των περιβαλλοντικών πιέσεων που δέχεται ο μύκητας (Latgé, 2007). Ένα από τα βασικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, είναι οι β-γλυκάνες στις οποίες αποδίδονται οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μανιταριών. Ωστόσο, εκτός από πολυσακχαρίτες, το κυτταρικό τοίχωμα, αποτελείται και από χιτίνη, που συντίθεται από UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μέσω της μεσολάβησης του ενζύμου, συνθάση της χιτίνης (Latgé, 2007).

Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών είναι υψηλής σημασίας για τον τομέα της κίτρινης βιοτεχνολογίας (τρόφιμα), αλλά και της κόκκινης (ιατροφαρμακευτική) καθώς οι μακρομύκητες, του γένους *Ganoderma* χρησιμοποιούνται στην υγιεινή διατροφή για τα βιολογικώς ενεργά συστατικά που περιέχουν με πολλές προστατευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες (π.χ. αντικαρκινική δράση), όπως υψηλής φαρμακευτικής σπουδαιότητας πολυσακχαρίτες (π.χ. λεντινάνη, σχιζοφυλλάνη), γανοδερικά οξέα κ.λ.π. (Israilides and Philippoussis 2003, Philippoussis 2009, Zhong and Tang 2004). Οι πολυσακχαρίτες που περιέχονται στο *Ganoderma* είναι διαφορετικοί από τους πολυσακχαρίτες που βρίσκονται συνήθως σε τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες όπως το ρύζι και οι πατάτες. Η διαφορά οφείλεται στην ύπαρξη β-γλυκάνων στο *Ganoderma* που διαθέτουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες (Chien et al., 2004).

Άτομα που αντιμετωπίζουν πολύ σοβαρές ασθένειες αντλούν ελπίδα από τους πολυσακχαρίτες καθώς μία ποικιλία πολυσακχαριτών από ένα σύνολο μανιταριών έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Παράλληλα, φαίνεται ότι οι πολυσακχαρίτες των μανιταριών είναι ανθεκτικοί και εναρμονίζονται με τις χημειοθεραπείες και τις θεραπείες με ακτινοβολία.

Πιο συγκεκριμένα, το *Ganoderma* έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προκαλεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και καταστέλλει την εισβολή και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Stanley et al., 2005). Ορισμένες β-γλυκάνες από το *Ganoderma* είναι βιοδραστικές αναστέλλοντας την ανάπτυξη όγκων. Οι τιμές των καρκινικών δεικτών συνδέονται με το μοριακό βάρος, την διακλάδωση και τη διαλυτότητα των β-γλυκάνων στο νερό (Huie & Di, 2004).

1.6.2 Φαινολικά συστατικά

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα μανιτάρια έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή διότι περιγράφονται σαν μια πλούσια πηγή φαινολικών οξέων τα οποία έχουν σημαντική συνεισφορά στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα και συνεπώς στην φαρμακευτική τους δράση (Ferreira et al., 2009). Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη ομάδα από δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από φυτά και μύκητες τα οποία διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη προστασία από τη διαδικασία της οξείδωσης (Christie et al., 1994). Τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση στα βιολογικά συστήματα, δρώντας σαν δεσμευτές ελευθέρων ριζών. Οι αναγωγικές ιδιότητες που εμφανίζουν οι φαινολικές ενώσεις τις καθιστούν ιδανικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά συστατικά είναι αρωματικές υδροξυλιωμένες ενώσεις με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων συμπεριλαμβανομένων αντιβακτηριδιακής, αντιφλεγμονώδους και αντιυπεργλυκεμικής δράσης (Liu et al., 2012). Τα κύρια φαινολικά συστατικά που έχουν ανευρεθεί στα μανιτάρια είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τα υδροξυκιναμικά οξέα, οι λιγνάνες, οι ταννίνες, τα στυλβένια και οι οξειδωμένες πολυφαινόλες.

Οι μύκητες του γένους *Ganoderma*, έχουν αντιοξειδωτική δράση η οποία είναι συσχετισμένη σε μεγάλο βαθμό με το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο (Rajoriya et al., 2015). Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών ενώσεων είναι η δέσμευση των

ελευθέρων ριζών και η συμπλοκοποίηση των ιόντων που προωθούν την υπερπαραγωγή τους. Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός είναι η προστασία της κυτταρικής μεμβράνης και του DNA από την οξειδωση καθώς και η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω της αύξησης της δράσης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Alshikh et al., 2015). Τα είδη *Ganoderma* περιέχουν ένα σημαντικό αριθμό βιολογικά ενεργών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των τριτερπενίων, πολυσακχαριτών, στεροειδών, λιπαρών οξέων και αλκανοειδών (Paterson, 2006, Wang et al., 2015), μεταξύ των οποίων τα τριτερπένια και οι πολυσακχαρίτες να αποτελούν τα κύρια βιοενεργά συστατικά του. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει μερικούς τύπους τριτερπενίων, φαινολικών συστατικών και πολυσακχαριτών από τα καρποσώματα και τα καλλιεργούμενα μυκήλια του *G. resinaceum* (Amaral et al., 2008, Peng et al., 2013, Zengin et al., 2015).

1.7 Ανανεώσιμοι υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα

Η βιοτεχνολογική αξιοποίηση ανανεώσιμων σακχαρούχων πρώτων υλών σχετίζεται με ζύμωση φυτικής ύλης που περιέχει σάκχαρα ή μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα, καθώς και με τη ζύμωση βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων. Οι υδατάνθρακες βρίσκονται στα συστατικά των τροφίμων και αποτελούν πηγή ενέργειας και στοιχεία δομής (άμυλο, γλυκογόνο, κυτταρίνη). Τα κύρια συστατικά της φυτικής βιομάζας είναι η γλυκόζη και η ξυλόζη εκ των οποίων το μίγμα αυτών των σακχάρων δεν απαντάται πάντα αυτούσιο μέσα στην οργανική ύλη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, απαιτείται μία προεργασία ανάκτησης των σακχάρων η οποία επιτυγχάνεται μέσω ενζυματικής υδρόλυσης ή υδρόλυσης με οξέα. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σαν πηγή σακχαρούχων υλικών τα οποία δύνανται να αξιοποιηθούν μέσω της βιοτεχνολογικής οδού μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες.

Πρώτον, ταξινομούνται στις άμεσα ζυμώσιμες στις οποίες ανήκουν τα απλά σάκχαρα ή ολιγοσακχαρίδια (γλυκόζη, φρουκτόζη). Τα απλά σάκχαρα μπορούν να ζυμωθούν απευθείας ή να διασπαστούν πριν από τη ζύμωση (υδρολυτικές διεργασίες) όπως είναι κάποια φρούτα πλούσια σε φρουκτόζη και σακχαρόζη, το σακχαροκάλαμο, τα σακχαρότευτλα καθώς και τα προϊόντα επεξεργασίας αυτών, όπως είναι ο χυμός του σακχαροκάλαμου και η μελάσα.

Δεύτερον, τα βιομηχανικά απόβλητα πλούσια σε υδατάνθρακες όπως είναι τα απόνερα μετά το την επεξεργασία και κονσερβοποίηση λαχανικών και φρούτων. Οι υδατάνθρακες χωρίζονται σε απλούς όπως η μελάσα ή σύνθετους όπως το άμυλο. Τα συγκεκριμένα απόβλητα διαχειρίζονται με ορθολογικό τρόπο από τους ενυπάρχοντες Σταθμούς Βιολογικού Καθαρισμού ή στους κατά τόπους σηπτικούς βόθρους.

Τρίτον, ταξινομούνται στις αμυλούχες πρώτες ύλες με αρκετά αμυλούχα προϊόντα να έχουν

μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα σε διάφορες ζυμωτικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, το άμυλο είναι πολυμερές της γλυκόζης και αποτελείται από δύο τύπους μορίων, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Για την βιομετατροπή του αμύλου σε προϊόντα υψηλής αξίας όπως είναι το κιτρικό οξύ, απαιτείται μια διαδικασία που ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται η υδρόλυση του αμύλου με τη χρήση ενός αμυλολυτικού μικροοργανισμού, ή με την προσθήκη ενζύμων με αποτέλεσμα να μετατραπεί σε σάκχαρα ενώ στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ζύμωση όπου τα σάκχαρα μετατρέπονται στα τελικά προϊόντα.

Τέταρτον, τα κυτταρινούχα υλικά εκ των οποίων τα λιγνοκυτταρινικά υλικά, χαρακτηρίζονται ως την πιο άφθονη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας όσον αφορά το βιομηχανικό επίπεδο. Η λιγνοκυτταρίνη είναι ένα αρκετά πολύπλοκο υπόστρωμα που αποτελείται από τρία είδη πολυμερών υδατανθράκων (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) και λιγνίνης. Η λιγνινοκυτταρίνη είναι, περίπου, η μισή από τη συνολική ποσότητα ύλης που παράγεται από τη φωτοσύνθεση. Το ποσοστό του κάθε πολυμερούς ποικίλει μεταξύ των διάφορων φυτών με κατά μέσο όρο, η λιγνινοκυτταρίνη να αποτελείται από 45% κυτταρίνη, 30% ημικυτταρίνες και 25% λιγνίνη. Διάφορες προεργασίες (μηχανικές, χημικές, προ-επεξεργασία με ατμό) απαιτούνται για την αποσύνθεση της. Για την αξιοποίηση του συγκεκριμένου υποστρώματος είναι απαραίτητη η υδρόλυσή του, η οποία γίνεται κυρίως με ένζυμα.

1.8 Αξιοποίηση γεωργο-βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων

Τα γεωργο-βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα προέρχονται από τη δραστηριότητα των διαφόρων Γεωργικών Εκμεταλλεύσεων καθώς και των Γεωργικών Βιομηχανιών και Επιχειρήσεων Μεταποίησης και Επεξεργασίας Τροφίμων και Γεωργικών Προϊόντων. Λόγω της εντατικοποίησης της γεωργίας ο όγκος των παραπροϊόντων και αποβλήτων αυξάνει με ταχύτατους ρυθμούς με αποτέλεσμα τα δύο τρίτα των οργανικών αυτών αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγονται από τις γεωργικές και βιομηχανικές εκμεταλλεύσεις στις ανεπτυγμένες χώρες.

Ο σύγχρονος βιομηχανικός τρόπος ζωής έχει οδηγήσει στην αύξηση των παραγόμενων λυμάτων και αποβλήτων, ιδιαίτερα αυτών που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, με σοβαρές συνέπειες στο οικοσύστημα. Η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων είναι μόνιμη απειλή για το περιβάλλον, τους υδατικούς πόρους, το έδαφος και τη δημόσια υγεία (ατμοσφαιρική ρύπανση) καθώς αποσυντίθενται αρκετά γρήγορα, παράγοντας οργανικά οξέα και δύσοσμα συστατικά, κάνοντας δύσκολη την αποθήκευση και τη χρήση τους.

Τα λύματα είναι πλούσια σε οργανικά θρεπτικά συστατικά και όταν αποβάλλονται

στους υδάτινους αποδέκτες (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια), δημιουργούν μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο, προκειμένου να διασπαστούν αερόβια από βακτήρια και μύκητες. Η διαρροή των στοιχείων αυτών προκαλεί το φαινόμενο του ευτροφισμού με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία του οικοσυστήματος. Επίσης, η διαρροή αζώτου προς τα υπόγεια ύδατα, τα καθιστά ακατάλληλα για πόση. Άλλο ένα πρόβλημα που δημιουργείται είναι η έκλυση αερίων, όπως η αμμωνία και το μεθάνιο, τα οποία ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα.

Τα υγρά ή ημιστερεά απόβλητα τα οποία παράγονται κατά την γεωργική πρακτική μπορεί να είναι πλούσια σε υδατάνθρακες (σάκχαρα απλά ή σύνθετα), είτε πλούσια σε λίπος (βιομηχανικά λίπη και έλαια) ή υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά και άλατα (Arvanitoyannis et al., 2008).

Καινούριες μέθοδοι και πολιτικές έχουν προταθεί για την ανάκτηση, τη βιομετατροπή και τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών των αποβλήτων της επεξεργασίας τροφίμων ώστε να αντιμετωπιστεί η ρύπανση του περιβάλλοντος και ο αυξημένος όγκος των αποβλήτων που προκαλούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων και η ανάγκη για τη διατήρηση αλλά και ανάπτυξη μεθόδων ενέργειας ή και νέων υλικών. Η επεξεργασία των αποβλήτων και των παραπροϊόντων αποβλέπει στην ανακύκλωση τους, στην χρησιμοποίησή τους σε βιομηχανίες, τη μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας ή και τη χρήση ως ζωοτροφές μετά από βιολογική επεξεργασία. Ειδικότερα, η βιομετατροπή των αποβλήτων κέντρισε το ενδιαφέρον καθώς αντιπροσωπεύουν ένα δυνατό και αξιοποιήσιμο πόρο για τη μετατροπή σε χρήσιμα προϊόντα (Martin, 1983).

Οι μύκητες λευκής σήψης θεωρήθηκαν ιδανικοί για την βιολογική απορρύπανση οργανικών ρύπων καθώς αποτελούν σαπροφυτικούς βασιδιομύκητες στην συντριπτική τους πλειοψηφία και προκαλούν χαρακτηριστική λευκή σήψη όταν αναπτύξουν το μυκήλιο τους σε νεκρή οργανική ύλη όπως ξύλα και γενικά υποστρώματα πλούσια σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα συνεπώς, δεν απαιτείται η είσοδος του ρύπου στο κύτταρο για να επέλθει η διάσπαση του αλλά και είναι δυνατή η διάσπαση ακόμη και ρύπων που είναι προσροφημένοι στα εδαφικά κολλοειδή. Επίσης, τα ένζυμα που παράγουν είναι χαμηλής εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα που θα διασπάσουν με αποτέλεσμα να μπορούν να επιτελέσουν τουλάχιστον τα πρώτα καταβολικά βήματα στην διάσπαση δύσκολα βιοαποδομήσιμων οργανικών ρύπων.

Η χρήση των ανανεώσιμων γεωργικών και βιομηχανικών αποβλήτων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων συμβάλλουν στη μείωση του κόστους παραγωγής και την εξάρτηση από τις καλλιέργειες τροφίμων (Zahari et al., 2012). Πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες έχουν αναπτυχθεί, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις,

για την αξιοποίηση των παραπροϊόντων. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters, 2006). Αυτό οφείλεται στα υψηλής αξίας συστατικά τους όπως τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, τα λίπη κλπ. που μπορούν να βιομετατραπούν σε πρωτεΐνη, βιοαέριο, λίπασμα, οργανικά οξέα, λιπίδια, οργανικά οξέα, βιοπλαστικά, βιοαιθανόλη, 1,3-προπανοδιόλη και πληθώρα άλλων προϊόντων (Peters, 2006). Επιπλέον, τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, συμπεριλαμβανομένων των αγροτικών αποβλήτων, των δασικών υπολειμμάτων, τα αγρωστώδη και τα ξυλώδη υλικά, έχουν μεγάλες δυνατότητες για παραγωγή βιοκαυσίμων.

1.8.1 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου και η χρήση τους σαν συστατικά υποστρώματος καλλιέργειας μυκήτων

Με την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο παράγεται και μια σημαντική ποσότητα σε όγκο και οργανικό φορτίο υγρών αποβλήτων που προκαλούν σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις λόγω της τοξικής δράσης τους και της υψηλής ρυπογόνου δύναμης που διαθέτουν.

Τα ΥΕΑ αποτελούνται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούνται από 83-92% νερό, 4-16% οργανικά συστατικά, 1-2% ανόργανα συστατικά με το οργανικό κλάσμα να αποτελείται από σάκχαρα (1-8%), αζωτούχες ενώσεις (0,5-2,4%), οργανικά οξέα (0,5-1,5%), λιπίδια (0,02-1%), καθώς και φαινόλες και πηκτίνες (1-1,5%) (Greco et al, 1999). Τα ΥΕΑ χαρακτηρίζονται από σκούρο χρώμα, τιμές pH μεταξύ 3 και 6, υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία, έντονη μυρωδιά προκαλώντας αισθητική υποβάθμιση σε περίπτωση που διατεθούν στο περιβάλλον χωρίς κάποια επεξεργασία. Ακόμη, το υψηλό οργανικό φορτίο και η μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχουν και είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων στους φυσικούς αποδέκτες, τα καθιστούν ιδιαίτερα τοξικά για το περιβάλλον σε συνδυασμό με τον βραδύ ρυθμό αποδόμησής τους και γι αυτούς τους λόγους κρίνεται απαραίτητη η επεξεργασία τους προτού διατεθούν στους χειρσαίους και υδάτινους αποδέκτες.

Μεγάλο ενδιαφέρον, έχει παρουσιάσει η βιολογική μέθοδος επεξεργασίας των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων με τη χρήση μικροοργανισμών, όπως είναι οι μύκητες λευκής σήψης καθώς έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τη λιγνίνη, τη δεύτερη πιο άφθονη οργανική ουσία πάνω στη γη μετά την κυτταρίνη. Η συγκεκριμένη ιδιότητα, βρίσκει άμεση

εφαρμογή στην αποικοδόμηση των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων καθώς οι φαινολικές ενώσεις που περιέχουν έχουν δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της λιγνίνης. Για παράδειγμα, έχουν χρησιμοποιηθεί βασιδιομύκητες λευκής σήψης για την βιοαποδόμηση υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό τους, τη μείωση της φυτοτοξικής τους δράσης, και με ταυτόχρονη παραγωγή βιομάζας η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή ή στην καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών.

1.8.2 Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά της κυτταρίνης

Η κυτταρίνη είναι το απλούστερο από τα συστατικά που βρίσκονται σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά και ο κυριότερος πολυσακχαρίτης που απαντάται στη φύση αποτελώντας το κύριο δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων). Όλοι οι φυτικοί ιστοί αποτελούνται ως επί το πλείστον από τρεις βασικές μονάδες: κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Η κυτταρίνη, μόνη της ή με άλλες ενώσεις (κυρίως τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη) δημιουργεί τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, που αποτελούν τον "σκελετό" του κάθε κυττάρου με την κυτταρίνη να εξασφαλίζει την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος. Το όνομά της, δόθηκε από τον Γάλλο Χημικό Anselme Payen (19ος αιώνας), ο οποίος την όρισε ως τον πολυσακχαρίτη που αποτελούσε στοιχειώδη και ομοιόμορφο συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

Βασικός ρόλος της κυτταρίνης είναι να εξασφαλίζει την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω της οργάνωσης των πολυμερών μονάδων της σε μικροϊνίδια. Αποτελείται από κρυσταλλικές (περίπου 70% κρυσταλλικότητα) και άμορφες, έντονα υγροσκοπικές περιοχές στις οποίες δεσμοί υδρογόνου εγγυόνται την σύνδεση μορίων γλυκόζης στην ίδια αλλά και σε διαφορετικές αλυσίδες κυτταρίνης. Οι δεσμοί υδρογόνου τοποθετούν τις κυτταρινικές αλυσίδες σε παράλληλη διάταξη, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης, σχηματίζοντας έτσι συμπαγείς, κρυσταλλικές δομές (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Αποτελεί ένα σχετικά φθινό πολυμερές υλικό, κατάλληλο για παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού βιομηχανικών προϊόντων (χαρτί, ζάχαρη, χημικά, βιοπολυμερή, ενέργεια κλπ).

1.8.3 Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά ημικυτταρίνης

Οι ημικυτταρίνες ονομάζονται και ξυλάνες, είναι ετερογενείς πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από διαφορετικές μονάδες σακχάρων, ενώ έχουν τη θέση του δεύτερου πιο

άφθονου πολυσακχαρίτη στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών ιστών (Wagner, 2013). Σε αντίθεση με την κυτταρίνη που είναι κρυσταλλική, η ημικυτταρίνη είναι άμορφη, μη κρυσταλλική, υγροσκοπική, με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού και με υψηλή χημική δραστηριότητα και υδρολύεται ευκολότερα. Σχηματίζει πλέγμα διασταυρωμένων πολυσακχαριτών αποτελούμενο από διάφορες πεντόζες (σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα όπως ξυλόζη και αραβινόζη) και εξόζες (σάκχαρα με έξι άτομα άνθρακα όπως γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη).

Η ημικυτταρίνη διαδραματίζει τον ρόλο του συνδετικού κρίκου ανάμεσα στην λιγνίνη και την κυτταρίνη, εξασφαλίζοντας συνεκτικότητα στον κυτταρικό ιστό. Αποτελείται από μια κεντρική αλυσίδα με μονάδες D-ξυλοπυρανόζης ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Οι ημικυτταρίνες ταξινομούνται βάσει του κυριότερου μονομερούς σακχάρου τους που βρίσκεται στο σκελετό του δομικού πολυμερούς σε ημικυτταρίνες (οι οποίες έχουν σκελετό από πολύ-β-1,4-ξυλάνη) με πλευρικές συνδέσεις σε αραβινόζη, μαννάνες (οι οποίες αποτελούνται από γλυκομαννάνες, γαλακτομαννάνες και αραβινογαλακτάνες), γλυκάνες, αραβινάνες και γαλακτάνες (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013). Τα αγρωστώδη υλικά και το άχυρο περιέχουν αραβινάνες, γαλακτάνες και ημικυτταρίνες, ενώ οι μαννάνες είναι συστατικό που βρίσκεται στα σκληρά και μαλακά ξυλώδη υλικά (Anwar et al., 2014).

Η πλήρης αποικοδόμηση της απαιτεί ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των ενδο-β-1,4 ξυλανάσων που υδρολύουν τους γλυκοσιδικούς δεσμούς σε ημικυτταρίνη που απελευθερώνει ολιγοσακχαρίτες. Καθώς η ημικυτταρίνη παρουσιάζει διακλαδισμένη δομή, η πλήρης διάσπασή της απαιτεί ένζυμα που δρουν στην πλευρική της αλυσίδα.

1.8.4 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι η δεύτερη σε αφθονία οργανική ένωση μετά την κυτταρίνη στη φύση. Είναι ένα τρισδιάστατο, σφαιρικό, ακανόνιστο, αδιάλυτο, υψηλού μοριακού βάρους πολυμερές, αποτελούμενο από υπομονάδες φαινυλοπροπανίου, χωρίς αλυσίδες κανονικά επαναλαμβανόμενων μονάδων, ή κάποιους δεσμούς που μπορούν να υδρολύονται εύκολα, είτε χημικά, είτε ενζυμικά. Επίσης, χαρακτηρίζεται ως το πιο άφθονο ανανεώσιμο αρωματικό πολυμερές στη φύση, το οποίο αποτελείται από μη φαινολικές (80-90%) και φαινολικές δομές. Ο ρόλος της είναι να συμπληρώνει τα κενά ανάμεσα και γύρω από το πλέγμα κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με πολυμερή (Anwar et al., 2014).

Στα φυτά η λιγνίνη συνδέεται με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη σχηματίζοντας

μία φυσική ασπίδα για το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Η λιγνίνη είναι ιδιαίτερα σημαντική για το σχηματισμό των κυτταρικών τοιχωμάτων καθώς προσδίδει ακαμψία, αντοχή και ανθεκτικότητα στα φυτά, δημιουργώντας ένα εμπόδιο στη μικροβιακή προσβολή και την αποδόμηση του ξύλου (Ταούκης κ.ά., 2009). Η λιγνίνη περιέχει τρεις αρωματικές αλκοόλες, που σχηματίζουν ένα προστατευτικό μανδύα γύρω από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (Godliving and Mtui, 2009).

Η ιδιαίτερη δομή του μορίου της λιγνίνης την καθιστά δύσκολη στην αποδόμηση. Η δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι η λιγνίνη είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος με τις βασικές μονάδες να συνδέονται μεταξύ τους με σταθερούς ανθρακικούς και αιθερικούς δεσμούς, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς δημιουργώντας έτσι το ιδιαίτερα πολύπλοκο και πολύ σταθερό μόριο της λιγνίνης. Οι μύκητες χρησιμοποιούν εξωκυτταρικούς μηχανισμούς για να διασπάσουν αυτό το μεγάλο και έντονα διακλαδιζόμενο πολυμερές. Στους μηχανισμούς περιλαμβάνονται οξειδωτικές αντιδράσεις και σε λιγότερο βαθμό υδρολυτικές ώστε να αποδομηθούν οι σταθεροί αιθερικοί και ανθρακικοί δεσμοί του μορίου.

Αποτελεί σημαντικό υπόλειμμα σε βιομηχανικές διεργασίες (π.χ. παραγωγή χαρτοπολτού) και η αξιοποίησή της είναι περιορισμένη με την εξεύρεση οικονομικών μεθόδων να αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την Έρευνα και Ανάπτυξη και για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Folkedahl, 2016).

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίαρχα υπεύθυνοι για την αποδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης είναι οι μύκητες και οι πιο ισχυροί αποικοδομητές αυτής της κατηγορίας είναι οι βασιδιομύκητες (Kirk & Farrell, 1987). Οι μύκητες λευκής σήψης αποδομούν τη λιγνίνη εκκρίνοντας ένζυμα, τα οποία ονομάζονται λιγνινάσες. Ανακαλύφθηκαν το 1980 στον μύκητα *P. chrysosporium* (Tien, 1983) και λόγω της υψηλής οξειδοαναγωγικής τους αξίας, αναφέρθηκαν ως λιγνινάσες. Οι λιγνινάσες περιλαμβάνουν δύο οικογένειες λιγνινολυτικών ενζύμων οι οποίες είναι οι φαινολικές οξειδάσες στις οποίες ανήκει η λακκάση (Lac) και οι υπεροξειδάσες, στις οποίες ανήκουν η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) (Dashtban et al., 2009). Σπάνια συναντιούνται και τα τρία αυτά ένζυμα σε έναν μικροοργανισμό, δηλαδή ο κάθε μικροοργανισμός μπορεί να παράγει διαφορετικό συνδυασμό λιγνινολυτικών ενζύμων όπως, Lac-MnP, Lac-LiP ή MnPLiP (Steinbuechel, 2001). Συγκεντρωτικά τα εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που παίζουν ρόλο στην αποδόμηση της λιγνίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της λιγνίνης (Hattaka, 2001)

| Ένζυμο | Συνένζυμο | Υπόστρωμα | Επίδραση ή αντίδραση |
|-------------------------------------|-------------------------------|---|--|
| Υπεροξειδάση της λιγνίνης, LiP | H ₂ O ₂ | Βερατρυλική αλκοόλη | Αρωματικός δακτύλιος οξειδώνεται στην αντίστοιχη κατιοντική ρίζα |
| Υπεροξειδάση του μαγγανίου, MnP | H ₂ O ₂ | Mn ⁺² , οργανικά οξέα, θειόλες, ακόρεστα λιπίδια | Mn ⁺² οξειδώνεται σε Mn ⁺³ , οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε φαινοξυλικές ρίζες |
| Ευέλικτη υπεροξειδάση, VP | H ₂ O ₂ | Παρόμοιες ενώσεις με LiP και MnP | Ίδια επίδραση με την LiP και MnP |
| Λακκάση, Lac | O ₂ | Φαινόλες, διαβιβαστές (mediators) π.χ. ABTS | Φαινόλες οξειδώνονται σε φαινοξυλικές ρίζες |
| Οξειδάση της γλυοξάλης, GLOX | O ₂ | Γλυοξάλη, μεθυλική γλυοξάλη | Γλυοξάλη οξειδώνεται σε γλυοξυλικό οξύ, παραγωγή H ₂ O ₂ |
| Οξειδάση της αρυλικής αλκοόλης, AAO | O ₂ | Αρωματικές αλκοόλες | O ₂ ανάγεται σε H ₂ O ₂ |
| Αφυδρογονάση της κελλοβιόζης, CBQ | | Κελλοβιόζη | Αναγωγή των ο- και p-κινονών |

1.8.5 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένα βιοπολυμερές, ανήκει στην κατηγορία των υδατανθράκων και είναι ένας πολυσακχαρίτης. Αποτελείται από μόρια γλυκόζης, που ενώνονται με γλυκοζιτικό δεσμό, και παράγεται στα κύτταρα των φυτών από 2 άλλους πολυσακχαρίτες την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Το άμυλο αποτελεί αποταμιευτικό πολυσακχαρίτη των φυτών, και διασπώμενο αποδίδει μόρια γλυκόζης, τα οποία, το φυτό χρησιμοποιεί πρωτίστως για την παραγωγή ενέργειας. Η αποσύνθεσή του, λαμβάνει χώρα μέσα από μια σύνθετη διαδικασία ενζυμικής επίθεσης, από την οποία απελευθερώνεται ενέργεια. Το άμυλο μπορεί να διασπαστεί κατά κύριο λόγο από δύο είδη ενζύμων, τις α-αμυλάσες και τις β-αμυλάσες οι οποίες διασπούν τον α-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό, αλλά διαφέρουν ως προς τα σημεία της

πολυσακχαρικής αλυσίδας που διασπών. Το άμυλο χρησιμοποιείται στα τρόφιμα για να προσδώσει υφή, για να αυξήσει τον όγκο, ως κολλοειδής σταθεροποιητής, ως ζελατινοποιητής καθώς και για να συγκρατεί το νερό.

1.9 Ένζυμα

Οι βασιδιομύκητες έχουν χαρακτηριστεί ως μύκητες λευκής σήψης (ξυλοσηπτικοί), που προκαλούν εξαιρετικά επιλεκτική και εκτεταμένη αποξύλωση-απολιγνίνωση (Pointing, 2001). Οι συγκεκριμένοι μύκητες έχουν αναπτύξει δύο διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους αποκτούν πρόσβαση στο ξύλο, είτε με την ταυτόχρονη αποικοδόμηση της λιγνίνης, της ημικυτταρίνης, και της κυτταρίνης είτε με την επιλεκτική αποδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης (Campbell, 1932).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο κάθε μύκητας αντιδρά διαφορετικά στο εκάστοτε υπόστρωμα, παράγοντας διαφορετικά ένζυμα. Οι ξυλοσηπτικοί μύκητες αποκτούν πρόσβαση στο ξύλο στα πρώτα στάδια της “επίθεσης”, μέσω οξειδωσης και υδρόλυσης (Dill και Kraepeling, 1986). Οι μύκητες του γανοδέρματος παράγουν διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση της λιγνίνης αλλά εκκρίνουν και κυτταρινάσες, ξυλανάσες και άλλες ημικυτταρινάσες. Οι περισσότεροι μύκητες εκκρίνουν υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) και λακκάσες (Lac), αλλά μερικοί παράγουν και υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) (Hatakka, 1994). Οι μύκητες λευκής σήψης αποικοδομούν τη λιγνίνη εκκρίνοντας ένζυμα, τα οποία συνολικά αναφέρονται ως λιγνινάσες. Οι λιγνινάσες μπορούν να χωριστούν σε δύο οικογένειες τις φαινολικές οξειδάσες, στις οποίες ανήκουν οι λακκάσες (Lac) και τις υπεροξειδάσες, στις οποίες ανήκουν οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) και οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP).

Τα ένζυμα, έχει παρατηρηθεί ότι χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών διεργασιών. Η λακκάση, η υπεροξειδάση της λιγνίνης και η υπεροξειδάση του μαγγανίου είναι τα κύρια ένζυμα, τα οποία εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης και των οργανικών ρύπων (Arora and Gill, 2001; Casas et al., 2009), τον αποχρωματισμό χρωστικών (Dominguez et al., 2005), την επεξεργασία τροφίμων (Couto and Herrera, 2006), την βιοπολυτοποίηση και βιολευκανση (Bermek et al., 2002), σταθεροποίηση χυμού και ποτών (Minussi et al., 2002) οξείδωση φαινολικών και μη φαινολικών ενώσεων (Cantarelli et al., 1989; Tien and Kirt, 1983; Hammel et al., 1993; Wong, 2009).

Για την αποικοδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης λαμβάνουν μέρος δύο εξωκυτταρικά ενζυμικά συστήματα, το υδρολυτικό που παράγει υδρολάσες οι οποίες αποδομούν την

κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη με τα υδρολυτικά ένζυμα της κυτταρίνης να είναι οι ενδογλυκανάσες, οι β-γλυκοζιδάσες και οι κελλοβιοϋδρολάσες, ενώ της ημικυτταρίνης οι ενδοξυλανάσες και οι ενδομαννανάσες και το οξειδωτικό, το οποίο διασπά τους φαινολικούς δακτυλίους της λιγνίνης με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό της. Το οξειδωτικό ενζυμικό σύστημα περιλαμβάνει κυρίως υπεροξειδάσες, όπως την υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP), την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και πολυφαινολοξειδάσες όπως είναι η λακκάση (Lac) (Gadd, 2001).

Οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου και οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης οξειδώνουν μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις με υψηλό δυναμικό οξειδο-αναγωγής, όπως τα κύρια συστατικά του πολυμερούς, λιγνίνη (Pointing, 2001). Η λακκάση, οξειδώνει μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις με σχετικά χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής, όμως παρουσία χαμηλού μοριακού βάρους μεσολαβητών, οξειδώνουν με υψηλό δυναμικό (D'Souza κ.ά., 1999). Με τον καταλυτικό μηχανισμό της λακκάσης και των υπεροξειδασών οι ξυλοσηπτικοί μύκητες προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά όταν αναπτύσσονται σε ξυλώδη υποστρώματα και όταν οι μύκητες αναπτύσσονται σε υγρό περιβάλλον δηλαδή υπό μορφή μυκηλίου, ο τρόπος πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, είναι λιγότερο περίπλοκος παρουσία απλών σακχάρων. Το σάκχαρο που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η γλυκόζη, αν και ως πηγή άνθρακα έχει χρησιμοποιηθεί: λακτόζη (Tang και Zhong, 2002), σακχαρόζη, μαννόζη, συνδυασμοί αυτών ακόμα και γλυκερόλη και υγρά απόβλητα ελαιολιβείου (Tsiouplas κ.ά., 2002, Fountoulakis κ.ά. 2002, Aggelis κ.ά., 2003, Andre κ.ά., 2010, Lakhtar κ.ά., 2010). Υπό συγκεκριμένες συνθήκες όπου η πηγή άνθρακα είναι βιοπολυμερές τύπου πολυσακχαριτών, διάφοροι μικροοργανισμοί παράγουν εξειδικευμένα ένζυμα, όπως οι λυάσες πολυσακχαριτών, ώστε να υδρολύσουν τα πολυμερή αυτά στα μονομερή σάκχαρα (Giavasis, 2013). Όσον αφορά στην πηγή αζώτου, συνήθως χρησιμοποιείται πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης που είναι οργανική μορφή αζώτου ή ανόργανη πηγή αζώτου (Jayasinghe κ.ά. 2008, Petre κ.ά. 2010).

Η ενζυμική προεπεξεργασία χρησιμοποιεί καθαρά ένζυμα που προέρχονται από τους ίδιους τους οργανισμούς για την επίτευξη κοινού στόχου. Για την επεξεργασία του λιγνοκυτταρινικού υποστρώματος, τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται εκτενώς είναι η λακκάση, το υπεροξειδίο του μαγγανίου και το βερσατιλικό υπεροξειδίο. Οι μύκητες που επιλέχθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, παράγουν ένζυμα που δρουν στη λιγνίνη, όπως λακκάση, υπεροξειδάση της λιγνίνης και υπεροξειδάση του μαγγανίου, τα οποία την αποδομούν εν μέρει και την καθιστούν δομικά πιο ευάλωτη (Wanga et al., 2013).

1.9.1 Λιγνινολυτικά ένζυμα

1.9.1.1 Υπεροξειδάση της λιγνίνης

Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν τη δυνατότητα μέσω ενός ενζυμικού συστήματος που διαθέτουν να διασπών τη λιγνίνη και έτσι μπορούν να αναπτύσσονται σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Τα κύρια ένζυμα που παράγουν είναι η λακκάση, η υπεροξειδάση της λιγνίνης και η υπεροξειδάση του μαγγανίου. Αρχικά, η υπεροξειδάση της λιγνίνης περιγράφηκε στο μύκητα *P. chrysosporium* (Gold et al., 1986, Tien & Kirk, 1983) και είναι χαρακτηριστική ανάμεσα στους μύκητες λευκής σήψης, ενώ έχει απομονωθεί και από καλλιέργειες μυκήτων καστανόχρωμης σήψης (Dey et al., 1991). Η υπεροξειδάση της λιγνίνης, είναι μια εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη με pH περίπου 3.0 η οποία οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Kirk & Farrell, 1987). Για να επανέλθει στην αρχική κατάσταση προσλαμβάνει από το υπόστρωμα δύο ηλεκτρόνια από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων. Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων αποτελεί υπόστρωμα για την οξείδωση που καταλύεται από την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), περιλαμβάνοντας μια πληθώρα μη φαινολικών υποστρωμάτων. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης δρα στη διάσπαση του δεσμού C_a-C_b που είναι βασική αντίδραση της λιγνινόλυσης. Από τη δράση της λιγνινάσης στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα γίνεται αποπολυμερισμός με ενδιάμεσο στάδιο το σχηματισμό ελευθέρων ριζών που αντιδρούν σε μια σειρά μετενζυμικών αντιδράσεων (Tien, et al., 1988).

1.9.1.2 Υπεροξειδάση του Μαγγανίου

Η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP), παράγεται από ορισμένους βασιδιομύκητες και ανακαλύφθηκε αμέσως μετά την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) από τους Kuwahara et al. (1984) και περιγράφηκε από τους Glenn και Gold (1986). Ανήκει στην κατηγορία των αιμο-υπεροξειδασών, η δράση της οποίας είναι εξαρτώμενη από την παρουσία του μαγγανίου, προκαλώντας την αποδόμηση φαινολικών συστατικών και άλλων αρωματικών ενώσεων. Είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει αίμη και χρησιμοποιεί υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) για να οξειδώσει το ιόν του μαγγανίου (Mn⁺²) σε ένα χηλικό σύμπλοκο του ιόντος Mn⁺³ (Gold et al., 1989). Το σχηματιζόμενο Mn⁺³ είναι ιδιαίτερα δραστικό και συμπλοκοποιείται με τα χηλικά οργανικά οξέα όπως οξαλικό ή μαλικό οξύ, τα οποία παράγονται από τους μύκητες και αποτελεί ένα εύκολα διαχεόμενο, μη ειδικευμένο οξειδωτικό σώμα (Hofrichter et al., 1999; Makela et al., 2002, Cui & Dolphin 1990).

Μελέτες αναφέρουν ότι μύκητες λευκής σήψης, όπως ο *P. chrysosporium*, με τη βοήθεια της Mn-υπεροξειδάσης που παράγουν, παρουσιάζουν την ικανότητα να αποδομούν πλήθος ενώσεων με ρυπογόνο δράση, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών συστατικών. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της υπεροξειδάσης του μαγγανίου (MnP) είναι μικρότερο σε σύγκριση με την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και οξειδώνει επιλεκτικά τα φαινολικά υποστρώματα. Οι παραγόμενες φαινοξυλικές ρίζες αντιδρούν περαιτέρω αποικοδομώντας κατάλοιπα λιγνίνης μέχρι το σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης του μαγγανίου MnP αρχίζει με τη δέσμευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) στην αίμη, το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

1.9.1.3 Λακκάση

Ένα από τα κύρια ένζυμα που παράγουν οι βασιδιομύκητες και στο οποίο οφείλεται η διάσπαση των φαινολικών ενώσεων είναι η λακκάση. Η λακκάση, (Lac) είναι μία πολυφαινολική οξειδάση και συγκεκριμένα είναι μέλος μιας ομάδας ενζύμων γνωστών ως μπλε οξειδασών που περιέχει χαλκό στο μόριο της και χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για να οξειδώσει διάφορες αρωματικές και μη ενώσεις μέσω ενός μηχανισμού αντίδρασης με ρίζες. Οι λακκάσες είναι μονομερείς πρωτεΐνες με τέσσερα άτομα χαλκού και έχουν μοριακά βάρη ανάμεσα σε 50 και 300 kDa και όξινα ισοηλεκτρικά σημεία (Mester & Tien, 2000). Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδροξυλομάδων της λιγνίνης από το ένζυμο λακκάση πραγματοποιείται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και το σχηματισμό ριζών, οι οποίες είναι πολύ δραστικές και μπορούν να προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις (Thurston, 1994). Οι λακκάσες είναι φαινολοξειδάσες καταλύοντας την οξείδωση των φαινολών με αποτέλεσμα η απομάκρυνση της φαινόλης να ενισχύει την ανάπτυξη μικροβίων, να βελτιώνει την ικανότητα ζύμωσης και να μειώνει το χρόνο υστέρησης. Βρίσκονται σε μεγάλη ποικιλία φυτών και μυκήτων χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο για να οξειδώσει διάφορες αρωματικές και μη ενώσεις μέσω ενός μηχανισμού αντίδρασης με ρίζες. Ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης αποτελείται από μια ελεγχόμενη ροή ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στην καταλυτική τριάδα (και ακολούθως στο οξυγόνο). Αυτός ο τύπος είναι γενικά ασταθής και υπόκεινται σε περαιτέρω αντιδράσεις, είτε αυθόρμητες (για παράδειγμα πολυμερισμός ή διάσπαση) ή ενζυμικά καταλυόμενες (αναγωγή ή οξείδωση σε κινόνη). Η λακκάση έχει αντοχή σε θερμοκρασίες μέχρι και τους 60 °C (Solomon, et al., 1996). Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών και των υδροξυλομάδων της λιγνίνης από το ένζυμο λακκάση πραγματοποιείται με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και

το σχηματισμό ριζών, οι οποίες είναι πολύ δραστικές και μπορούν να προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις (Thurston, 1994). Όπως συμβαίνει με την υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και με την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), η λακκάση δρα μέσω των οξειδοαναγωγικών μεσολαβητών ή ενδιάμεσων προϊόντων στα υποστρώματα, τα οποία δεν μπορούν να οξειδωθούν από το ένζυμο ή δεν είναι προσβάσιμα υπό κανονικές συνθήκες.

1.9.2 Ένζυμα υδρόλυσης

1.9.2.1 Ημικυτταρινάσες

Η ημικυτταρίνη, αποικοδομείται από τις ημικυτταρινάσες. Οι ημικυτταρινάσες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν β-1,4 δεσμούς στην ημικυτταρίνη και να παράγουν ολογιμερή, τα οποία υδρολύονται περαιτέρω σε γλυκόζη από τη β-ξυλοζιδάση (Dashtban et al., 2009). Οι ημικυτταρινάσες είναι συνήθως σύμπλεγμα πρωτεϊνών και έχουν λειτουργικές μονάδες, όπως οι μονάδες πρόσδεσης σακχάρων, πέρα από τις καταλυτικές περιοχές που διαθέτουν. Οι ημικυτταρίνες βιοαποδομούνται σε μονομερή σάκχαρα και οξικό οξύ (Sánchez, 2009). Η πλήρης αποσύνθεσή τους απαιτεί συνεργατικές δράσεις μιας ποικιλίας υδρολυτικών ενζύμων.

1.9.2.2 Αμυλάση

Με τον όρο αμυλάση περιγράφεται το ένζυμο που μπορεί να αποικοδομεί το άμυλο σε υδατάνθρακες με μικρότερο μήκος αλυσίδας. Η διάσπαση του αμύλου από τις αμυλάσες γίνεται με υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και τελικά γλυκόζη.

1.9.2.3 Κυτταρινάσες

Η κυτταρίνη είναι πολυμερές αποτελούμενο από μόρια γλυκόζης που ενώνονται με (1,4)-β-D- γλυκοζιτικούς δεσμούς και σχηματίζουν ευθείες αλυσίδες, τις αλυσίδες κυτταρίνης οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Η υδρόλυση του β-1,4-γλυκοζιτικού δεσμού στην κυτταρίνη επιτυγχάνεται με ένζυμα γνωστά ως κυτταρινάσες, τα οποία χρησιμοποιούν δύο διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς, το μηχανισμό της διατήρησης και της αναστροφής. Και στους δύο μηχανισμούς, δύο καταλυτικές καρβοξυλικές ομάδες καταλύουν την αντίδραση με όξινη κατάλυση. Η εφαρμογή ενζύμων για την κατάλυση της αποδόμησης της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης σε ελεύθερα

σάκχαρα θεωρείται εδώ και πολύ καιρό η πιο βιώσιμη στρατηγική για την παροχή οικονομικά αποδοτικής δεύτερης γενιάς αιθανόλη (Himmel et al. 2007; Meyer et al. 2009). Πολλά διαφορετικά είδη μυκήτων έχουν την ικανότητα να αποδομούν την κυτταρίνη παράγοντας εξωκυτταρικά ένζυμα αποδόμησης της κυτταρίνης, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων ενδοδιάσπασης (ενδογλυκανάσες-EG) και έξω-διάσπασης (κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλυκανάσες-CBH). Οι ενδογλυκανάσες και οι εξωγλυκανάσες μαζί με την β-γλυκοσιδάση ονομάζονται κυτταρινάσες διότι δρουν συνεργατικά στη βιοαποικοδόμηση της κυτταρίνης, συμβάλλοντας έτσι στη θρέψη των μυκήτων.

1.9.2.4 Ενδογλυκανάσες

Οι ενδογλυκανάσες (EG) ή αλλιώς ενδοκυτταρινάσες, οι οποίες αναφέρονται και ως καρβοξυμέθυλ-κυτταρινάσες (CMCs), διασπούν εσωτερικούς δεσμούς στις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης παράγοντας διαφόρων μεγεθών ολιγοσακχαρίτες και δημιουργώντας νέα άκρα στην αλυσίδα της κυτταρίνης τα οποία έλκουν εξωγλυκανάσες (Reese & Mandels, 1959). Από έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι οι ενδογλυκανάσες δεν μπορούν να διασπάσουν αποτελεσματικά τους πολυσακχαρίτες, χωρίς τη βοήθεια των μη καταλυτικών μονάδων πρόσδεσης υδατάνθρακα. Έτσι, η ενδογλυκανάση βρίσκεται υπό την μορφή ενός συμπλόκου που αποτελείται από τρεις δομικές αυτοτελείς περιοχές, την καταλυτική υπομονάδα, την υπομονάδα πρόσδεσης στον πολυσακχαρίτη και το συνδετικό πεπτίδιο. Το ενεργό κέντρο της ενδογλυκανάσης είναι εύκολα προσεγγίσιμο από τις αλυσίδες της κυτταρίνης, λόγω της ανοικτής διαμόρφωσής του έχοντας μια ανοικτή διαμόρφωση, που επιτρέπει την προσέγγιση των αλυσίδων της κυτταρίνης χωρίς κάποια παρεμπόδιση. Έτσι, το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των γλυκοζιδικών δεσμών σε τυχαίες θέσεις του πολυσακχαρίτη (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2013).

1.10 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές λιγνινολυτικών ενζύμων

Τα λιγνινοκυτταρινικά υλικά αποτελούν την πιο άφθονη πρώτη ύλη, καθιστώντας τα φυσικό και ανανεώσιμο πόρο. Σημαντική ποσότητα τέτοιων υλικών παράγεται συνεχώς ως απόβλητα υποπροϊόντα γεωργικών πρακτικών, κυρίως από διάφορες αγροτοβιομηχανίες (Anwar et al. 2014). Η συγκεκριμένη βιομάζα θεωρείται ότι είναι ο μόνος προβλέψιμος εφικτός και βιώσιμος πόρος για ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και χημικά προστιθέμενης αξίας (Sánchez 2009). Η λιγνινοκυτταρίνη περιλαμβάνει έως και 75% υδατάνθρακες και

αποτελεί σημαντική πηγή ζυμώσιμων υδατανθράκων για την παραγωγή υγρών βιοκαυσίμων, καθώς και μια ποικιλία χημικών προϊόντων (απορρυπαντικά, κόλλες, λιπαντικά, χρώματα και χρωστικές) και βιοαποδομήσιμων υλικών, συμπεριλαμβανομένων βιοπλαστικών, επιφανειοδραστικών, βιοκαυσίμων, ελαίων και λιπαρών οξέων (Turner et al. 2007).

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία και στη βιοτεχνολογία καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μία μεγάλη ποικιλία διεργασιών παρουσιάζοντας δυνατότητες εφαρμογής σε τομείς όπως είναι τα τρόφιμα, τα καύσιμα, η γεωργία, λεύκανσης χαρτιού, κλωστοϋφαντουργίας και ως εργαλεία για έρευνα και ανάπτυξη (E&A) (Howard et al. 2003). Το λιγνινολυτικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψης παρουσιάζει πλεονέκτημα έναντι των φυσικών και χημικών μεθόδων επεξεργασίας καθώς τα λιγνινολυτικά ένζυμα είναι βιοδιασπώμενοι καταλύτες και οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ήπιες συνθήκες.

Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία υφασμάτων και χρωστικών αποδομώντας χρωστικές με ποικιλία χημικής δομής συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών βαφών που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως στη βιομηχανία καθώς οι υπάρχουσες διεργασίες επεξεργασίας των αποβλήτων από τις βιομηχανίες χρωστικών δεν είναι αποτελεσματικές και οικονομικές. Παρομοίως, η υπεροξειδάση της λιγνίνης έχει αξιολογηθεί στον αποχρωματισμό διαφόρων συνθετικών βαφών ενώ, η υπεροξειδάση του μαγγανίου μπορεί εξ' ίσου να αποδομήσει χρωστικές ουσίες (Maciel et al., 2010). Ακόμη, η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων σε διεργασίες που ενισχύουν ή τροποποιούν το χρώμα των ποτών και των τροφίμων, εξαλείφοντας τις ανεπιθύμητες φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αμαύρωση και τη θολερότητα σε υγρά παρασκευάσματα όπως είναι η μύρα, το κρασί και ο χυμός φρούτων (Maciel et al., 2010). Η λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιοεξυγίανση ρυπασμένων περιοχών χρησιμοποιώντας βιολογικές διεργασίες για την καταστροφή ή μετατροπή των ρύπων. Επίσης, μπορεί να αποδομήσει τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAHs) οι οποίοι προκαλούνται από τη βιομηχανία πετρελαίου και ανήκουν στην κατηγορία των επίμονων τοξικών ενώσεων έχοντας σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον λόγω των μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους (Maciel et al., 2010). Επιπλέον, η λακκάση χρησιμοποιείται ως βιοκαταλύτης στην οργανική σύνθεση. Ο ενζυμικός πολυμερισμός με τη χρήση λακκάσης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον καθώς έχει την ικανότητα να παράγει κατευθείαν πολυμερή τα οποία είναι αδύνατο να παραχθούν μέσω συμβατικών χημικών συνθέσεων. Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές στην οργανική σύνθεση, όπως η οξειδωση

λειτουργικών ομάδων, η σύζευξη των φαινολών και των στεροειδών, ως ιατρικοί παράγοντες (αναισθητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά και ηρεμιστικά), στην δημιουργία δεσμών άνθρακα αζώτου, στη σύνθεση περίπλοκων φυσικών προϊόντων και στις βιομηχανίες καλλυντικών (Maciel et al., 2010).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενική Παρουσίαση

Στη συγκεκριμένη ενότητα, περιγράφεται η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την αύξηση και οι συνθήκες καλλιέργειας που επιλέχθηκαν κατά τη ζύμωση των τεσσάρων φαρμακευτικών μυκητών του γένους *Ganoderma* (*G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*). Επιπλέον, γίνεται αναφορά στα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ώστε να προσδιορισθεί η αύξηση και τα μεταβολικά προϊόντα των μυκήτων, ενώ δίνονται πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες λειτουργίας των αναλυτικών συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν και γενικότερα του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων (ΙΤΑΠ) (ΕΛΓΟ -ΔΗΜΗΤΡΑ) πραγματοποιήθηκαν οι υγρές ζυμώσεις των μυκήτων όπως και οι αναλύσεις, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής Ταυτοποίησης (ΙΤΑΠ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ).

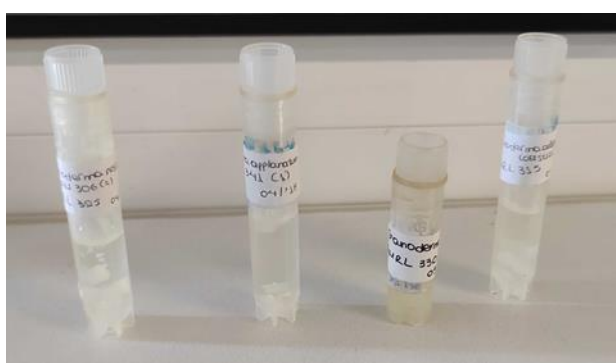
2.2 Θρεπτικά υλικά καλλιέργειας

2.2.1 Βιολογικό υλικό

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα πειράματα που διεξήχθησαν, έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν τέσσερα φαρμακευτικά μανιτάρια, τα οποία ανήκουν στην κλάση των Βασιδιομυκήτων. Τα μανιτάρια αυτά διατηρούνται στην τράπεζα καλλιέργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ) και φέρουν κωδικό αριθμό καταχώρησης AMRL (Athens Mushroom Research Laboratory) όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 και Εικόνα 7.

Πίνακας 3: Τα είδη μακρομυκήτων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία

| Συνομοταξία | Είδος μακρομύκητα | AMRL | Προέλευση |
|----------------|-----------------------------|------|--|
| Βασιδιομύκητες | <i>Ganoderma adspersum</i> | 315 | Ανήκουν στη συλλογή μυκητιακής καλλιέργειας του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ) |
| | <i>Ganoderma applanatum</i> | 341 | |
| | <i>Ganoderma lucidum</i> | 330 | |
| | <i>Ganoderma resinaceum</i> | 325 | |



Εικόνα 7: Είδη φαρμακευτικών μυκήτων υπό μορφή εμβολίου διαμέτρου 3 mm μέσα σε αποστειρωμένο νερό στους $5\pm 0,5$ °C και φέρουν κωδικό αριθμό καταχώρησης AMRL (Athens Mushroom Research Laboratory)

2.2.2 Θρεπτικό υλικό προκαλλιέργειας

Όλοι οι μελετώμενοι μύκητες διατηρούνται είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με mineral oil, είτε σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Darmstadt, Germany) 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). Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση των τρυβλίων σε συνθήκες θερμοκρασίας $25\pm 0,5$ °C και σε σχετική υγρασία 75%. Μετά την πάροδο ορισμένων ημερών (περίπου 10-15 ημερών) και ανάλογα με τον μύκητα, εμφανίστηκε η ανάπτυξη της αποικίας Εικόνα 8.



Εικόνα 8: Ανάπτυξη μυκηλίου σε τρυβλία με PDA α) ανάπτυξη μύκητα 4 ημερών β) ανάπτυξη μύκητα 7 ημερών γ) ανάπτυξη μύκητα 10 ημερών

2.2.3 Θρεπτικό υλικό υγρής ζύμωσης

Σε ποτήρι ζέσεως με 1 λίτρο απιονισμένου νερού, προστέθηκαν τα υλικά σύνθεσης του θρεπτικού μέσου (ανάλογα το υπόστρωμα) και αναδεύτηκαν έως ότου προκύψει ένα ομοιογενές μίγμα. Στη συνέχεια, σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου των 100 ml, πληρωμένες με 30 ± 1 ml θρεπτικό υλικό, πραγματοποιήθηκαν οι καλλιέργειες ως ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου. Για την επίτευξη του λόγου C/N=20, η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 30 g/l, χρησιμοποιήθηκε η χημικώς καθαρή γλυκόζη [D(+)- glucose, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany] για το υπόστρωμα YEA και για το υπόστρωμα της λιγνίνης, Lignin, alkali Kraft, ALDRICH, SKU: 370959-100G, ενώ για την ημικυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε η D-Xylose C₅H₁₀O₅, Mr=150,13 SERVA, για το άμυλο, το Starch, soluble, ACS Powder, CAS: 9005-84-9, EEC No: 232-686-4, Alfa Aesar GmbH & Co KG και για την κυτταρίνη η Cellulose, microcrystalline, CAS: 9004-34-6, EEC No: 232-674-9, Alfa Aesar GmbH & Co KG. Ως κύρια πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη (Merck, Darmstadt, Germany) και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Fluka, Steinheim, Germany) σε συγκέντρωση 3,5 και 2,5 g/l. Τα συστατικά αυτά περιείχαν επίσης ορισμένη ποσότητα οργανικού αζώτου και άνθρακα. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα ζύμης περιείχε 11% (κ.β.) άζωτο και 10% (κ.β.) άνθρακα, ενώ οι συγκεντρώσεις του αζώτου και του άνθρακα στην πεπτόνη ήταν 11% και 35% (κ.β.) αντίστοιχα και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του συνολικού C και N του υποστρώματος. Επιπλέον, προστέθηκε ένα μίγμα αλάτων, μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων εκ των οποίων και το θειικό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄, Merck] χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου και ο λόγος C/N των μέσων κυμαίνονταν στο 20. Στο αρχικό υπόστρωμα των YEA υπήρχαν 30 g/l σάκχαρα, 11,5 g/l φαινολικές ουσίες και 70,5 mg/g ελεύθερες αμινομάδες (Diamantis et al. 2022).

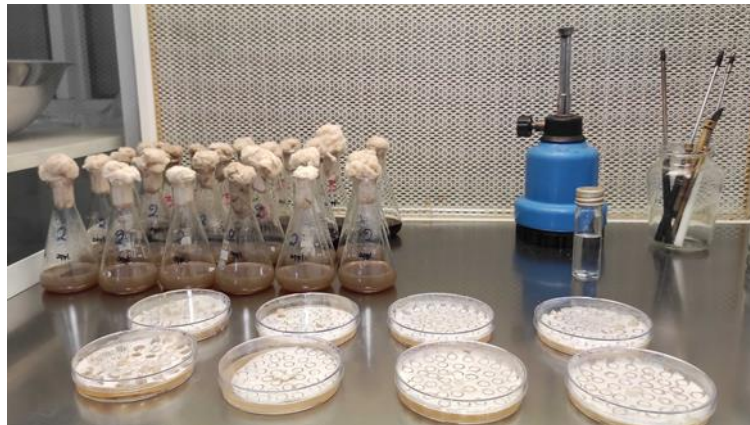
Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οι υγρές ζυμώσεις των 4 φαρμακευτικών μυκήτων του γένους *Ganoderma* (*G. adspersum* AMRL 315, *G. applanatum* AMRL 341, *G. lucidum* AMRL 330, *G. resinaceum* AMRL 325) στα υποστρώματα αμύλου, κυτταρίνης και λιγνίνης που διήρκησε 32 ημέρες ενώ στα υποστρώματα των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων και της ημικυτταρίνης διήρκησε 37 ημέρες, σε στατικές συνθήκες. Τα υποστρώματα των ΥΕΑ και λιγνίνης επιλέχθηκαν λόγω της δυσκολίας διάσπασής τους από άλλους μικροοργανισμούς στη φύση και της τοξικότητάς τους. Αυτά της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και αμύλου λόγω των μεγάλων ποσοτήτων που υπάρχουν στη φύση ή/και παράγονται στη βιομηχανία των τροφίμων, τα οποία απόβλητα, μπορούμε να αξιοποιήσουμε. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε 6-8 ημέρες. Αναλυτικά, η σύνθεση του υποστρώματος ανάπτυξης μαζί με μείγμα αλάτων, μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων για την ανάπτυξη των τεσσάρων μακρομυκήτων, φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των πέντε θρεπτικών μέσων αμύλου, κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, λιγνίνης και υγρών ελαιουργικών αποβλήτων (Α-30, Κ-30, Λ-30, ΥΕΑ-30, Η-30).

| Συστατικά | Συγκέντρωση (g/l) | | | | |
|--|-------------------|------|------|------|--------|
| | Α-30 | Κ-30 | Η-30 | Λ-30 | ΥΕΑ-30 |
| Άμυλο | 30 | - | - | - | - |
| Κυτταρίνη | - | 30 | - | - | - |
| Λιγνίνη | - | - | - | 0,5 | - |
| ΥΕΑ | - | - | - | - | 0,7 |
| Ημικυτταρίνη | - | - | 30 | - | - |
| Γλυκόζη | - | - | - | 30 | 30 |
| Εκχύλισμα ζύμης | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Πεπτόνη | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| NaHPO ₄ ·2 H ₂ O | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| (NH) ₂ SO ₄ | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| CaCl ₂ ·2 H ₂ O | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| FeCl ₃ ·6 H ₂ O | 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 |
| ZnSO ₄ ·7 H ₂ O | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |

2.2.4 Πειράματα υγρής ζύμωσης

Οι κωνικές φιάλες όγκου 100 ml με το αντίστοιχο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (121 °C, 20 λεπτά) (Pirinutti and Lechner, 2008; Philippoussis et al., 2001) και κατόπιν συγκεκριμένος αριθμός κωνικών φιαλών, για κάθε μύκητα, εμβολιάστηκαν με ροδέλα διαμέτρου 0,7 mm από την ανανεωμένη καλλιέργεια μύκητα, υπό ασηπτικές συνθήκες σε περιβάλλον laminar (Εικόνα 9). Για το κάθε θρεπτικό υπόστρωμα αποθηκεύτηκαν σε 2 δοχεία mccartney χωρίς εμβολιασμό με μύκητα (Εικόνα 10).



Εικόνα 9: Εμβολιασμός κωνικών φιαλών, για κάθε μύκητα, υπό ασηπτικές συνθήκες σε περιβάλλον laminar.



Εικόνα 10: Αρχικό θρεπτικό υπόστρωμα σε δοχείο mccartney α) 2 φιαλίδια υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, β) 2 φιαλίδια κυτταρίνης, γ) 2 φιαλίδια ημικυτταρίνης.

Η συγκέντρωση του εμβολίου (ξηρή βιομάζα) ήταν 0,10 g/l. Μετά τον εμβολιασμό, οι κωνικές φιάλες πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι και οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 32-37 ημέρες σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C σε επωαστικό θάλαμο (Velp, model FOC 225E, Italy). Στη διάρκεια του κάθε πειράματος έγιναν δειγματοληψίες σε τέσσερα σημεία για τις καλλιέργειες με τα θρεπτικά υποστρώματα άμυλο, κυτταρίνη, λιγνίνη (8^η, 16^η, 24^η, 32^η ημέρα) και σε πέντε σημεία για τις καλλιέργειες με τα θρεπτικά υποστρώματα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων και ημικυτταρίνης (8^η, 16^η, 24^η, 32^η και 37^η ημέρα), κατά τις οποίες

παραλαμβάνονταν ίδιος αριθμός κωνικών από το κάθε είδος του μύκητα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Επώαση της καλλιέργειας σε θάλαμο θερμοκρασίας 26 ± 1 °C υπό στατικές συνθήκες (Velp, model FOC 225E, Italy)

2.3 Παραλαβή και ανάλυση

2.3.1 Αναλύσεις στο θρεπτικό υλικό - υγρό ζύμωσης

Η φυσικοχημική σύσταση του υγρού ζύμωσης από την καλλιέργεια των πέντε υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη προσδιορίστηκε υπολογίζοντας την συγκέντρωση των αναγόντων και ολικών σακχάρων, της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών ενώσεων, τον προσδιορισμό της ικανότητας αποχρωματισμού, τον προσδιορισμό αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων καθώς επίσης τις τιμές του pH και της αγωγιμότητας.

2.3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων (Μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων του υγρού ζύμωσης της καλλιέργειας λιγνίνης και των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων προσδιορίστηκε σύμφωνα με την φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu (FC) (Slinkard and Singleton, 1977). Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) εφαρμόζεται ευρέως για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή (οξειδωση φαινολικών συστατικών δείγματος) διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin - Ciocalteu reagent) σε φωσφορομολυβδενικό / φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος και σε αλκαλικό περιβάλλον.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε 0,2 ml δείγματος από το υγρό ζύμωσης της καλλιέργειας λιγνίνης ή υγρών ελαιουργικών αποβλήτων προστίθενται 10,8 ml απιονισμένο νερό με 8 ml διαλύματος καυστικού νατρίου (Na_2CO_3 , 75 g/l) και 1 ml του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC). Για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος, ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία, που χρησιμοποιείται για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου, με τη διαφορά ότι προστίθενται 0,2 ml απιονισμένο νερό, αντί δείγματος. Στη συνέχεια, το μείγμα αναδεύεται και αφήνεται για τουλάχιστον δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και συνθήκες σκότους. Μετά το πέρας των δύο ωρών, ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης κάθε δείγματος στα 750 nm, σε φασματοφωτόμετρο τύπου UV- Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος σύμφωνα με την εξίσωση $y=2,2423x+0,0289$, όπου y η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (g/l) και x η τιμή της απορρόφησης.

2.3.3 Προσδιορισμός σακχάρων στο υγρό ζύμωσης με τη μέθοδο DNS

Ο προσδιορισμός των μη καταναλωθέντων αναγόντων σακχάρων από τον μύκητα, δηλαδή της γλυκόζης, στο θρεπτικό μέσο κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας για το υπόστρωμα των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, έλαβε χώρα με τη φωτομετρική μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller, 1995). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5 – δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) σε 3-άμινο-5-σαλικυλικό οξύ παρουσία υπεροξειδίου του νατρίου (NaOH) και την ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ.

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου DNS ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Σε 500 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 200 ml καυστικού νατρίου (NaOH) 2N. Στη

συνέχεια, κάτω από συνθήκες ήπιας θέρμανσης πραγματοποιείται αργή διάλυση 10 g 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Έπειτα, προστίθενται 300 g Τρυγικό καλιονάτριο ($\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και το μίγμα συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1l. Το αντιδραστήριο DNS που παρασκευάστηκε έχει έντονο πορτοκαλί χρώμα και συλλέγεται σε σκούρο γυάλινο περιέκτη και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες σκότους.

Εφαρμογή της μεθόδου: Για την εφαρμογή της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα με 0,5 ml δείγματος υγρών ελαιουργικών αποβλήτων (μετά από την απαραίτητη αραίωση) προστίθενται 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται στη συσκευή Vortex. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται σε υδατόλουτρο (100 ± 1 °C) για 5 λεπτά ακριβώς και ψύχεται αμέσως με νερό ώστε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου (25 ± 1 °C). Έπειτα, προστίθενται 5 ml απιονισμένο νερό σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με κυψελίδα των 2 ml, σε φασματοφωτόμετρο τύπου UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείτε 0,5 ml απιονισμένο νερό, αντί για δείγμα με προσθήκη 0,5 ml αντιδραστήριο DNS. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με την εξίσωση $y=1,7695x-0,0234$, όπου y η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων σε (g/l) γλυκόζης και x η τιμή της απορρόφησης.

2.3.4 Προσδιορισμός σακχάρων στο υγρό ζύμωσης με τη μέθοδο Dubois

Τα ολικά σάκχαρα στα υπόλοιπα τέσσερα υποστρώματα (λιγνίνη, ημικυτταρίνη, κυτταρίνη, άμυλο) προσδιορίστηκαν με την μέθοδο φαινόλης – θειικού οξέος (Dubois, et al., 1956). Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός πως τα απλά ή σύνθετα σάκχαρα, καθώς και τα παράγωγά τους, όταν επεξεργάζονται με φαινόλη και πυκνό θειικό οξύ δημιουργούν ένα πορτοκαλί-χρυσού χρώμα. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι αρκετά ευαίσθητη και το χρώμα σταθερό (Toledo et al., 2012).

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε δοκιμαστικό σωλήνα με 1 ml δείγματος για το κάθε θρεπτικό μέσο ξεχωριστά λιγνίνης, ημικυτταρίνης, κυτταρίνης ή αμύλου μετά από την απαραίτητη αραίωσή του, προστίθενται 1ml διαλύματος φαινόλης 5% w/v και στη συνέχεια προσθέτονται 5ml πυκνού θειικού οξέος (95-97%, p/v) στο κέντρο του σωλήνα (χωρίς να έρθει σε επαφή με τα τοιχώματα). Το δείγμα αναδεύτηκε στη συσκευή Vortex και αφέθηκε σε ηρεμία για 10 λεπτά στους 25 °C και ύστερα ξανά αναδεύτηκε στη συσκευή Vortex και αφέθηκε για άλλα 20 λεπτά στους 25 °C. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης

προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 490nm στο φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000 έναντι τυφλού δείγματος. Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1ml απιονισμένο νερό, αντί για δείγμα θρεπτικού υποστρώματος και προστέθηκε 1ml φαινόλη και 5ml πυκνού θεικού οξέος (Toledo et al., 2012). Η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος μετρήθηκε στο ορατό φάσμα και είναι ανάλογη με την ποσότητα των σακχάρων στο δείγμα. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 10 έως και 100μg ολικών σακχάρων και η ποσοτικοποίηση (αναφορά στην αντίστοιχη συγκέντρωση) γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης γλυκόζης, η οποία κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπο τη γλυκόζη. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με την εξίσωση $y=0,1148x$ όπου y η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων σε (g/l) γλυκόζης και x η τιμή της απορρόφησης.

2.3.5 Προσδιορισμός ικανότητας αποχρωματισμού

Η ικανότητα αποχρωματισμού προσδιορίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτάθηκε από τους Sayadi and Ellouz (Sayadi and Ellouz, 1992). Ο αποχρωματισμός του αποβλήτου αντιστοιχεί σε αποπολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους, που αποτελούν κύριο συστατικό υπεύθυνο για το σκούρο χρώμα, σε συνδυασμό με την ανοργανοποίηση των μονοαρωματικών ενώσεων. Ποσότητα 0,5 ml δείγματος θρεπτικού υποστρώματος υγρών ελαιουργικών αποβλήτων και αντίστοιχα λιγνίνης αναμιγνύεται με ποσότητα 14,5 ml απιονισμένο νερό. Ύστερα από πολύ 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. Το ποσοστό αποχρωματισμού προσδιορίζεται με τον υπολογισμό της εξίσωσης:

$$\%A=[A_0-A_1)/A_0]\times 100$$

Όπου:

A_0 : η απορρόφηση του μηδενικού σημείου της ζύμωσης

A_1 : η απορρόφηση του εκάστοτε σημείου της ζύμωσης

2.3.6 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων με την μέθοδο FAN

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

Παρασκευή αντιδραστηρίων: Το αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent) αποτελείται από: 49,71g διάλυμα αλάτων φωσφορικού οξέος $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5g νινυδρίνη, 3g φρουκτόζη και 60g KH_2PO_4 , διαλυμένα σε 1 l απιονισμένου νερού. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του αντιδραστηρίου το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 6,6 και 6,8, διορθώνοντάς το ώστε να κυμαίνεται εντός των ορίων. Η διόρθωση γίνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 στο διάλυμα. Το αντιδραστήριο χρώσης αποθηκεύεται σε σκούρο μπουκάλι Duran σε θερμοκρασία $4 \pm 0,5$ °C και κρίνεται σκόπιμος έλεγχος και διόρθωση της τιμής pH ανά τακτά χρονικά διαστήματα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 .

Το αντιδραστήριο αραιώσης (Dilution reagent) αποτελείται από 2 g Ιωδιούχο Κάλιο (KIO_3) διαλυμένα σε 500 ml απιονισμένο νερό και στη συνέχεια προστίθενται 384 ml καθαρής αιθανόλης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο 1000 ml και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι να αποκτήσει τελικό όγκο 1 l. Στη συνέχεια αναδεύεται και φυλάσσεται σε ψυγείο.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 ml δείγματος από το κάθε θρεπτικό υπόστρωμα (άμυλο, λιγνίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, YEA), 0,5 ml αντιδραστηρίου χρώσης (Color Reagent) και εφαρμόζεται ανάδευση στη συσκευή Vortex. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος (μάρτυρα) ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία, αντί για δείγμα χρησιμοποιείται 1 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο (100 ± 1 °C) για 16 λεπτά ακριβώς και αμέσως μετά ψύχονται σε λεκάνη με πάγο και νερό (20 ± 1 °C) για 20 λεπτά. Ακολούθως, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2,5 ml αντιδραστηρίου αραιώσης και εφαρμόζεται ανάδευση στη συσκευή Vortex. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 570 nm με φασματοφωτόμετρο τύπου UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan), αφού πρώτα μηδενιστεί με το τυφλό διάλυμα. Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση $y = 4,0073x + 0,1459$, όπου y η συγκέντρωση της γλυκίνης σε g/l και x η τιμή της απορρόφησης.

2.4 Αναλύσεις στο μυκήλιο

Η φυσικοχημική σύσταση του μυκηλίου των τεσσάρων μανιταριών *Ganoderma* από την καλλιέργεια των πέντε υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη προσδιορίστηκε συλλέγοντας την βιομάζα και προσδιορίζοντας το ξηρό βάρος, την ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS), την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

2.4.1 Συλλογή και προσδιορισμός βιομάζας – Λυοφιλίωση

Η συλλογή της μυκηλιακής μάζας πραγματοποιήθηκε με διήθηση υπό κενό, σε χοάνη Buhner, χρησιμοποιώντας φίλτρα (Whatman No. 2 Kent, England), με σκοπό το διαχωρισμό της από το εκχύλισμα της καλλιέργειας. Το διήθημα αποθηκεύτηκε σε συνθήκες κατάψυξης (-20 ± 1 °C), ενώ το νωπό μυκήλιο μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια τύπου MacCartey και καταγράφηκε το νωπό βάρος των μυκηλίων σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB, Darmstadt, Germany). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε στο λυοφιλοποιητή (HetoLyoLab 3000, Heto-Holten Als, Denmark) και η διαδικασία της λυοφιλίωσης ολοκληρώθηκε σε 48 ώρες, και ακολούθησε η καταγραφή του ξηρού πλέον βάρους των μυκηλίων (βιομάζα) στον ίδιο ζυγό ακριβείας. Για την μέτρηση της βιομάζας χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για τον κάθε βασιδιομύκητα για κάθε προβλεπόμενη ημέρα δειγματοληψίας. Η ξηρή βιομάζα εκφράστηκε σε g/l. Με τη λυοφιλίωση ξηραίνεται η μυκηλιακή μάζα, χωρίς να υποβαθμίζεται η βιολογική αξία του μύκητα από την επίδραση της θερμότητας. Μετά την λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση, όπου η ξηρή βιομάζα υπέστη άλεση, προκειμένου να ληφθούν μικρόκοκκοι ξηρού μυκηλίου, υπό μορφή σκόνης. Η κονιορτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε σφυρόμυλο (IKA/Labortechnik type DCFH48, Staufen), με τη διαδικασία να πραγματοποιείται 2 φορές ανά δείγμα. Έπειτα, η σκόνη συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για συγκεκριμένες μετρήσεις.

2.4.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών στο μυκήλιο

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών ακολουθήθηκε σπεκτομετρική μέθοδος με την βοήθεια του αντιδραστηρίου Bradford της εταιρίας Sigma (Bradford MM, 1976). Παρασκευάστηκε το πρότυπο διάλυμα, BSA (Bovine serum albumin – αλβουμίνη ορού βοός), με αραιώση με το ίδιο buffer (Tris EDTA) και μετά με διαδοχικές αραιώσεις 1:10, ώστε να παρασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων.

Λήφθηκαν 50 mg λυοφυλιωμένο και λειοτριβημένο δείγμα (επιλέχθηκαν τα μυκήλια με το μεγαλύτερο βάρος για κάθε υπόστρωμα και είδος) στο οποίο προστέθηκαν 750 μl EDTA 50mM. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά (ενδιάμεσα αναδεύτηκαν 3 φορές στην συσκευή Vortex). Ακολούθησε η φυγοκέντριση των δειγμάτων (5 min / 10.000 rpm) (x2 επαναλήψεις).

Στη συνέχεια, λήφθηκαν 10 μl από τα λυοφυλιωμένα δείγματα και προστέθηκαν 240 μl από την χρωστική Bradford (τρεις επαναλήψεις για το κάθε δείγμα) και προσδιορίστηκε η απορρόφησή σε μήκος κύματος 620 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου UV- Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 240μl Bradford reagent + 10 μl EDTA 50mM.

2.4.3 Προσδιορισμός ποσότητας παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο μυκήλιο χρησιμοποιήθηκε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Liang κ.ά. (2010) και Diamantopoulou κ.ά. (2014). Συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρής μυκηλιακής μάζας βάρους 100 mg, τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες. Στην κάθε φιάλη προστέθηκαν 20 ml διαλύματος HCL 2,5 N και τοποθετήθηκαν για βρασμό (30 λεπτά). Στην συνέχεια, αφέθηκαν οι φιάλες να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα NaOH 2,5N (~20ml) μετρώντας παράλληλα με το πεχάμετρο το εύρος της τιμής του να κυμαίνεται μεταξύ 6,5-7,5. Έπειτα, διηθήθηκαν όλα τα δείγματα και από το διήθημα τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο (των 50 ml) και αραιώθηκαν έως 50 ml. Από τα αραιωμένα διηθήματα λήφθηκαν 0,5 ml από το καθένα και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με την προσθήκη 0,5 ml δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και αναδεύτηκαν (για το Τυφλό τοποθετήθηκαν σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες 0,5 ml DNS με 0,5 ml νερό). Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για άλλα 5 λεπτά για βρασμό και στη συνέχεια ψύχθηκαν έως ότου φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τελικό στάδιο της συγκεκριμένης μεθόδου προστέθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml απιονισμένο νερό και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Τα ολικά σάκχαρα (ολική συγκέντρωση IPS) προσδιορίστηκαν ποσοτικά με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και οι IPS εκφράστηκαν ως ισοδύναμα της γλυκόζης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν η $y=1,7695*x-0,0234$ g/l όπου y η συγκέντρωση των IPS σε (g/l) γλυκόζης και x η τιμή της απορρόφησης.

2.5 Ενζυμικές αναλύσεις

Σε αυτή τη μελέτη διερευνήθηκε η παραγωγή ορισμένων ενζύμων, προσδιορίζοντας την ενεργότητα ενζύμων υδρόλυσης (αμυλάση, κυτταρινάση, ξυλανάση, ενδογλυκανάση) και των λιγνινολυτικών ενζύμων. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραγωγής λιγνινολυτικών ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι ανάλυσης που αφορούσαν την α) δραστηριότητα ενζύμου λακκάσης, β) δραστηριότητα ενζύμου υπεροξειδάσης λιγνίνης, γ) δραστηριότητα ενζύμου υπεροξειδάσης μαγγανίου. Τα προαναφερθέντα ένζυμα ποσοτικοποιούνται έμμεσα με αποδόμηση κατάλληλων υποστρωμάτων και μεταβολής των φασματικών απορροφήσεων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις. Για όλους τους προσδιορισμούς ενζύμων, μια μονάδα δραστηριότητας U, ορίστηκε ως η ποσότητα ενζύμου που μετασχηματίζει 1 μmol υποστρώματος ανά λεπτό.

2.5.1 Προσδιορισμός Λακκάσης

Η δραστηριότητα της λακκάσης σε θρεπτικά υποστρώματα YEA και λιγνίνης, παρακολούθηθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan), αφού πρώτα μηδενιστεί με το τυφλό διάλυμα. Η μέτρηση διήρκησε 20 λεπτά στους $30 \pm 0,5$ °C χρησιμοποιώντας συρινγκαλδαζίνη (4-υδροξυ-3,5-διμεθοξυβενζαλδεϋδαζίνη, Sigma, Steinheim, Γερμανία) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M (pH 6,8) στα 525 nm (Ride, 1980). Μία μονάδα λακκάσης ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να προκληθεί μια αλλαγή στην απορρόφηση 0,001 ανά λεπτό υπό τις συνθήκες δοκιμασίας που χρησιμοποιήθηκαν.

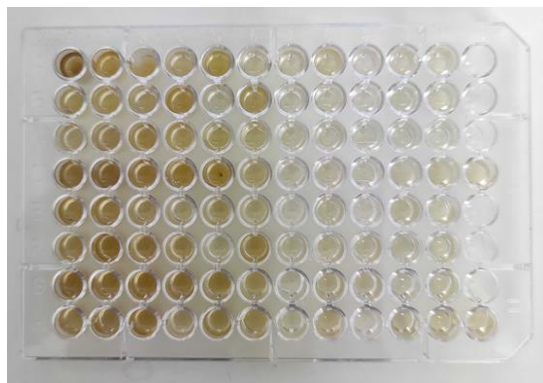
Πιο συγκεκριμένα, σε κυψελίδα, 0,4 ml διηθημένου δείγματος θρεπτικού υποστρώματος YEA (ή 0,3 ml δείγματος θρεπτικού υποστρώματος λιγνίνης) από κάθε είδος αναμείχθηκαν με 1,5 ml φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M (pH 6,8) για το θρεπτικό υπόστρωμα των YEA (ή 1,6 ml φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα για την λιγνίνη), αφέθηκαν για 10 λεπτά να αντιδράσουν και προστέθηκε 0,1 ml συρινγκαλδαζίνη και αμέσως τοποθετήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο για καταγραφή της μέτρησης στα 525 nm για 20 λεπτά.

Για το Τυφλό δείγμα προστέθηκαν σε 0,4 ml δείγματος θρεπτικού υποστρώματος YEA από κάθε είδος (ή 0,3 ml δείγματος θρεπτικού υποστρώματος λιγνίνης) με 1,5 ml φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M (pH 6,8) (ή 1,6 ml φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα για την λιγνίνη) και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες βρασμού για 15 λεπτά, έπειτα αφέθηκαν να ψυχθούν για 10 λεπτά και προστέθηκε 0,1 ml συρινγκαλδαζίνη και αμέσως τοποθετήθηκαν

στο φασματοφωτόμετρο για 20 λεπτά καταγραφή της μέτρησης στα 525 nm. Η δραστηριότητα του ενζύμου λακκάσης έχει εκφραστεί σε διεθνείς μονάδες ανά λίτρο ενζυμικού εκχυλίσματος (U/l).

2.5.2 Μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη και μη του Μαγγανίου

Ο προσδιορισμός της απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη του Μαγγανίου (εξαρτημένο ένζυμο του Μαγγανίου) για τα θρεπτικά υποστρώματα λιγνίνης και YEA πραγματοποιήθηκε σε μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP) (Εικόνα 12). Για τον προσδιορισμό του παραχθέντος ενζύμου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που αποτελείτο από 1000μl ηλεκτρικό – γαλακτικό (pH 4,5) συγκεντρώσεως 0,1 M, 200μl DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 100μl MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochloride) συγκεντρώσεως 1mM, με 660μl δείγματος θρεπτικού υποστρώματος λιγνίνης ή YEA, 10μl διαλύματος MnSO₄ συγκέντρωσης 20 mM και τελική προσθήκη 10μl διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκέντρωσης 10 mM (Ngo and Lenhoff, 1980). Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιήθηκε στα 590 nm σε μικροπλάκα με τη χρήση της συσκευής (ASYS Hitech, Expert96) σε χρονικά διαστήματα 0-10-20 min. Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το αρχικό δείγμα του κάθε θρεπτικού υποστρώματος που είχε κρατηθεί σε mccartney δοχείο, προσθέτοντας τα διαλύματα με τις ποσότητες που αναφέρθηκαν χωρίς την προσθήκη υλικού καλλιέργειας. Για τον προσδιορισμό υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης του Μαγγανίου η διαδικασία που εφαρμόστηκε ήταν η ίδια ωστόσο, χωρίς την προσθήκη διαλύματος MnSO₄.



Εικόνα 12: Μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP)

2.5.3 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP)

Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου της υπεροξειδάση της λιγνίνης για τα θρεπτικά υποστρώματα λιγνίνης και YEA πραγματοποιήθηκε σε μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP). Σύμφωνα με Tien & Kirk (1988), αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 20 mM βερατρυλικής αλκοόλης, 10mM, H₂O₂ και 0,1 M τρυγικού νατρίου. Για το τρυγικό νάτριο έγινε ρύθμιση του pH=3 με διάλυμα γαλακτικού νατρίου. Στη μικροπλάκα τοποθετήθηκαν 800 μL διαλύματος τρυγικού νατρίου 0,1 M pH=3, 400 μL δείγματος (θρεπτικού υποστρώματος λιγνίνης ή YEA) και 35 mM διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης 20 mM. Η εκκίνηση της αντίδρασης σημειώθηκε με την προσθήκη 15 μL διαλύματος H₂O₂ 54 mM. Ο υπολογισμός της πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan), αφού πρώτα μηδενίστηκε με το τυφλό διάλυμα στα 310 nm. Για το τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το αρχικό δείγμα του κάθε θρεπτικού υποστρώματος που είχε κρατηθεί σε mccartney δοχείο προσθέτοντας τα ιχνοστοιχεία με τις ποσότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

2.5.4 Προσδιορισμός ενδογλυκανάσης

Η γλυκανάση αποτελεί βασικό ένζυμο υπεύθυνο για την πέψη των υδατανθράκων. Ο προσδιορισμός της ενδογλυκανάσης καταγράφηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρο διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan), αφού πρώτα μηδενίστηκε με το τυφλό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, 0,5 ml δείγματος ημικυτταρίνης (αντίστοιχα δείγματος αμύλου και κυτταρίνης) από κάθε είδος, αναμείχθηκαν με 0,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών sodium citrate phosphate buffer 0,05 M. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε και στη συνέχεια αφέθηκε για επώαση για 30 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο να αντιδράσει στους 50°C. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και αμέσως τοποθετήθηκε σε συνθήκες βρασμού για 5 λεπτά, έπειτα αφέθηκαν να ψυχθούν σε παγόλουτρο και προστέθηκαν 5 ml απιονισμένο νερό. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 540 nm.

Για το Τυφλό δείγμα προστέθηκαν σε 0,5 ml δείγματος θρεπτικού μέσου ημικυτταρίνης από κάθε είδος (αντίστοιχα 0,5 ml δείγματος αμύλου ή κυτταρίνης) με 0,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 0,05 M. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 ml δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και αμέσως τοποθετήθηκαν σε συνθήκες βρασμού για 5

λεπτά, έπειτα αφέθηκαν να ψυχθούν και προστέθηκαν 5 ml απιονισμένο νερό στο φασματοφωτόμετρο για καταγραφή της μέτρησης στα 540 nm. Μία μονάδα (U) ενεργότητας ενζύμου ενδογλυκανάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να παραχθεί 1 mg/ml γλυκόζης σε 1 λεπτό σε pH 4,8 σε θερμοκρασία 50 °C και υπόστρωμα CMC 1% (w/v). Για τον υπολογισμό της ποσότητας της ενδογλυκανάσης χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με γλυκόζη.

2.5.5 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας των ολικών κυτταρινασών

Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας των ολικών κυτταρινασών πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού αναγόντων σακχάρων σε υπόστρωμα κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα, σε μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP) τοποθετήθηκαν 10 μl μίγματος κυτταρινάσης (50 ml απιονισμένο νερό + 3 gr κυτταρίνη) για το κάθε είδος του μακρομύκητα *Ganoderma* (4 μανιτάρια) και για την κάθε δειγματοληψία που λήφθηκαν (4 σημεία δειγματοληψίας για κάθε μανιτάρι). Με τη βοήθεια πιπέτας 50 μl προστέθηκαν 10 μl δείγματος θρεπτικού υποστρώματος κυτταρινάσης και αφέθηκαν για 30 λεπτά να αντιδράσουν. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ταυτόχρονα 20 μl δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) σε όλες τις θέσεις και τοποθετήθηκαν στο microwave για θέρμανση για 60 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl απιονισμένο νερό σε κάθε θέση και αναδεύτηκε σε συγκεκριμένο πρόγραμμα στο φασματοφωτόμετρο.

Η μέτρηση της απορρόφησης σε όλες τις θέσεις της μικροπλάκας πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο στα 590 nm στον αναγνώστη μικροπλάκας (ASYS Hitech, Expert96) με προηγούμενη επιλογή του κατάλληλου προγράμματος ανάγνωσης αφού πρώτα μηδενίστηκε με το τυφλό με τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα μίγματος κυτταρινάσης, 10 μl απιονισμένο νερό και είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία με την παραπάνω διαδικασία. Μία μονάδα (U) ενεργότητας ενζύμου ολικών κυτταρινασών ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να παραχθεί 1 mg/ml γλυκόζης σε 1 λεπτό σε pH 4,8 σε θερμοκρασία 50 °C και υπόστρωμα CMC 1% (w/v). Για τον υπολογισμό των ολικών κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με γλυκόζη.

2.5.6 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της ημικυτταρινάσης

Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ημικυτταρινάσης πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού αναγόντων σακχάρων σε υπόστρωμα ημικυτταρίνης. Πιο

συγκεκριμένα, σε μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP) τοποθετήθηκαν 10 μl μίγματος ημικυτταρινάσης (50 ml απιονισμένο νερό + 3 gr ημικυτταρίνης) για το κάθε είδος του μακρομύκητα *Ganoderma* (4 μανιτάρια) και για την κάθε δειγματοληψία που λήφθηκαν (4 σημεία δειγματοληψίας για κάθε μανιτάρι). Με τη βοήθεια πιπέτας 50 μl προστέθηκαν 10 μl δείγματος θρεπτικού υποστρώματος ημικυτταρίνης και αφέθηκαν για 30 λεπτά να αντιδράσουν. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ταυτόχρονα 20 μl δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) σε όλες τις θέσεις και τοποθετήθηκαν στο microwave για θέρμανση για 60 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl απιονισμένο νερό σε κάθε θέση και αναδεύτηκε σε συγκεκριμένο πρόγραμμα στο φασματοφωτόμετρο.

Η μέτρηση της απορρόφησης σε όλες τις θέσεις της μικροπλάκας πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο στα 590 nm στον αναγνώστη μικροπλάκας (ASYS Hitech, Expert96) με προηγούμενη επιλογή του κατάλληλου προγράμματος ανάγνωσης αφού πρώτα μηδενίστηκε με το τυφλό με τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα μίγματος ημικυτταρινάσης, 10 μl απιονισμένο νερό και είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία με την παραπάνω διαδικασία.

Μία μονάδα (U) ενεργότητας ενζύμου ημικυτταρινάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να παραχθεί 1 mg/ml γλυκόζης σε 1 λεπτό σε pH 4,8 σε θερμοκρασία 50 °C και υπόστρωμα ημικυτταρίνης 1% (w/v). Για τον υπολογισμό της ποσότητας της ημικυτταρινάσης χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με γλυκόζη.

2.5.7 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της αμυλάσης

Η αμυλάση αποτελεί βασικό ένζυμο υπεύθυνο για την πέψη των υδατανθράκων συνεισφέροντας στην υδρόλυση πολυσακχαριτών σε ολιγοσακχαρίτες. Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αμυλάσης πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού αναγώντων σακχάρων σε υπόστρωμα αμύλου. Πιο συγκεκριμένα, σε μικροπλάκα Microplate 96 θέσεων (Eppendorf® Microplate 96/F-PP) τοποθετήθηκαν 10 μl μίγματος αμυλάσης (50ml απιονισμένο νερό + 1,5 gr άμυλο) για το κάθε είδος του μακρομύκητα *Ganoderma* (4 μανιτάρια) και για την κάθε δειγματοληψία που λήφθηκαν (4 σημεία δειγματοληψίας για κάθε μανιτάρι). Με τη βοήθεια πιπέτας 50 μl προστέθηκαν 10 μl δείγματος θρεπτικού υποστρώματος αμυλάσης και αφέθηκαν για 30 λεπτά να αντιδράσουν. Στη συνέχεια προστέθηκαν ταυτόχρονα 20 μl δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) σε όλες τις θέσεις και τοποθετήθηκαν στο microwave για θέρμανση για 60 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl απιονισμένο νερό σε κάθε θέση.

Η μέτρηση της απορρόφησης σε όλες τις θέσεις της μικροπλάκας πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο στα 590 nm στον αναγνώστη μικροπλάκας (ASYS Hitech, Expert96) με προηγούμενη επιλογή του κατάλληλου προγράμματος ανάγνωσης αφού πρώτα μηδενίστηκε με το τυφλό με τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε αντί για ποσότητα μίγματος αμυλάσης, 10 μl απιονισμένο νερό και είχε υποστεί την ίδια επεξεργασία με την παραπάνω διαδικασία.

Μία μονάδα (U) ενεργότητας ενζύμου αμυλάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να παραχθεί 1 mg/ml γλυκόζης σε 1 λεπτό σε pH 4,8 σε θερμοκρασία 50 °C και υπόστρωμα αμύλου 1% (w/v). Για τον υπολογισμό της ποσότητας της αμυλάσης χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με γλυκόζη.

2.6 Προσδιορισμός ενεργής οξύτητας (pH)

Στο τέλος της κάθε καλλιέργειας ακολουθούν όλες οι αναλύσεις στο υπερκείμενο υγρό που προκύπτει. Το τελικό pH του υγρού μέσου καλλιέργειας μετρήθηκε μετά την παραλαβή του μυκηλίου, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια οργάνου μέτρησης τύπου Jenway pHmeter 3310 (Germany) αμέσως μετά την παραλαβή της μυκηλιακής βιομάζας.

3 Αποτελέσματα

3.1 Γενική παρουσίαση

Η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη είχε ως στόχο την μελέτη και ανάπτυξη των τεσσάρων φαρμακευτικών μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma* (*G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum* και *G. resinaceum*) σε υγρές καλλιέργειες, με τη χρήση πέντε διαφορετικών υποστρωμάτων σε στατικές συνθήκες για παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και ενζύμων. Οι τέσσερις μύκητες αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων (ΥΕΑ), αμύλου, κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης με σκοπό την επιλογή του υποστρώματος που ευνοεί περισσότερο την αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Οι ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου των 100 ml πληρωμένες με 30 ± 1 ml θρεπτικό υλικό σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C με διάρκεια 32 ημέρες για τα θρεπτικά υποστρώματα άμυλο, κυτταρίνη, λιγνίνη και 37 ημέρες για τα θρεπτικά υποστρώματα ΥΕΑ και ημικυτταρίνης.

Οι παραπάνω μακρομύκητες αξιολογήθηκαν με βάση το δυναμικό παραγωγής βιομάζας, την συγκέντρωση αναγόντων και ολικών σακχάρων, την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, τον προσδιορισμό αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, την παραγωγή IPS, την παραγωγή ολικών πρωτεϊνών, τον προσδιορισμό της ικανότητας αποχρωματισμού του μελετώμενου είδους και αποφαινόλωσης του ΥΕΑ και της λιγνίνης καθώς και την παραγωγή ορισμένων ενζύμων (λακκάση, αμυλάση, κυτταρινάση, ημικυτταρινάση, ενδογλυκανάση, την μέτρηση απορρόφησης του ενζύμου υπεροξειδάση εξαρτημένη και ανεξάρτητη του Μαγγανίου και την υπεροξειδάση εξαρτημένη της Λιγνίνης) στα πέντε διαφορετικά υποστρώματα (ΥΕΑ- 30) , (Λ-30) , (Α-30) , (Κ-30) , (Η-30).

Συντομογραφία – μονάδες

- X – βιομάζα (g/l)
- X_{max} – μέγιστη τιμή βιομάζας (g/l)
- TScons – καταναλωθείσα ποσότητα σακχάρων / υποστρώματος (g/l)
- IPS – ενδοπολυσακχαρίτες (g/l και % επί ξ.β.)
- $Y_{X/S}$ – συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθέντα/έν σάκχαρα/υπόστρωμα (g παραγόμενης βιομάζας προς g καταναλωθέντων σακχάρων/ καταναλωθέν υπόστρωμα)

Τα συνολικά αποτελέσματα για τις μέγιστες μέσες τιμές: παραγωγής βιομάζας (X , g/l), κατανάλωσης υποστρώματος (TS_{cons} , ποσοστό επί τοις %), συντελεστή απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$, σε g/g) και παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/l και % κ.β.) για κάθε ένα μελετώμενο είδος *Ganoderma* και το αντίστοιχο υπόστρωμά του φαίνονται στους παρακάτω πίνακες. Τέλος, τα διαγράμματα που προκύπτουν από τα παραπάνω δεδομένα παρατίθενται στις επόμενες ενότητες.

3.2 Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών βιομάζας και μεταβολιτών

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5, για το είδος *G. adspersum* η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε και για τα πέντε θρεπτικά μέσα την τελευταία ημέρα της ζύμωσης (YEA-30: $X_{max} = 26,92$ g/l, Λ-30: $X_{max} = 23,52$ g/l, Α-30: $X_{max} = 25,19$ g/l, Κ-30: $X_{max} = 22,51$ g/l, Η-30: $X_{max} = 24,09$). Στα θρεπτικά μέσα YEA-30, Λ-30 η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{X/S}$ (0,84 g/g και 0,94 g/g αντίστοιχα) σημειώθηκε την 16^η ημέρα και για τα θρεπτικά υποστρώματα Α-30, Κ-30 και Η-30 είναι (0,99 g/g, 0,95 g/g και 0,96 g/g, αντίστοιχα) την 32^η ημέρα.

Σχετικά με τις μέγιστες τιμές των IPS εκφρασμένες σε g/l και % κ.β. παρατηρήθηκαν την 16^η ημέρα ζύμωσης για τα θρεπτικά μέσα YEA-30 (5,30 g/l; 48,33% κ.β.), Λ-30 (7,09 g/l; 58,10% κ.β.), Η-30 (4,31 g/l; 55,81% κ.β.) και Α-30 (9,31 g/l; 58,33% κ.β.) και την 24^η ημέρα ζύμωσης για τα θρεπτικά μέσα και Κ-30 (8,62 g/l; 47,53% κ.β.)

Πίνακας 5: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, IPS, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του *G. adspersum* στα πέντε υποστρώματα (YEA-30 Λ-30, Α-30, Κ-30, Η-30).

| <i>G. adspersum</i> AMRL: 315 | | | | | | | |
|-------------------------------|----------|-------|---------|------------|------------------------|-----------|--------------|
| Θρεπτικό μέσο | | Ημέρα | X (g/l) | TScons (%) | Y _{X/S} (g/g) | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| YEA-30 | α,β,γ, δ | 37 | 26,92 | 97,66 | 0,84 | 9,33 | 34,67 |
| | ε | 16 | 10,97 | 51,06 | 0,65 | 5,30 | 48,33 |
| Λ-30 | α,β,δ | 32 | 23,52 | 97,68 | 0,82 | 11,48 | 48,82 |
| | γ, ε | 16 | 12,2 | 44,03 | 0,94 | 7,09 | 58,10 |
| Α-30 | α,β,γ,δ | 32 | 25,19 | 89,52 | 0,99 | 9,72 | 38,58 |
| | ε | 16 | 15,97 | 62,17 | 0,91 | 9,31 | 58,33 |
| Κ-30 | α,β,γ,δ | 32 | 22,51 | 82,12 | 0,95 | 9,31 | 41,38 |
| | ε | 24 | 19,41 | 76,5 | 0,88 | 8,62 | 47,53 |
| Η-30 | α,β,δ | 37 | 24,09 | 89,74 | 0,91 | 11,93 | 49,50 |
| | γ | 32 | 18,60 | 65,86 | 0,96 | 9,71 | 52,20 |
| | ε | 16 | 7,73 | 54,83 | 0,71 | 4,31 | 55,81 |

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

β: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό κατανάλωσης υποστρώματος/σακχάρων (TS_{cons}, %)

γ: Τιμές που αντιστοιχούν στον μέγιστο συντελεστή απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς καταναλωθέντα/έν σάκχαρα/υπόστρωμα (Y_{X/S}, g/g)

δ: Τιμές που αντιστοιχούν στην μέγιστη ποσότητα παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/l)

ε: Τιμές που αντιστοιχούν στο μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής βιομάζας (IPS, % κ.β.)

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, για το είδος *G. resinaceum* η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε και για τα πέντε θρεπτικά μέσα την τελευταία ημέρα της ζύμωσης (YEA-30: X_{max} = 26,49 g/l, Λ-30: X_{max} = 22,68 g/l, Α-30: X_{max} = 18,36 g/l, Κ-30: X_{max} = 20,72 g/l, Η-30: X_{max} = 15,90).

Στο θρεπτικό μέσο YEA-30 η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,84 g/g) σημειώθηκε την 37^η ημέρα ζύμωσης, για το θρεπτικό μέσο Λ-30 (0,88 g/g) σημειώθηκε την 16^η ημέρα, και για το θρεπτικό μέσο Κ-30 (0,87 g/g) σημειώθηκε την 32^η ημέρα. Για τα θρεπτικά υποστρώματα Α-30 (0,80 g/g) και Η-30 (0,92 g/g) την 24^η ημέρα.

Σχετικά με τις μέγιστες τιμές των IPS εκφρασμένες σε g/l και % κ.β. παρατηρήθηκαν την 16^η ημέρα ζύμωσης στα θρεπτικά υποστρώματα YEA-30 (6,08 g/l; 39,99 % κ.β.), Λ-30 (5,61 g/l; 61,60 % κ.β.), Α-30 (9,13 g/l; 62,47 % κ.β.) και Η-30 (4,33 g/l; 65,44 % κ.β.) και την 24^η ημέρα ζύμωσης το θρεπτικό μέσο Κ-30 (8,62 g/l; 47,53 % κ.β.).

Πίνακας 6: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του *G. resinaceum*, στα πέντε υποστρώματα (YEA-30, Λ-30, Α-30, Κ-30, Η-30).

| <i>G. resinaceum</i> , AMRL: 325 | | | | | | | |
|----------------------------------|------------|-------|---------|------------|------------------------|-----------|--------------|
| Θρεπτικό μέσο | | Ημέρα | X (g/l) | TScons (%) | Y _{X/S} (g/g) | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| YEA-30 | α, β, γ, δ | 37 | 26,49 | 95,60 | 0,84 | 10,05 | 37,92 |
| | ε | 16 | 12,95 | 60,73 | 0,76 | 6,08 | 39,99 |
| Λ-30 | α, β, δ | 32 | 22,68 | 98,74 | 0,78 | 10,74 | 47,36 |
| | γ, ε | 16 | 9,1 | 35,3 | 0,88 | 5,61 | 61,60 |
| Α-30 | α, β | 32 | 18,36 | 93,72 | 0,69 | 7,10 | 38,69 |
| | δ, ε | 16 | 14,61 | 67,29 | 0,77 | 9,13 | 62,47 |
| | γ | 24 | 16,62 | 73,09 | 0,8 | 8,82 | 53,07 |
| Κ-30 | α, β, γ, δ | 32 | 20,72 | 83,16 | 0,87 | 9,19 | 44,34 |
| | ε | 24 | 18,13 | 77,8 | 0,81 | 8,62 | 47,53 |
| Η-30 | α, β | 37 | 15,90 | 82,57 | 0,66 | 7,63 | 48,01 |
| | γ, δ | 24 | 14,8 | 54,87 | 0,92 | 9,38 | 63,36 |
| | ε | 16 | 6,61 | 38,36 | 0,59 | 4,33 | 65,44 |

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7, για το είδος *G. applanatum* η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε την τελευταία ημέρα ζύμωσης για όλα τα θρεπτικά μέσα (YEA-30: X_{max}= 24,56 g/l, Λ-30: X_{max}= 24,01 g/l, Α-30: X_{max}= 26,58 g/l, Κ-30: X_{max}= 20,00 g/l και Η-30: X_{max}= 24,41 g/l).

Στα θρεπτικά μέσα YEA-30 και Κ-30 η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,80 g/g και 0,87 g/g, αντίστοιχα) σημειώθηκε την 24^η ημέρα και για τα θρεπτικά υποστρώματα Α-30 και Η-30 (1,01 g/g και 0,96 g/g αντίστοιχα) σημειώθηκε την 16^η ημέρα ενώ για το θρεπτικό μέσο Λ-30 η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,92 g/g) σημειώθηκε την 32^η ημέρα.

Σχετικά με τις μέγιστες τιμές των IPS εκφρασμένες σε g/l και % κ.β. παρατηρήθηκε την 16^η ημέρα ζύμωσης για τα θρεπτικά μέσα Λ-30 (3,14 g/l; 61,99 % κ.β.), Α-30 (6,95 g/l; 43,03 % κ.β.), Κ-30 (3,75 g/l; 44,11 % κ.β.) και Η-30 (6,39 g/l; 63,88 % κ.β.) ενώ την 24^η ημέρα ζύμωσης το θρεπτικό μέσο YEA-30 (8,59 g/l; 40,75 % κ.β.).

Πίνακας 7: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του *G. applanatum*, στα πέντε υποστρώματα (YEA-30, Λ-30, Α-30, Κ-30, Η-30).

| <i>G. applanatum</i> AMRL: 341 | | | | | | | |
|--------------------------------|---------|-------|---------|------------|------------------------|-----------|--------------|
| Θρεπτικό μέσο | | Ημέρα | X (g/l) | TScons (%) | Y _{X/S} (g/g) | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| YEA- 30 | α, β | 37 | 24,56 | 98,15 | 0,76 | 3,94 | 16,05 |
| | γ, δ, ε | 24 | 21,07 | 79,44 | 0,80 | 8,59 | 40,75 |
| Λ-30 | α,β,γ,δ | 32 | 24,01 | 89,19 | 0,92 | 12,35 | 51,44 |
| | ε | 16 | 5,06 | 46,48 | 0,37 | 3,14 | 61,99 |
| Α-30 | α, β | 32 | 26,58 | 95,94 | 0,98 | 7,49 | 28,18 |
| | γ, ε | 16 | 16,14 | 56,32 | 1,01 | 6,95 | 43,03 |
| | δ | 24 | 20,86 | 74,63 | 0,99 | 8,51 | 40,78 |
| Κ-30 | α, β,δ | 32 | 20,00 | 84,67 | 0,82 | 7,44 | 37,21 |
| | γ | 24 | 19,11 | 76,29 | 0,87 | 7,73 | 40,46 |
| | ε | 16 | 8,5 | 37,41 | 0,79 | 3,75 | 44,11 |
| Η-30 | α,β,δ | 37 | 24,41 | 90,21 | 0,92 | 12,53 | 51,32 |
| | γ, ε | 16 | 10,01 | 35,52 | 0,96 | 6,39 | 63,88 |

Σύμφωνα με τον Πίνακα 8, για το είδος *G. lucidum*, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε την τελευταία ημέρα της ζύμωσης, για όλα τα θρεπτικά μέσα (YEA-30: X_{max}= 23,53 g/l, Λ-30: X_{max}= 16,70 g/l, Α-30: X_{max}= 13,20 g/l, Κ-30: X_{max}= 17,98 g/l) και Η-30: X_{max}= 23,12 g/l.

Στα θρεπτικά μέσα Λ-30 και Η-30 η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,80 g/g και 0,99 g/g αντίστοιχα) σημειώθηκε την 16^η ημέρα, για τα θρεπτικά μέσα Α-30 και Κ-30 η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{X/S} (0,69 g/g και 0,89 g/g αντίστοιχα) σημειώθηκε την 32^η ημέρα και για το θρεπτικό υπόστρωμα YEA-30 (0,74 g/g,) σημειώθηκε την 37^η ημέρα.

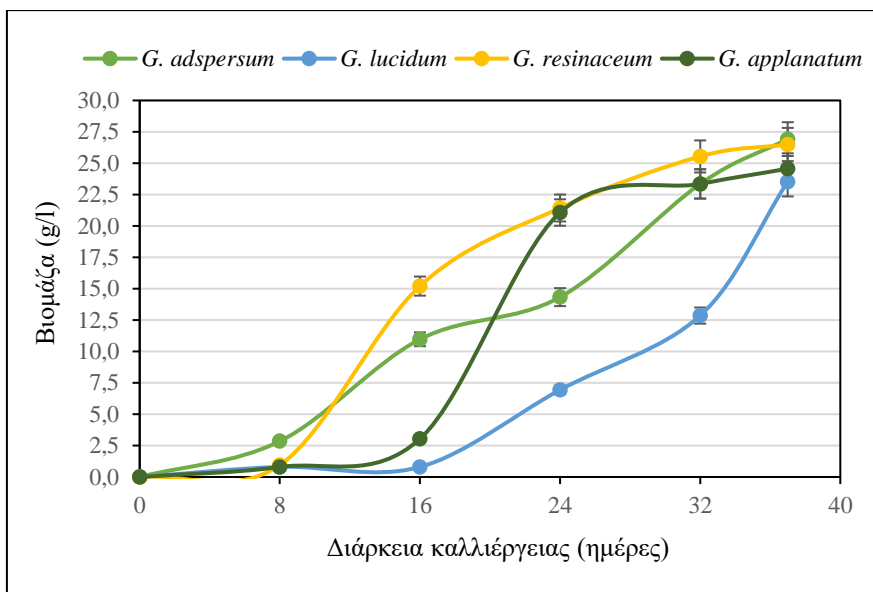
Πίνακας 8: Συνολικά αποτελέσματα μέγιστων μέσων τιμών παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, αντίστοιχης κατανάλωσης σακχάρων και συντελεστή απόδοσης του *G. lucidum*, στα πέντε υποστρώματα (YEA-30, Λ-30, Α-30, Κ-30, Η-30).

| <i>G. lucidum</i> AMRL: 330 | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-------|---------|-----------|------------------------|-----------|-------------|
| Θρεπτικό μέσο | | Ημέρα | X (g/l) | TScons(%) | Y _{X/S} (g/g) | IPS (g/l) | IPS (%κ.β.) |
| YEA-30 | α, β, γ, δ | 37 | 23,53 | 95,82 | 0,74 | 3,37 | 14,30 |
| | ε | 16 | 0,8 | 34,6 | 0,07 | 0,33 | 40,90 |
| Λ-30 | α, β, δ | 32 | 16,70 | 75,42 | 0,75 | 5,04 | 30,20 |
| | γ, ε | 16 | 3,80 | 16,18 | 0,80 | 2,44 | 64,14 |
| Α-30 | α, β, γ, δ | 32 | 13,20 | 68,04 | 0,69 | 5,41 | 40,96 |
| | ε | 16 | 1,46 | 41,26 | 0,12 | 0,65 | 44,86 |
| Κ-30 | α, β, γ, δ | 32 | 17,98 | 70,49 | 0,89 | 7,35 | 40,90 |
| | ε | 16 | 3,88 | 32,09 | 0,42 | 1,72 | 44,34 |
| Η-30 | α, β, δ | 37 | 23,12 | 86,12 | 0,92 | 12,64 | 54,65 |
| | γ, ε | 16 | 3,81 | 13,05 | 0,99 | 2,48 | 65,13 |

Σχετικά με τις μέγιστες τιμές των IPS εκφρασμένες σε g/l και % κ.β. παρατηρήθηκε την 16^η ημέρα ζύμωσης για όλα τα θρεπτικά μέσα YEA-30 (0,33 g/l; 40,90 % κ.β.), Λ-30 (2,44 g/l; 64,14 % κ.β.), Α-30 (0,65 g/l; 44,86 % κ.β.), Κ-30 (1,72 g/l; 44,34 % κ.β.) και Η-30 (2,48 g/l; 65,13 % κ.β.).

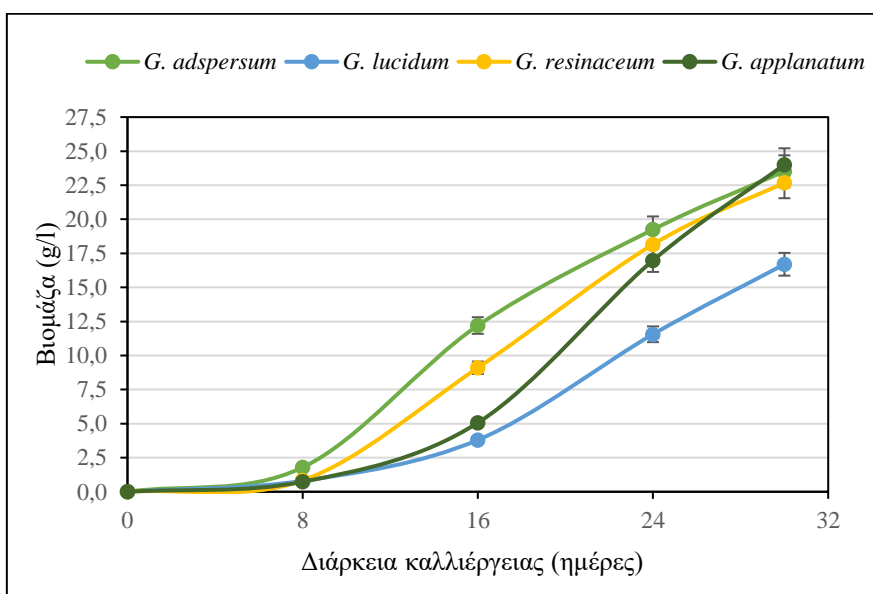
3.3 Παραγωγή βιομάζας

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η πορεία παραγωγής βιομάζας για τα τέσσερα μανιτάρια (*G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*) στα πέντε διαφορετικά υποστρώματα. Πρώτα παρουσιάζονται τα δεδομένα για το υπόστρωμα των YEA με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στη συνέχεια για το θρεπτικό μέσο της λιγνίνης με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στη συνέχεια για το υπόστρωμα ημικκυταρίνης με πηγή άνθρακα την ξυλόζη, έπειτα το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα το άμυλο για το υπόστρωμα αμύλου και το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την κυτταρίνη για το υπόστρωμα κυτταρίνης.



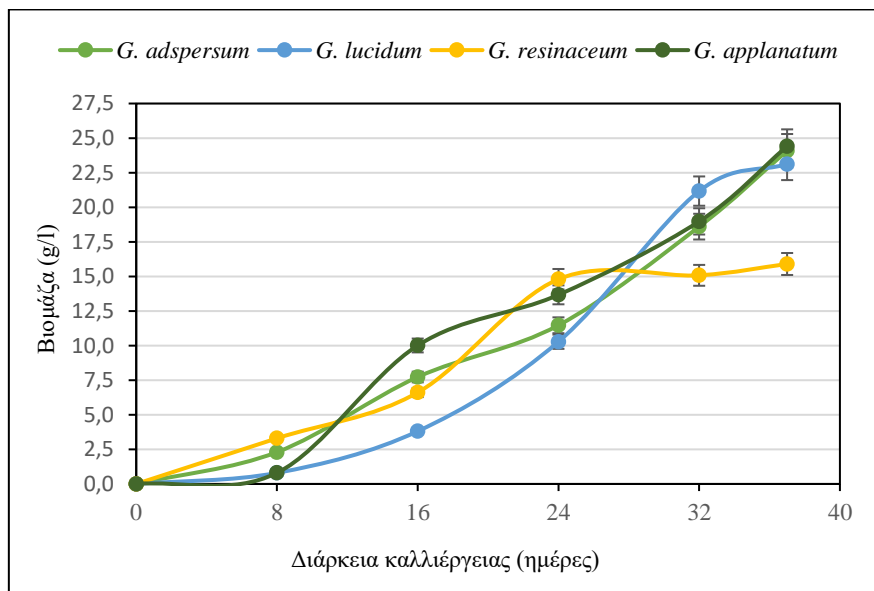
Διάγραμμα 1: Πορεία παραγωγής βιομάζας των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

Βάσει του Διαγράμματος 1 γίνεται κατανοητό ότι στο θρεπτικό μέσο YEA-30 και τα τέσσερα μανιτάρια παρουσιάζουν αυξητική τάση στην παραγωγή βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο με την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας να έχει καταγραφεί στον μακρομύκητα *G. adpersum* (26,92 g/l), έπειτα ακολουθεί ο μακρομύκητας *G. resinaceum* (26,49 g/l), στη συνέχεια είναι ο μακρομύκητας *G. applanatum* (24,56 g/l) και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* (23,53 g/l) τα οποία παρουσίασαν την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας την 37η ημέρα ζύμωσης.



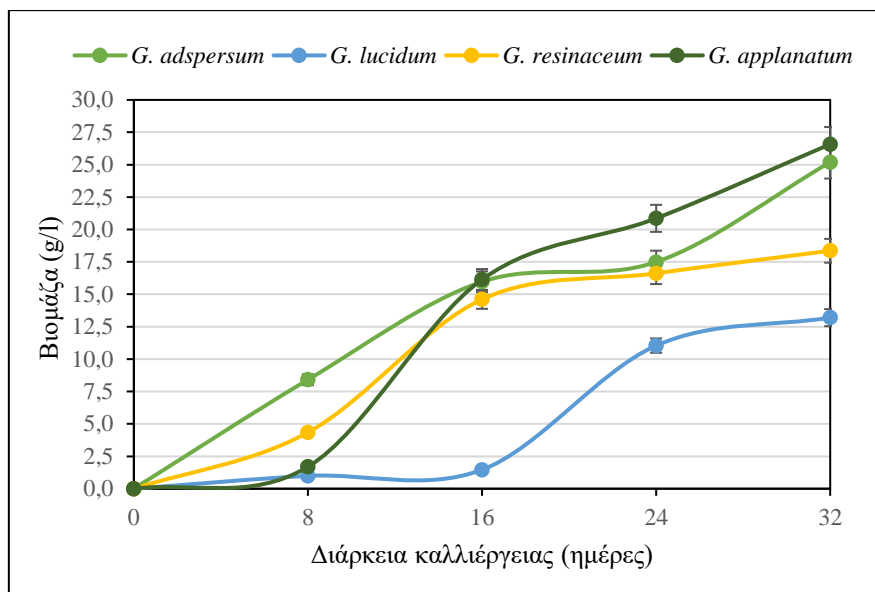
Διάγραμμα 2: Πορεία παραγωγής βιομάζας των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο λιγνίνη.

Βάσει του Διαγράμματος 2, γίνεται κατανοητό ότι στο θρεπτικό μέσο Λ-30 και τα τέσσερα μανιτάρια παρουσιάζουν αυξητική τάση στην παραγωγή βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο με την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας να έχει καταγραφεί στον μακρομύκητα *G. applanatum* (24,01 g/l), έπειτα ακολουθεί ο μακρομύκητας *G. adspersum* (23,52 g/l), στη συνέχεια είναι ο μακρομύκητας *G. resinaceum* (22,68 g/l) και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* (16,70 g/l).



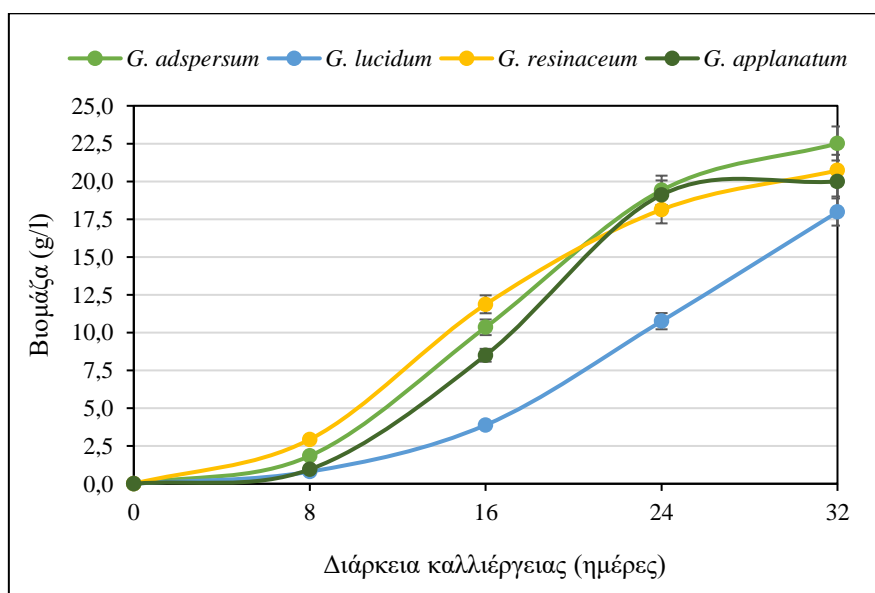
Διάγραμμα 3: Πορεία παραγωγής βιομάζας των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνη.

Βάσει του Διαγράμματος 3 γίνεται κατανοητό ότι στο θρεπτικό μέσο Η-30 και τα τέσσερα μανιτάρια παρουσιάζουν αυξητική τάση στην παραγωγή βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο με την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας να έχει καταγραφεί στον μακρομύκητα *G. applanatum* (24,41 g/l), έπειτα ακολουθεί ο μακρομύκητας *G. adspersum* (24,09 g/l), στη συνέχεια είναι ο μακρομύκητας *G. lucidum* (23,12 g/l) και τέλος είναι ο μακρομύκητας *G. resinaceum* (15,90 g/l).



Διάγραμμα 4: Πορεία παραγωγής βιομάζας των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο αμόλου.

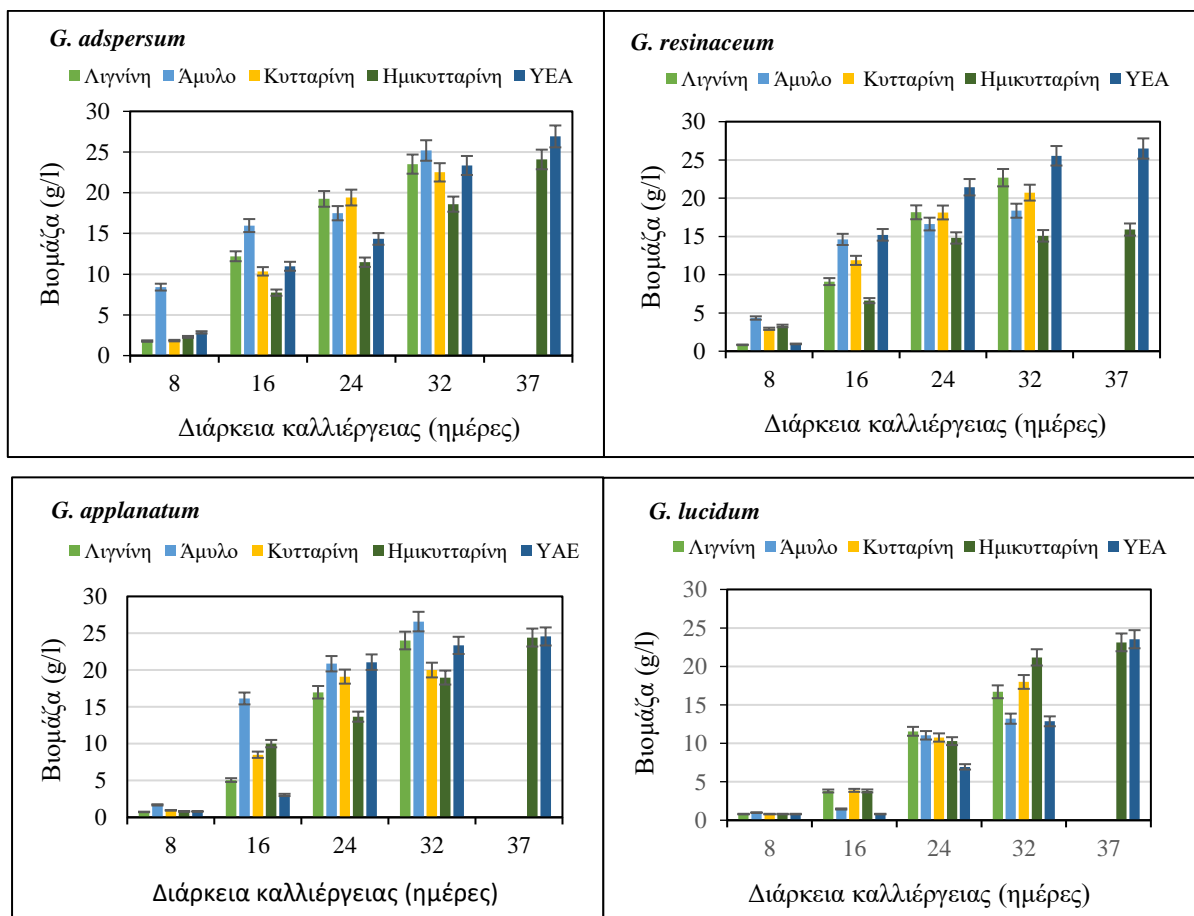
Βάσει του Διαγράμματος 4 γίνεται κατανοητό ότι στο θρεπτικό μέσο A-30 και τα τέσσερα μανιτάρια παρουσιάζουν αυξητική τάση στην παραγωγή βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο με την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας να έχει καταγραφεί στον μακρομύκητα *G. applanatum* (26,58 g/l), έπειτα ακολουθεί ο μακρομύκητας *G. adspersum* (25,19 g/l), στη συνέχεια είναι ο μακρομύκητας *G. resinaceum* (18,36 g/l) και τέλος είναι ο μακρομύκητας *G. lucidum* (13,20 g/l).



Διάγραμμα 5: Πορεία παραγωγής βιομάζας των μακρομυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνη.

Βάσει του Διαγράμματος 5 γίνεται κατανοητό ότι στο θρεπτικό μέσο K-30 και τα τέσσερα μανιτάρια παρουσιάζουν αυξητική τάση στην παραγωγή βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο με την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας να έχει καταγραφεί στον μακρομύκητα *G. adspersum* (22,51 g/l), έπειτα ακολουθεί ο μακρομύκητας *G. resinaceum* (20,72 g/l), στη συνέχεια είναι ο μακρομύκητας *G. applanatum* (20,00 g/l) και τέλος είναι ο μακρομύκητας *G. lucidum* (17,98 g/l).

Η συγκριτική αξιολόγηση των διαφορετικών μανιταριών του γένους *Ganoderma* στα θρεπτικά μέσα, σύμφωνα με το Διάγραμμα 6, εμφάνισε μια συνεχή παραγωγή βιομάζας, παρουσιάζοντας τις μέγιστες τιμές τους στο τελευταίο στάδιο ζύμωσης. Εφόσον το μέσο και οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν ίδιες για όλους τους μύκητες, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ως προς την παραγόμενη βιομάζα αυτών, αποδίδονται στο γενετικό υπόβαθρο των μυκήτων, καθώς το κάθε είδος διαθέτει διαφορετικό τρόπο εκμετάλλευσης του υποστρώματος και διαφορετικό ρυθμό αύξησης του μυκηλίου.

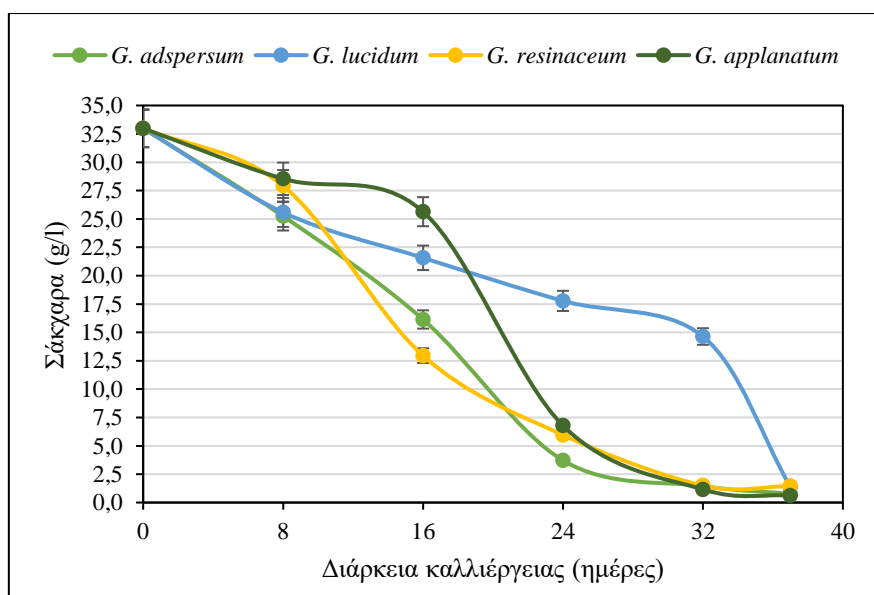


Διάγραμμα 6: Συγκριτική πορεία παραγωγής βιομάζας των τεσσάρων μακρομυκήτων *Ganoderma* για τα πέντε θρεπτικά μέσα.

Από τα αποτελέσματα επίσης παρατηρείται ότι υπήρχε η δυνατότητα για περαιτέρω συνέχιση της καλλιέργειας καθώς δεν είχαν εισέλθει όλα τα μανιτάρια στη στάσιμη φάση της ανάπτυξής τους, αλλά για λόγους συγκριτικής μελέτης, οι καλλιέργειες τερματίστηκαν ταυτόχρονα για όλους τους μύκητες αφού καταναλώθηκε σχεδόν όλη η γλυκόζη του υποστρώματος.

3.4 Κατανάλωση ολικών σακχάρων/υποστρώματος

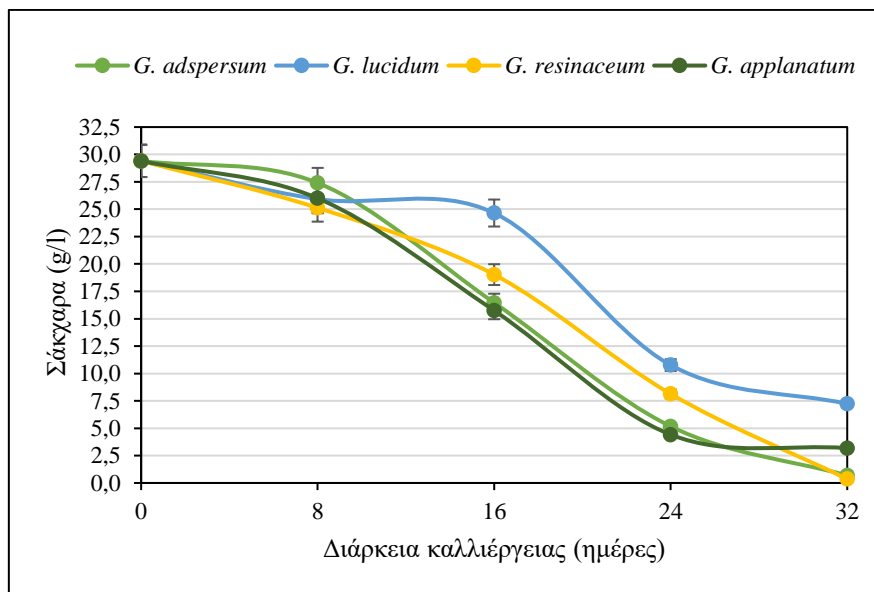
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων στην διάρκεια της καλλιέργειας των τεσσάρων μακρομυκήτων (*G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*) στα πέντε διαφορετικά υποστρώματα. Αρχικά παρουσιάζονται τα δεδομένα για το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη για τα υποστρώματα των ΥΕΑ και της λιγνίνης και στη συνέχεια για το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την ξυλόζη για το υπόστρωμα ημικυτταρίνη, το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την κυτταρίνη για το υπόστρωμα κυτταρίνης και το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα το άμυλο για το υπόστρωμα αμύλου.



Διάγραμμα 7: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων των τεσσάρων μανιταριών του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

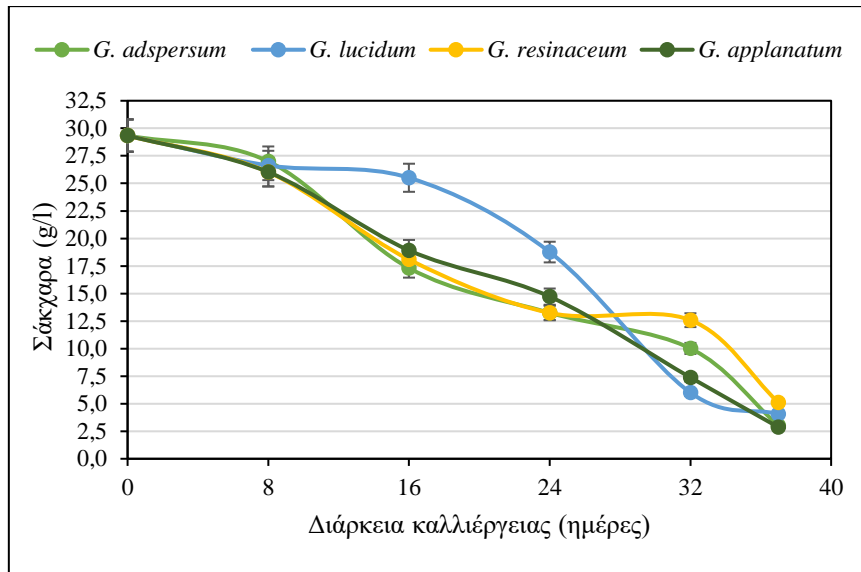
Σύμφωνα με το παραπάνω Διάγραμμα 7, είναι φανερό πως και τα τέσσερα μανιτάρια κατανάλωσαν την μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων του υποστρώματος ΥΕΑ-30. Πιο συγκεκριμένα, οι μακρομύκητες *G. lucidum* και *G. applanatum* κατανάλωσαν την μεγαλύτερη ποσότητα (97,96% και οι δύο), ακολούθησε ο μακρομύκητας *G. adspersum* που

κατανάλωσε το 97,43% των σακχάρων και τέλος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* ο οποίος κατανάλωσε το 95,17%. Κατά την εκκίνηση της καλλιέργειας των μυκήτων, το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε 30 g/l γλυκόζης, η οποία στην πορεία καταναλώθηκε από το κάθε είδος ώστε να παραχθούν η βιομάζα και τα μεταβολικά προϊόντα. Για το θρεπτικό μέσο των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, φαίνεται ότι και τα 4 μανιτάρια κατανάλωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό της αρχικής γλυκόζης στο τέλος της ζύμωσης όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 7. Μετά την 16η ημέρα παρουσίασαν και τα 4 μανιτάρια ταχεία κατανάλωση της γλυκόζης.



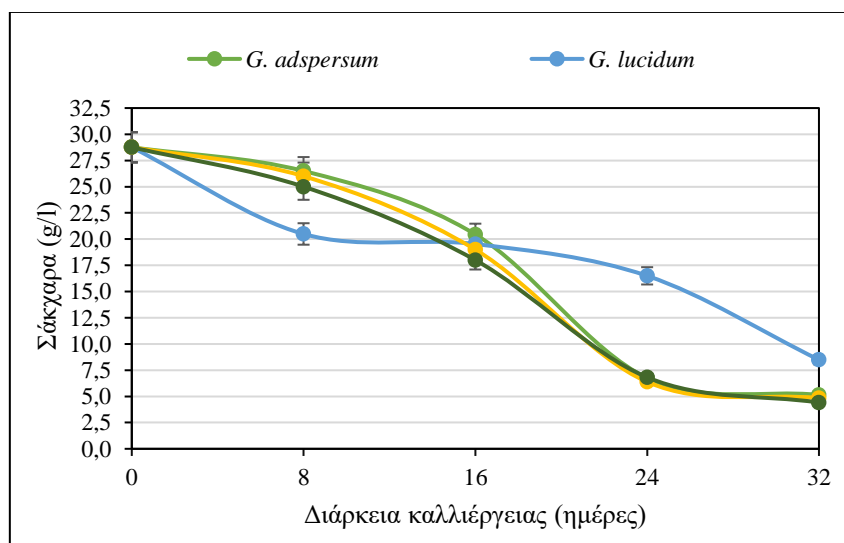
Διάγραμμα 8: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων των ειδών του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης.

Σύμφωνα με το παραπάνω Διάγραμμα 8 είναι φανερό πως και τα τέσσερα μανιτάρια, κατανάλωσαν την μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων του υποστρώματος Λ-30. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. resinaceum* κατανάλωσε την μεγαλύτερη ποσότητα 98,77% σακχάρων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. adspersum* κατανάλωσε το 97,73%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. applanatum* 89,40% και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 75,91%. Για το θρεπτικό μέσο της λιγνίνης, φαίνεται ότι και τα 4 μανιτάρια κατανάλωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό στο τέλος της ζύμωσης με το είδος *G. lucidum* να παρουσιάζει μια σταθερή μείωση με μια ελαφριά απόκλιση συγκριτικά με τα άλλα 3 μανιτάρια.



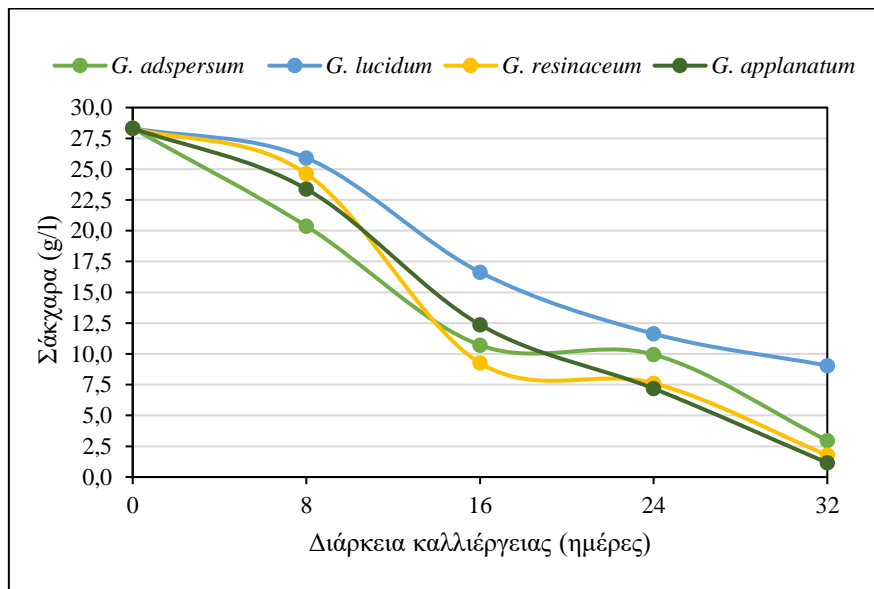
Διάγραμμα 9: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων των ειδών του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης.

Σύμφωνα με το παραπάνω Διάγραμμα 9 και τα τέσσερα μανιτάρια, κατανάλωσαν την μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων του υποστρώματος H-30. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε την μεγαλύτερη ποσότητα 90,42% των σακχάρων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. adpersum* κατανάλωσε το 89,97%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. lucidum* 86,42% και τέλος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* κατανάλωσε το 82,96%. Για το θρεπτικό μέσο της ημικυτταρίνης, φαίνεται ότι και τα 4 μανιτάρια κατανάλωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό των αρχικών σακχάρων στο τέλος της ζύμωσης.



Διάγραμμα 10: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων των ειδών του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης.

Σύμφωνα με το παραπάνω Διάγραμμα 10, είναι φανερό πως και τα τέσσερα μανιτάρια, κατανάλωσαν την μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων του υποστρώματος K-30. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε την μεγαλύτερη ποσότητα 95,30 % σακχάρων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* με ποσοστό 93,86%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. adpersum* 86,19% και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 71,71%. Για το θρεπτικό μέσο της κυτταρίνης, φαίνεται ότι και τα 4 μανιτάρια κατανάλωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό των αρχικών σακχάρων στο τέλος της ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα, μετά την 16η ημέρα ζύμωσης παρουσίασαν και τα 4 μανιτάρια ταχεία κατανάλωση με μια διαφορά στο είδος *G. lucidum* το οποίο εμφάνισε χαμηλότερο κατανάλωση σακχάρων συγκριτικά με τα άλλα 3 μανιτάρια.

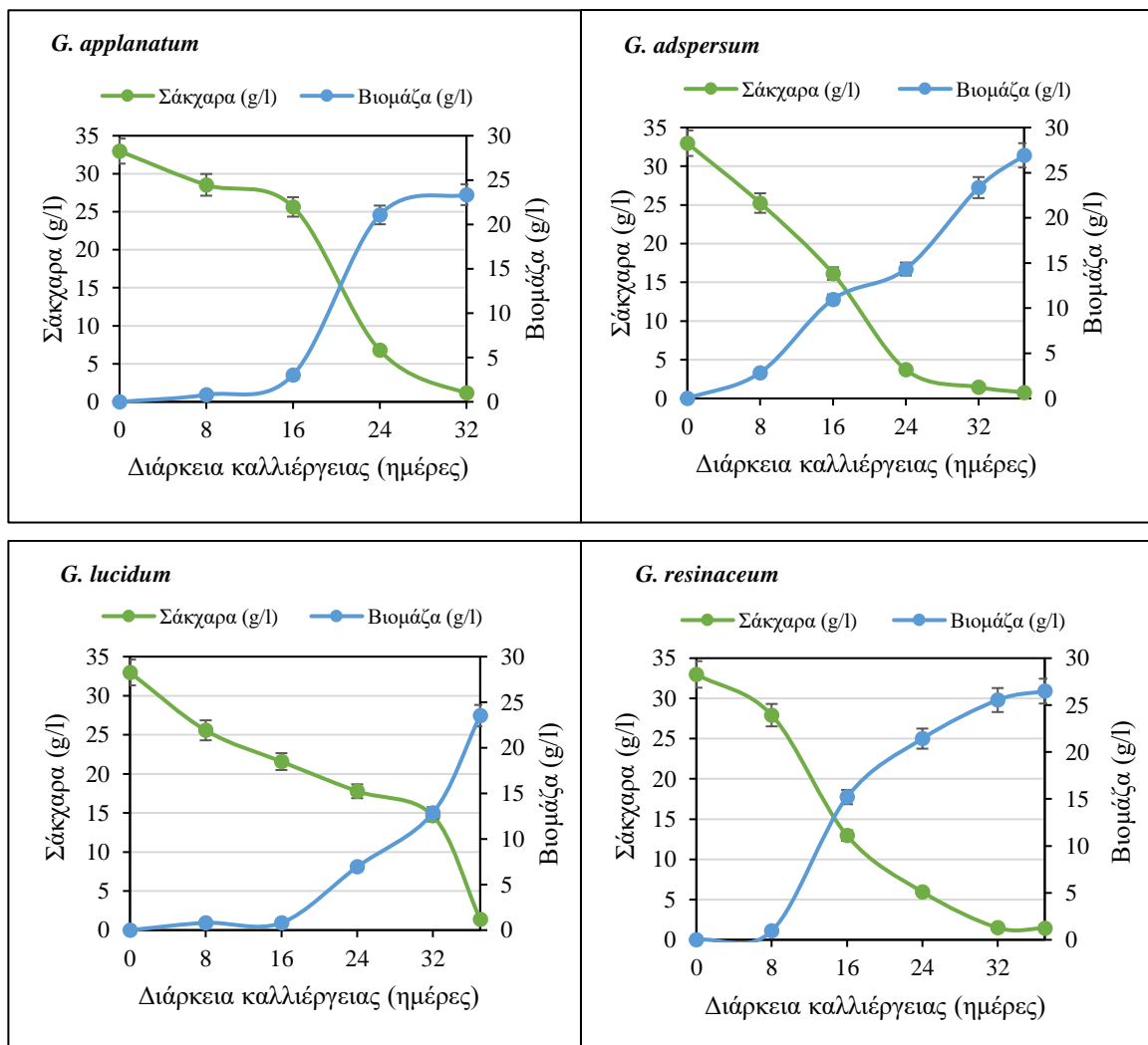


Διάγραμμα 11: Κινητική κατανάλωσης σακχάρων των ειδών του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο του αμύλου.

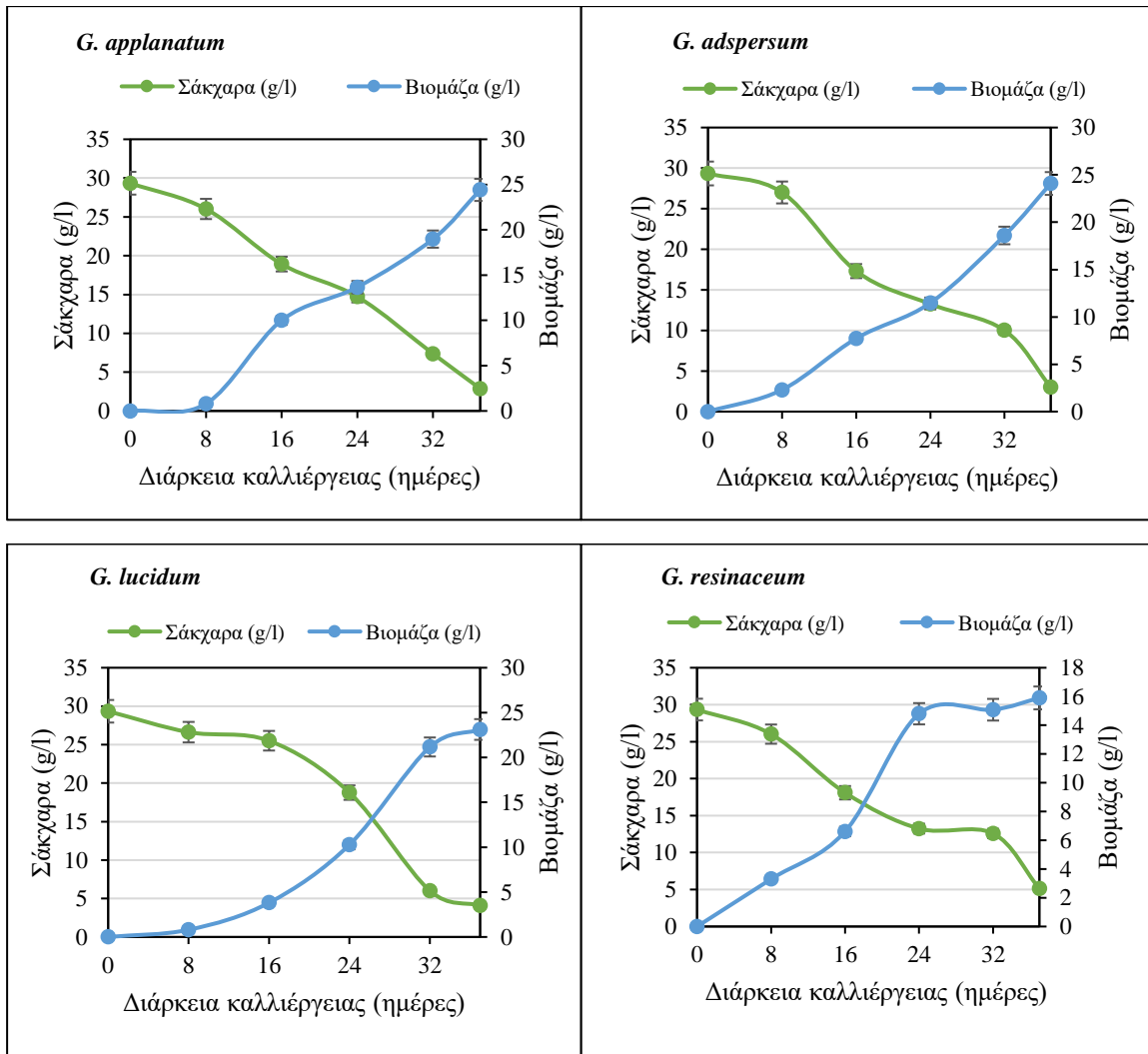
Σύμφωνα με το παραπάνω Διάγραμμα 11 είναι φανερό πως και τα τέσσερα μανιτάρια, κατανάλωσαν αρκετά μεγάλη ποσότητα σακχάρων, του υποστρώματος A-30. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε την μεγαλύτερη ποσότητα 96,17% σακχάρων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* κατανάλωσε το 94,08%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. adpersum* 90,11% και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 69,82%. Για το θρεπτικό μέσο του αμύλου, φαίνεται ότι και τα 4 μανιτάρια κατανάλωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό της των σακχάρων στο τέλος της ζύμωσης με μια διαφορά στο είδος *G. lucidum* το οποίο εμφάνισε χαμηλότερη κατανάλωση συγκριτικά με τα άλλα 3 μανιτάρια.

3.4.1 Κατανάλωση σακχάρων του υποστρώματος σε σύγκριση με τη βιομάζα

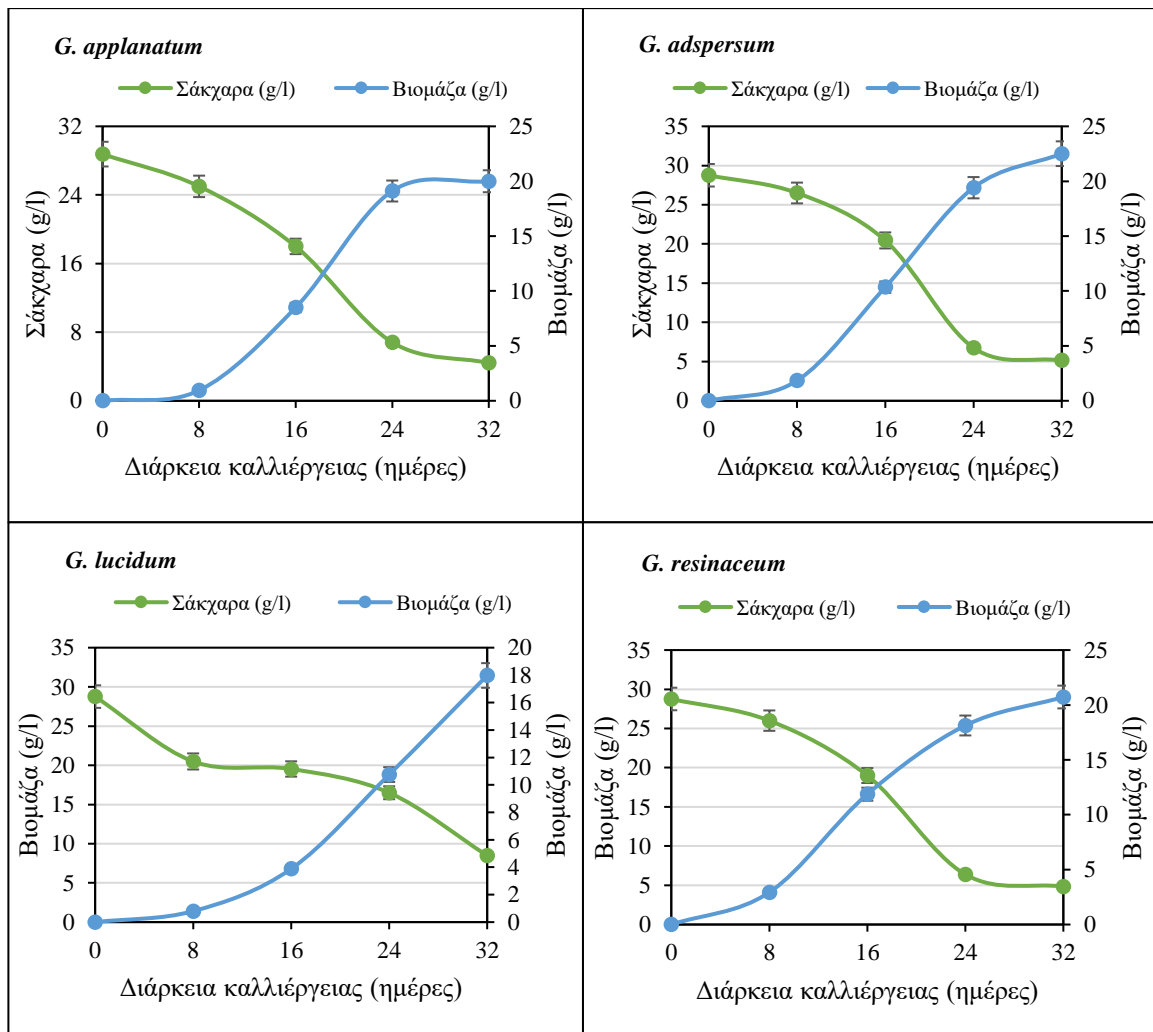
Όπως έχει αναφερθεί, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, οι μύκητες καταναλώνουν τα σάκχαρα με σκοπό την ανάπτυξη της μυκηλιακής μάζας τους και την παραγωγή των προϊόντων του μεταβολισμού τους. Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι κινητικές αύξησης του κάθε μύκητα ξεχωριστά για κάθε θρεπτικό μέσο, όπου είναι φανερή η αντίστροφη σχέση που παρουσιάζει η παραγωγή βιομάζας με την κατανάλωση σακχάρων, καθώς ραγδαία αύξηση της βιομάζας συνοδεύεται από ραγδαία κατανάλωση των σακχάρων.



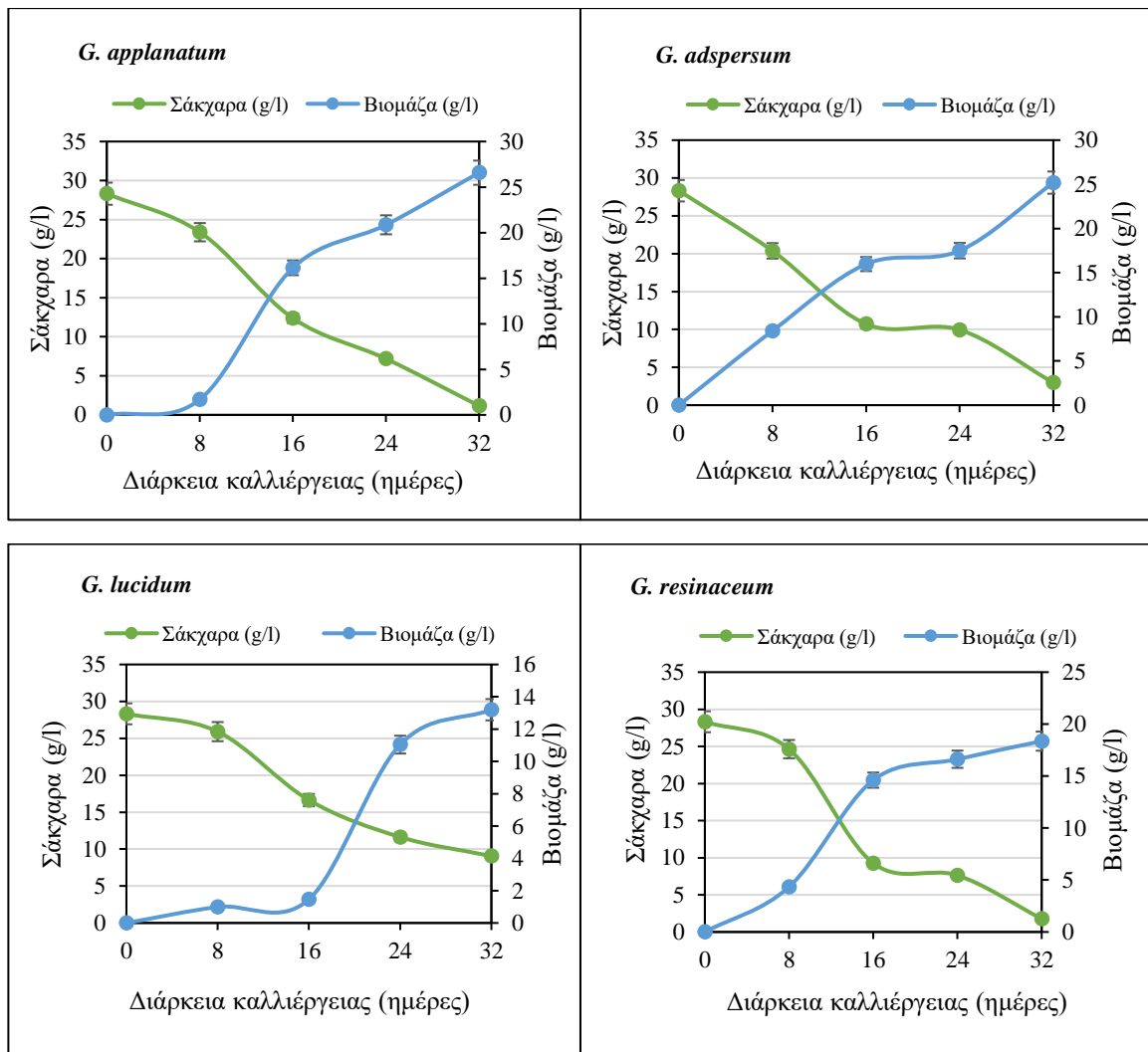
Διάγραμμα 12. Κινητική αύξηση και κατανάλωση βιομάζας και σακχάρων (g/l) του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό υπόστρωμα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.



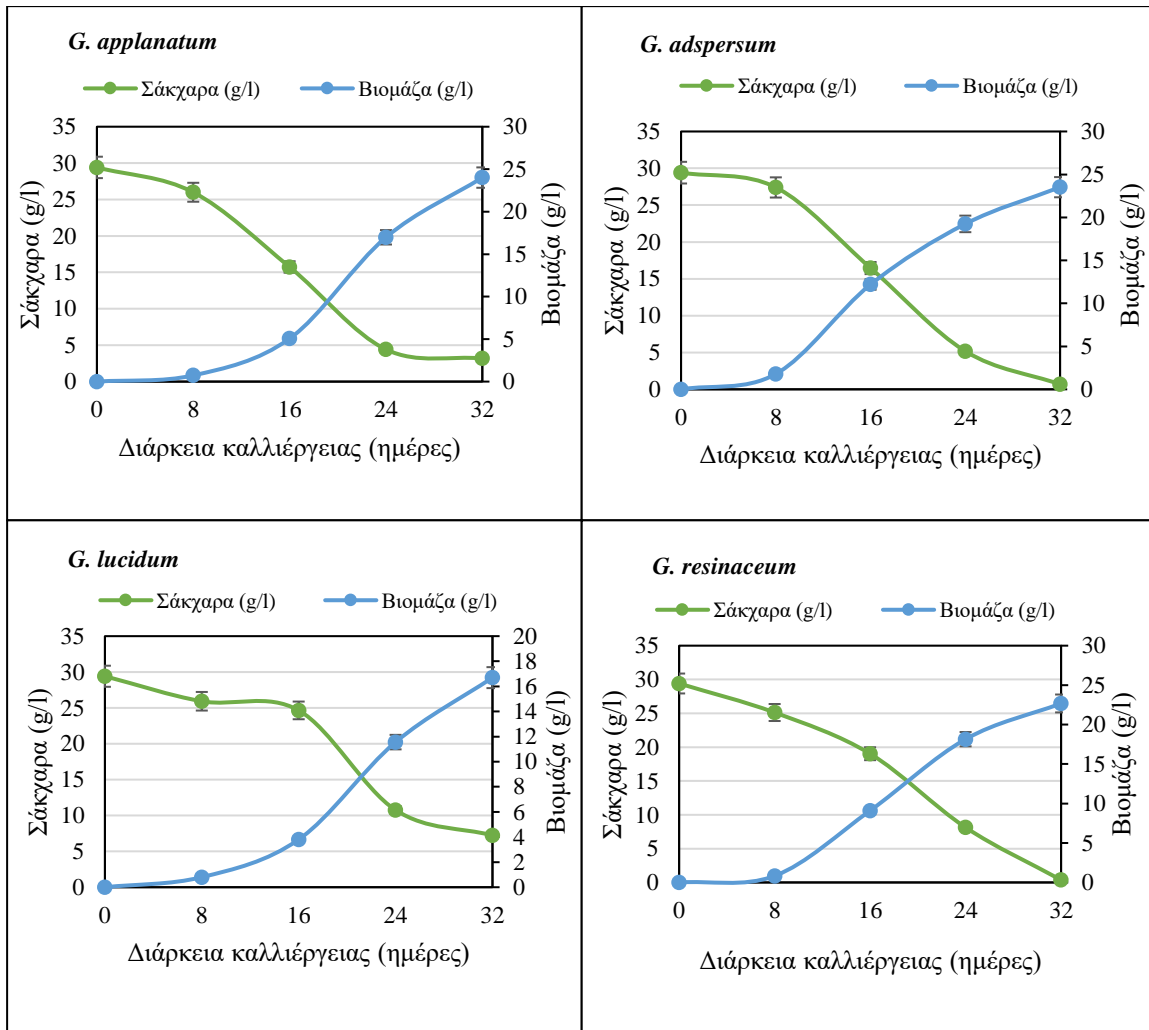
Διάγραμμα 13. Κινητική αύξηση και κατανάλωση βιομάζας και σακχάρων (g/l) του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό υπόστρωμα ημικυτταρίνης.



Διάγραμμα 14. Κινητική αύξηση και κατανάλωση βιομάζας και σακχάρων (g/l) του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό υπόστρωμα κυτταρίνης.



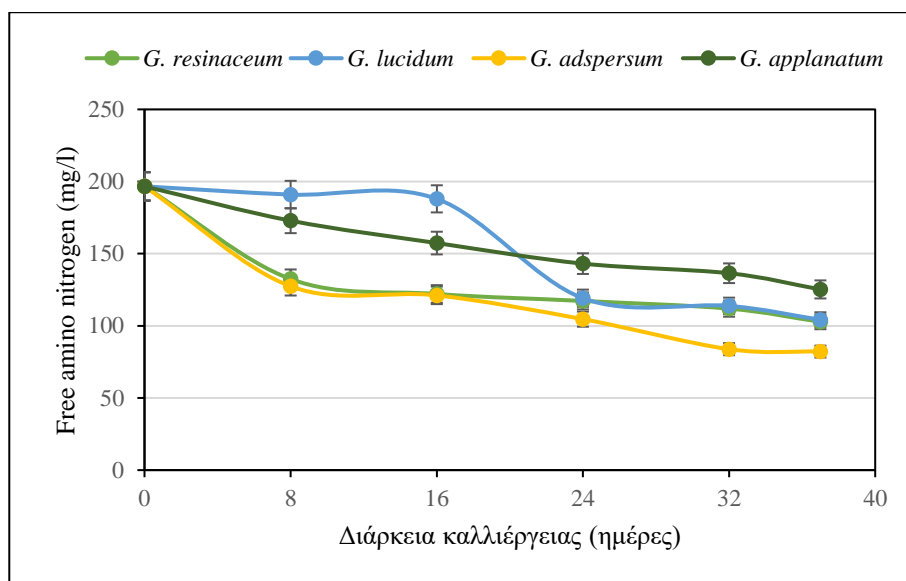
Διάγραμμα 15. Κινητική αύξηση και κατανάλωση βιομάζας και σακχάρων (g/l) του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό υπόστρωμα αμύλου.



Διάγραμμα 16. Κινητική αύξηση και κατανάλωση βιομάζας και σακχάρων (g/l) του μύκητα *Ganoderma* για το θρεπτικό υπόστρωμα λιγνίνης.

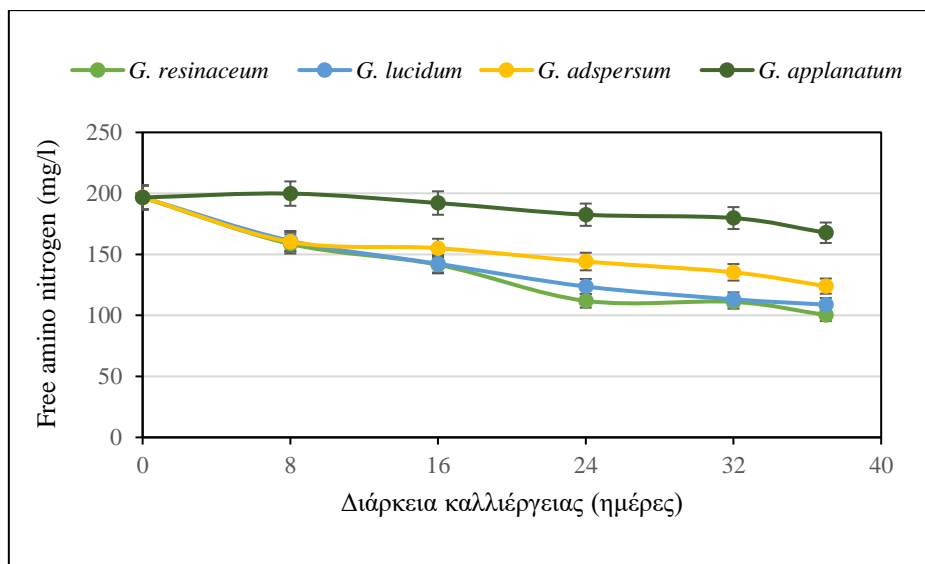
3.5 Κατανάλωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στα θρεπτικά μέσα

Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζεται η πορεία κατανάλωσης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, για τα τέσσερα μανιτάρια (*G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*) στα πέντε διαφορετικά υποστρώματα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την 8^η, 16^η, 24^η, 32^η, και 37^η ημέρα καλλιέργειας για τα θρεπτικά υποστρώματα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων και ημικυτταρίνης ενώ για τα θρεπτικά υποστρώματα λιγνίνης, κυτταρίνης και αμύλου, πραγματοποιήθηκαν την 8^η, 16^η, 24^η και 32^η ημέρα καλλιέργειας.



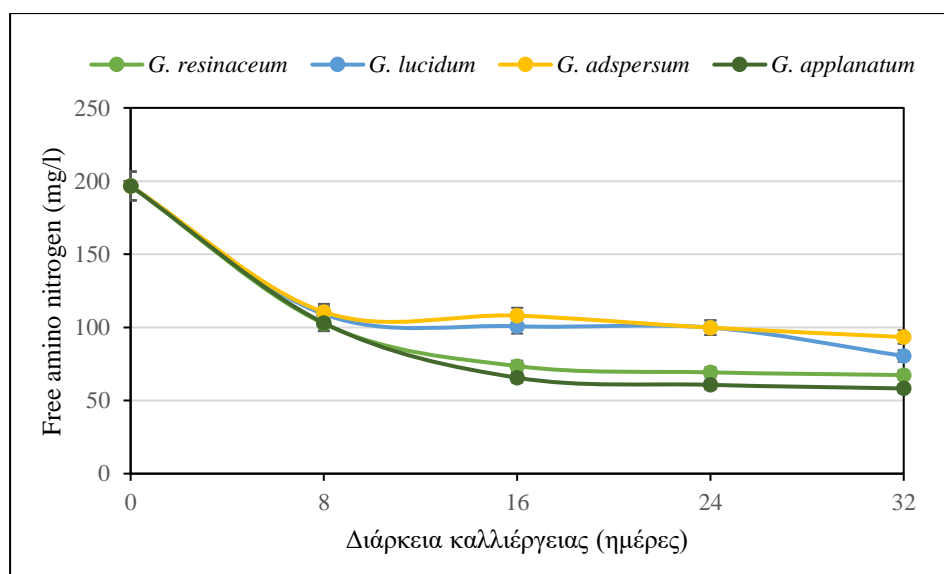
Διάγραμμα 17: Πορεία κατανάλωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (mg/l) των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο ΥΕΑ.

Αρχικά, στο Διάγραμμα 17, για το θρεπτικό υπόστρωμα ΥΕΑ, παρατηρείται ότι καταναλώθηκε μικρή ποσότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και στα τέσσερα μανιτάρια *Ganoderma*. Πιο αναλυτικά, ο μακρομύκητας *G. adspersum* κατανάλωσε το 58,22% του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων παρουσιάζοντας τον υψηλότερο ρυθμό κατανάλωσης. Έπειτα, ο μακρομύκητας *G. resinaceum* κατανάλωσε το 47,73%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 47,01% και τέλος ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε το 36,31%.



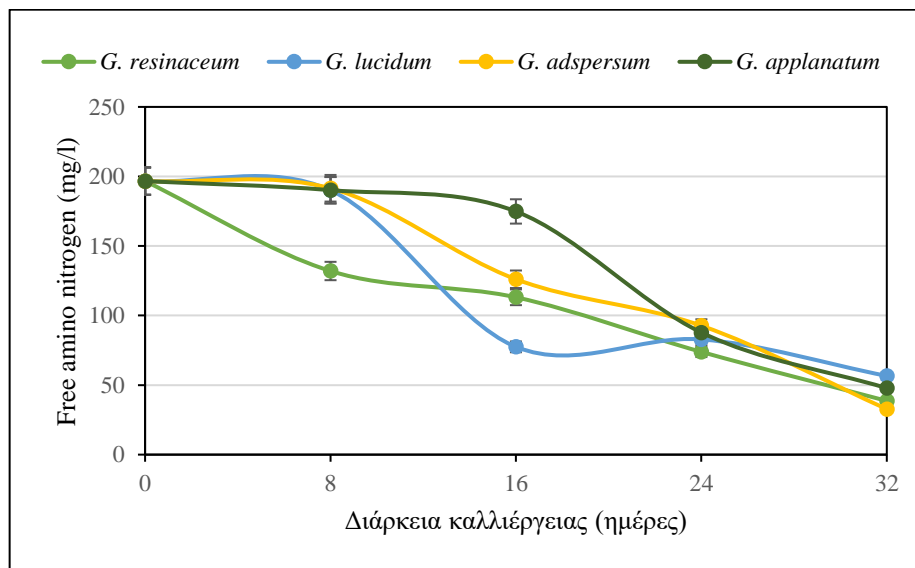
Διάγραμμα 18: Πορεία κατανάλωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (mg/l) των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης.

Στο Διάγραμμα 18 παρατηρείται ότι καταναλώθηκε μικρή ποσότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων του θρεπτικού υποστρώματος H-30 και για τα τέσσερα είδη *Ganoderma*. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. resinaceum* κατανάλωσε το 48,98% του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, παρουσιάζοντας τον υψηλότερο ρυθμό κατανάλωσης, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 44,67%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. adpersum* κατανάλωσε το 36,95% και τέλος ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε το 14,69%.



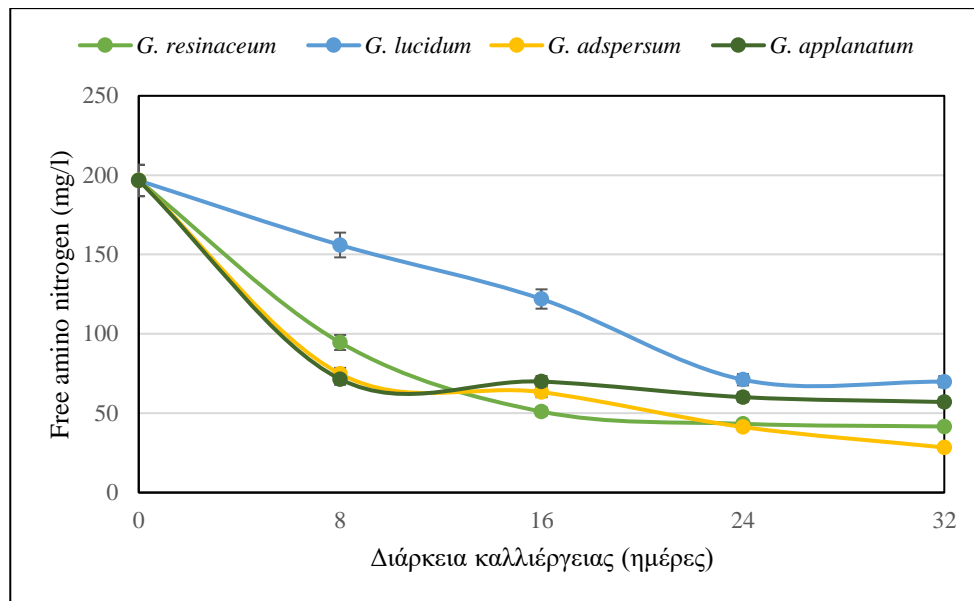
Διάγραμμα 19: Πορεία κατανάλωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (mg/l) των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο λιγνίνη.

Στο Διάγραμμα 19, παρατηρείται ότι καταναλώθηκε μικρή ποσότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων του θρεπτικού υποστρώματος Λ-30 και για τα τέσσερα είδη *Ganoderma*. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε το 70,39% του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* κατανάλωσε το 65,73%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 59,08% και τέλος ο μακρομύκητας *G. adpersum* κατανάλωσε το 52,52%.



Διάγραμμα 20: Πορεία κατανάλωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (mg/l) των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο το άμυλο.

Στο Διάγραμμα 20, παρατηρείται ότι καταναλώθηκε αρκετή ποσότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων του θρεπτικού υποστρώματος Α-30 και για τα τέσσερα είδη *Ganoderma*. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. adpersum* κατανάλωσε το 83,36% του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* 80,35%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε το 75,69% και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 71,22%.



Διάγραμμα 21: Πορεία κατανάλωσης αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (mg/l) των μυκήτων *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης.

Στο Διάγραμμα 21, παρατηρείται ότι καταναλώθηκε αρκετή ποσότητα του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων του θρεπτικού υποστρώματος K-30 και για τα τέσσερα είδη *Ganoderma*. Πιο συγκεκριμένα, ο μακρομύκητας *G. adspersum* κατανάλωσε το 85,55% του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, δεύτερος ο μακρομύκητας *G. resinaceum* 78,84%, τρίτος ο μακρομύκητας *G. applanatum* κατανάλωσε το 70,99% και τέλος ο μακρομύκητας *G. lucidum* κατανάλωσε το 64,48%.

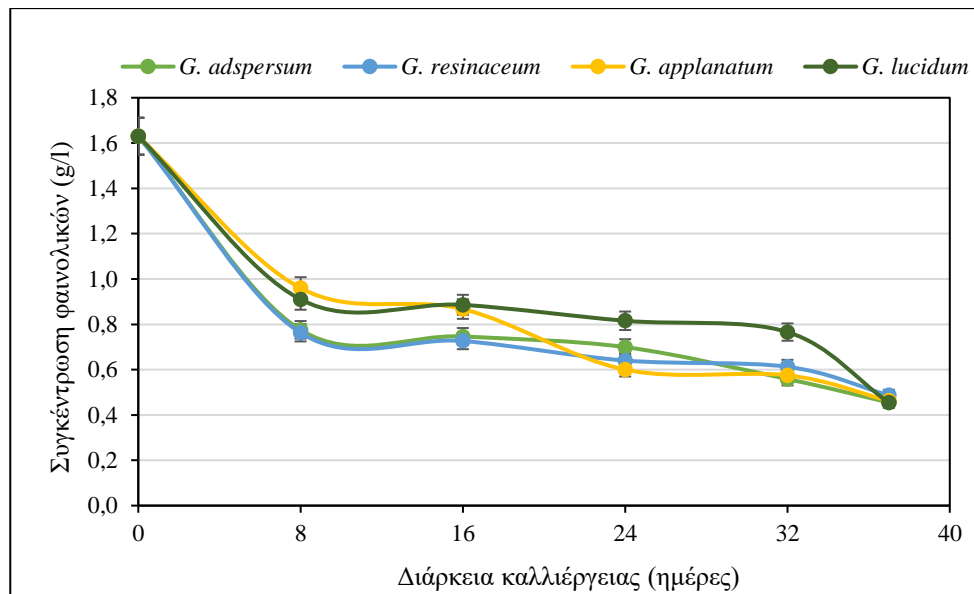
3.6 Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, αποχρωματισμός, αποφαινόλωση.

Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων γινόταν παραλαβή θρεπτικού μέσου των καλλιεργειών για τα τέσσερα μανιτάρια *Ganoderma* με σκοπό τον προσδιορισμό της κινητικής μείωσης των φαινολικών ενώσεων στα δύο θρεπτικά μέσα (ΥΕΑ-30 και Λ-30). Πραγματοποιώντας τις μετρήσεις παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα θρεπτικά μέσα, τα οποία είχαν πηγή άνθρακα την γλυκόζη (Πίνακας 9).

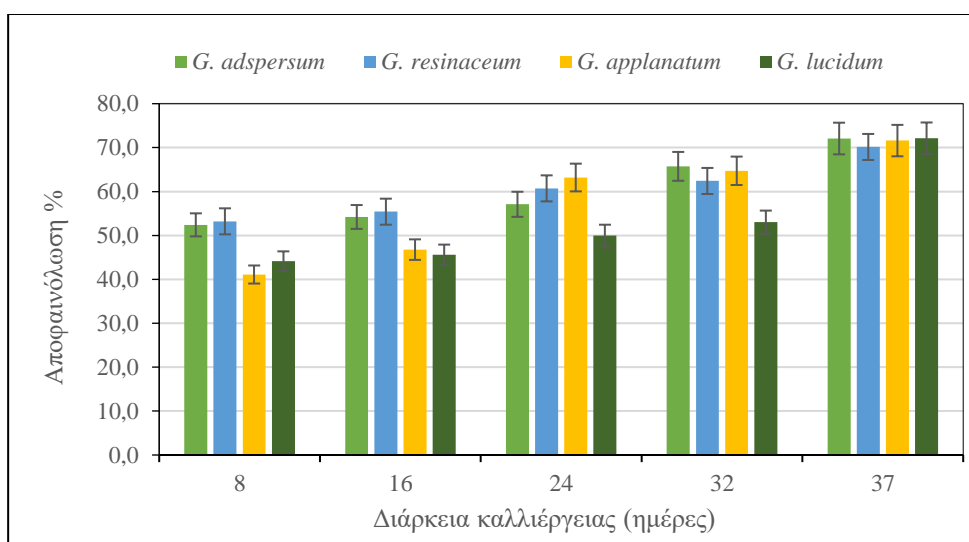
Πίνακας 9: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και ποσοστό αποφαινόλωσης των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* κατά την καλλιέργειά τους για τα θρεπτικά μέσα υγρών ελαιοϋργικών αποβλήτων και λιγνίνης.

| Θρεπτικό μέσο | Μύκητες | Συγκέντρωση φαινολικών (g/l) | | Αποφαινόλωση (%) |
|---------------|----------------------|------------------------------|--------|------------------|
| | | Αρχική | Τελική | |
| ΥΕΑ-30 | <i>G. adpersum</i> | 1,63 | 0,46 | 72,07 |
| | <i>G. applanatum</i> | | 0,46 | 71,60 |
| | <i>G. lucidum</i> | | 0,45 | 72,12 |
| | <i>G. resinaceum</i> | | 0,49 | 70,15 |
| Λ-30 | <i>G. adpersum</i> | 1,20 | 0,58 | 52,07 |
| | <i>G. applanatum</i> | | 0,40 | 66,58 |
| | <i>G. lucidum</i> | | 0,56 | 53,59 |
| | <i>G. resinaceum</i> | | 0,57 | 52,35 |

Βάσει του παραπάνω πίνακα και όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 22, στο θρεπτικό μέσο ΥΕΑ-30 η μικρότερη τιμή συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων εντοπίζεται την τελευταία ημέρα της ζύμωσης και για τα τέσσερα είδη. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωσης επιτυγχάνεται από το είδος *G. lucidum* σε ποσοστό 72,12%. Δεύτερο, ακολουθεί το είδος *G. adpersum* με ποσοστό αποφαινόλωσης 72,07%, στη συνέχεια, το *G. applanatum* με ποσοστό αποφαινόλωσης 71,60% και τέλος το *G. resinaceum* με ποσοστό 70.15%. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 23, το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωσης εμφανίστηκε στην 37^η ημέρα ζύμωσης.

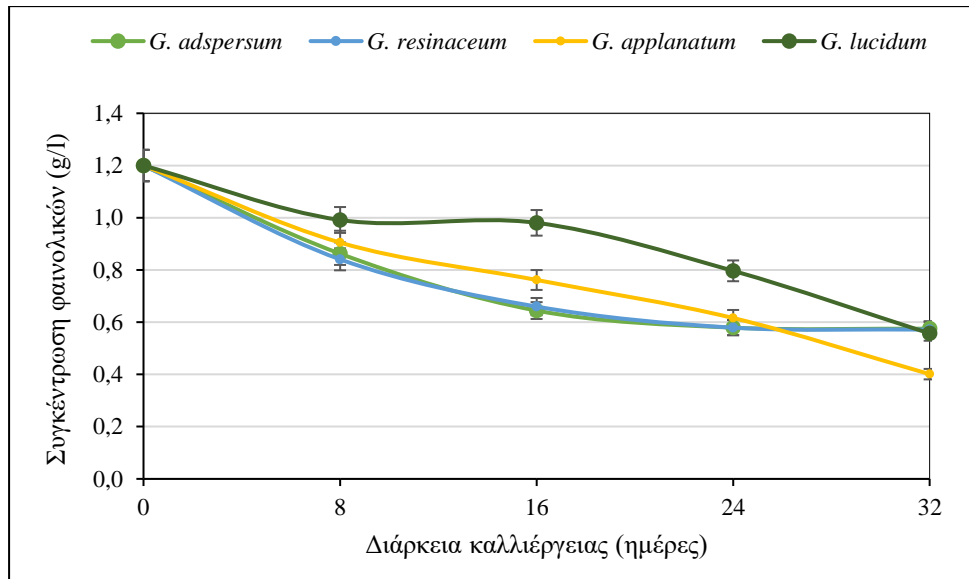


Διάγραμμα 22: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/l) κατά την αύξηση των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* στο θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

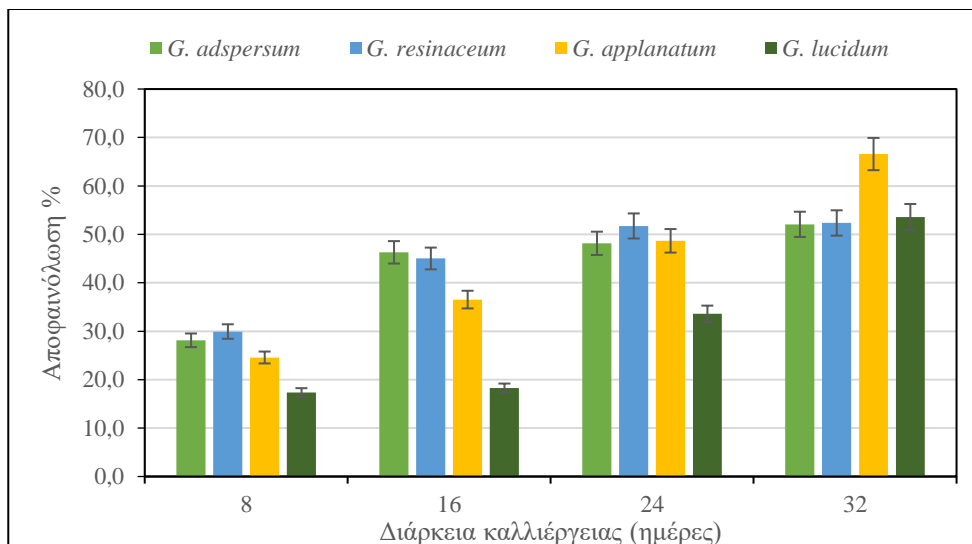


Διάγραμμα 23: Ποσοστό αποφαινόλωσης (%) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

Για το θρεπτικό μέσο Λ-30 όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 24, η μικρότερη τιμή συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων εντοπίζεται την τελευταία ημέρα της ζύμωσης και για τα τέσσερα είδη. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωσης επιτυγχάνεται από το είδος *G. applanatum* σε ποσοστό 66,58%. Ακολουθεί το *G. lucidum* με ποσοστό 53,59%, στη συνέχεια, το *G. resinaceum* με ποσοστό αποφαινόλωσης 52,35% και τέλος το *G. adpersum* με ποσοστό 52,07%. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 25, το μεγαλύτερο ποσοστό αποφαινόλωσης εμφανίστηκε στην 37^η ημέρα ζύμωσης.

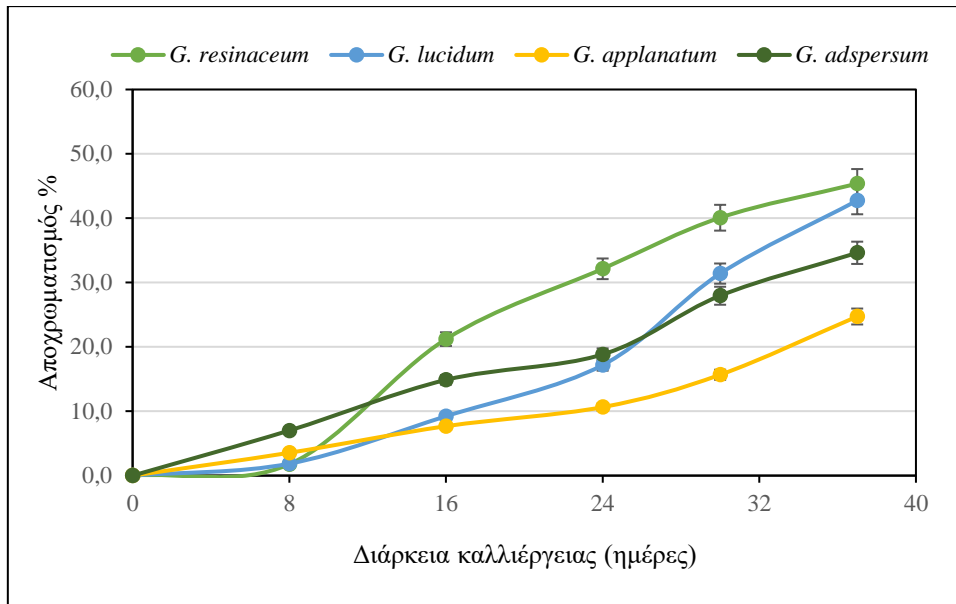


Διάγραμμα 24: Κινητική μείωσης φαινολικών ενώσεων (g/l) κατά την αύξηση των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* στο θρεπτικό μέσο λιγνίνης.



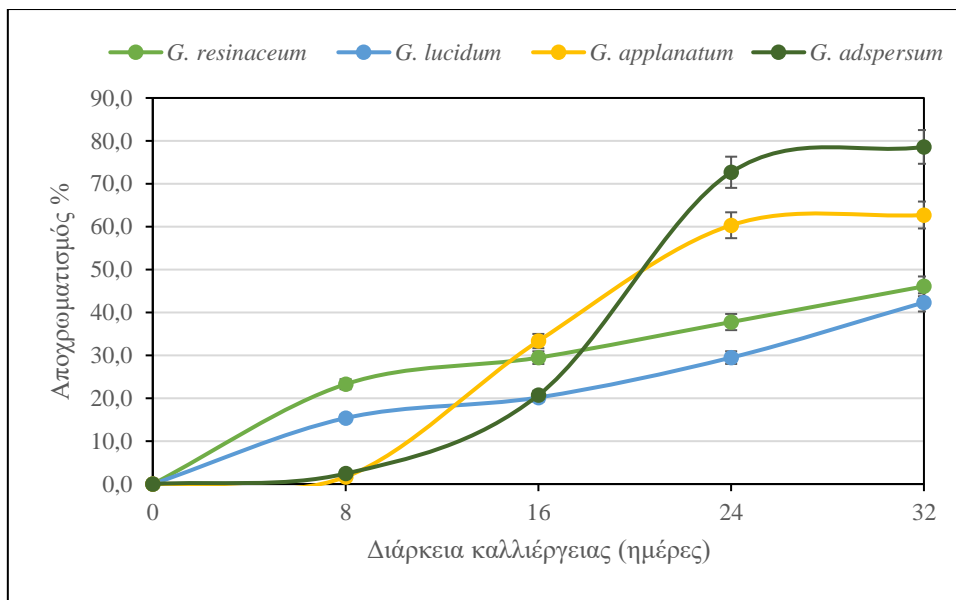
Διάγραμμα 25: Ποσοστό αποφαινώσεως (%) των ειδών *Ganoderma* στο θρεπτικό μέσο λιγνίνη.

Για τον αποχρωματισμό του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, το διάγραμμα που προκύπτει από τις φωτομετρήσεις των δειγμάτων, έχοντας πάρει την $t=0$ ως τη στιγμή του μηδενικού αποχρωματισμού, φαίνεται παρακάτω. Το είδος του *G. resinaceum* κατέγραψε τον μεγαλύτερο αποχρωματισμό συνεπώς, πέτυχε τον αποχρωματισμό του αποβλήτου, μέχρι και 45,37% την 37^η ημέρα. Δεύτερο ακολουθεί το είδος *G. lucidum* με 42,75%, τρίτο το *G. adspersum* με 34,62% και τέταρτο το *G. applanatum* με ποσοστό 24,72%.



Διάγραμμα 26: % Αποχρωματισμός των ειδών *Ganoderma* στο θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

Για τον αποχρωματισμό του υποστρώματος λιγνίνης, το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού καταγράφηκε στο είδος του *G. adpersum* με ποσοστό 78,59%, δεύτερο ακολούθησε το είδος *G. applanatum* με ποσοστό 62,72%, τρίτο το είδος *G. resinaceum* με 46,09% και τέταρτο το *G. lucidum* με ποσοστό 42,34% (Διάγραμμα 27).



Διάγραμμα 27: % Αποχρωματισμός των ειδών *Ganoderma* στο θρεπτικό μέσο λιγνίνης.

3.7 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Κατά την καλλιέργεια των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* πραγματοποιήθηκε παραλαβή και ποσοτικός προσδιορισμός των IPS στα σημεία της ζύμωσης τους, χωρίς να καταγραφεί το πρώτο σημείο (8^η ημέρα καλλιέργειας) καθώς για όλα τα θρεπτικά μέσα δεν παράχθηκε ικανοποιητική ποσότητα. Τα αποτελέσματα του πειράματος δίνονται στους παρακάτω Πίνακες όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των IPS κατά την διάρκεια των ζυμώσεων ανά υπόστρωμα και εκφράζονται σε g/l και σε % επί ξ.β. (g IPS / g ξηρής βιομάζας x 100).

Για το θρεπτικό μέσο YEA, οι τιμές των IPS που παράχθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 0,33-10,05 g/l όπως φαίνεται στον Πίνακα 10 με μεγαλύτερη παραγωγή να παρουσιάζει το είδος *G. resinaceum* την 37^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. adpersum* (9,33 g/l) την 37^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. applanatum* (8,59 g/l) την 24^η ημέρα και τέλος το *G. lucidum* με παραγωγή IPS (3,37 g/l) την 37^η ημέρα

Πίνακας 10: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο YEA.

| Θρεπτικό υλικό: | | YEA | |
|----------------------|--------|-----------|--------------|
| Μύκητες | Ημέρες | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| <i>G. adpersum</i> | 16 | 5,30 | 48,33 |
| | 24 | 5,18 | 36,12 |
| | 32 | 7,74 | 33,16 |
| | 37 | 9,33 | 34,67 |
| <i>G. applanatum</i> | 16 | 1,07 | 35,12 |
| | 24 | 8,59 | 40,75 |
| | 32 | 6,04 | 25,88 |
| | 37 | 3,94 | 16,05 |
| <i>G. lucidum</i> | 16 | 0,33 | 40,90 |
| | 24 | 2,80 | 40,32 |
| | 32 | 3,27 | 25,39 |
| | 37 | 3,37 | 14,30 |
| <i>G. resinaceum</i> | 16 | 6,08 | 39,99 |
| | 24 | 7,72 | 36,03 |
| | 32 | 8,67 | 33,94 |
| | 37 | 10,05 | 37,92 |

Πίνακας 11: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης.

| Θρεπτικό υλικό: | | Λιγνίνη | |
|----------------------|--------|-----------|--------------|
| Μύκητες | Ημέρες | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| <i>G. adpersum</i> | 16 | 7,09 | 58,10 |
| | 24 | 10,84 | 56,33 |
| | 30 | 11,48 | 48,82 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. applanatum</i> | 16 | 3,14 | 61,99 |
| | 24 | 8,84 | 52,07 |
| | 30 | 12,35 | 51,44 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. lucidum</i> | 16 | 2,44 | 64,14 |
| | 24 | 4,84 | 41,91 |
| | 30 | 5,04 | 30,20 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. resinaceum</i> | 16 | 5,61 | 61,60 |
| | 24 | 9,12 | 50,25 |
| | 30 | 10,74 | 47,36 |
| | 37 | - | - |

Για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης, οι τιμές των ολικών IPS που παράχθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 2,44-12,35 g/l όπως φαίνεται στον Πίνακα 11 με μεγαλύτερη παραγωγή να παρουσιάζει το είδος *G. applanatum*, δεύτερο το είδος *G. adpersum* με παραγωγή 11,48 g/l, τρίτο το είδος *G. resinaceum* 10,74 g/l και τέλος το *G. lucidum* με παραγωγή ολικών IPS 5,04 g/l, όλα την 32^η ημέρα ζύμωσης.

Πίνακας 12: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης.

| Θρεπτικό υλικό: | | Κυτταρίνη | |
|-----------------------|--------|-----------|--------------|
| Είδη <i>Ganoderma</i> | Ημέρες | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| <i>G. adpersum</i> | 16 | 4,58 | 44,24 |
| | 24 | 8,84 | 45,56 |
| | 30 | 9,31 | 41,38 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. applanatum</i> | 16 | 3,75 | 44,11 |
| | 24 | 7,73 | 40,46 |
| | 30 | 7,44 | 37,21 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. lucidum</i> | 16 | 1,72 | 44,34 |
| | 24 | 4,62 | 43,02 |
| | 30 | 7,35 | 40,90 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. resinaceum</i> | 16 | 4,97 | 41,86 |
| | 24 | 8,62 | 47,53 |
| | 30 | 9,19 | 44,34 |
| | 37 | - | - |

Για το θρεπτικό μέσο της κυτταρίνης, οι τιμές των ολικών IPS που παράχθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 1,72-9,31 g/l όπως φαίνεται στον Πίνακα 12 με μεγαλύτερη παραγωγή να παρουσιάζει το είδος *G. adpersum* την 32^η ημέρα ζύμωσης, δεύτερο το είδος *G. resinaceum* 9,19 g/l την 32^η ημέρα ζύμωσης, τρίτο το είδος *G. applanatum* 7,44 g/l την 32^η ημέρα ζύμωσης και τέταρτο το *G. lucidum* με τιμή 7,35 g/l την 32^η ημέρα ζύμωσης.

Πίνακας 13: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο άμυλο.

| Θρεπτικό υλικό: | | Άμυλο | |
|-----------------------|--------|-----------|--------------|
| Είδη <i>Ganoderma</i> | Ημέρες | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| <i>G. adpersum</i> | 16 | 9,31 | 58,33 |
| | 24 | 8,37 | 47,85 |
| | 30 | 9,72 | 38,58 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. applanatum</i> | 16 | 6,95 | 43,03 |
| | 24 | 8,51 | 40,78 |
| | 30 | 7,49 | 28,18 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. lucidum</i> | 16 | 0,65 | 44,86 |
| | 24 | 4,90 | 44,38 |
| | 30 | 5,41 | 40,96 |
| | 37 | - | - |
| <i>G. resinaceum</i> | 16 | 9,13 | 62,47 |
| | 24 | 8,82 | 53,07 |
| | 30 | 7,10 | 38,69 |
| | 37 | - | - |

Για το θρεπτικό μέσο άμυλου, οι τιμές των ολικών IPS που παράχθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 0,65-9,72 g/l όπως φαίνεται στον Πίνακα 13 με μεγαλύτερη παραγωγή να παρουσιάζει το είδος *G. adpersum* την 32^η ημέρα ζύμωσης, δεύτερο το είδος *G. resinaceum* 9,13 g/L την 16^η ημέρα ζύμωσης, τρίτο το είδος *G. applanatum* 8,51 g/l την 24^η ημέρα ζύμωσης και τέλος το *G. lucidum* 5,41 g/l την 32^η ημέρα ζύμωσης.

Πίνακας 14: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνη.

| Θρεπτικό υλικό: | | Ημικυτταρίνη | |
|-----------------------|--------|--------------|--------------|
| Είδη <i>Ganoderma</i> | Ημέρες | IPS (g/l) | IPS (% κ.β.) |
| <i>G. adpersum</i> | 16 | 4,31 | 55,81 |
| | 24 | 6,37 | 55,53 |
| | 30 | 9,71 | 52,20 |
| | 37 | 11,93 | 49,50 |
| <i>G. applanatum</i> | 16 | 6,39 | 63,88 |
| | 24 | 7,83 | 57,30 |
| | 30 | 9,37 | 49,35 |
| | 37 | 12,53 | 51,32 |
| <i>G. lucidum</i> | 16 | 2,48 | 65,13 |
| | 24 | 6,35 | 61,78 |
| | 30 | 12,42 | 58,65 |
| | 37 | 12,64 | 54,65 |
| <i>G. resinaceum</i> | 16 | 4,33 | 65,44 |
| | 24 | 9,38 | 63,36 |
| | 30 | 9,16 | 60,77 |
| | 37 | 7,63 | 48,01 |

Για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης, οι τιμές των ολικών IPS που παράχθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 2,48-12,64 g/l όπως φαίνεται στον Πίνακα 14 με μεγαλύτερη παραγωγή να παρουσιάζει το είδος *G. lucidum* 12,64 g/l την 37^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. applanatum* 12,53 g/l την 37^η ημέρα, τρίτο το *G. adpersum* με παραγωγή ολικών IPS 11,93 g/l την 37^η ημέρα και τέλος το *G. resinaceum* 9,38 g/l την 24^η ημέρα.

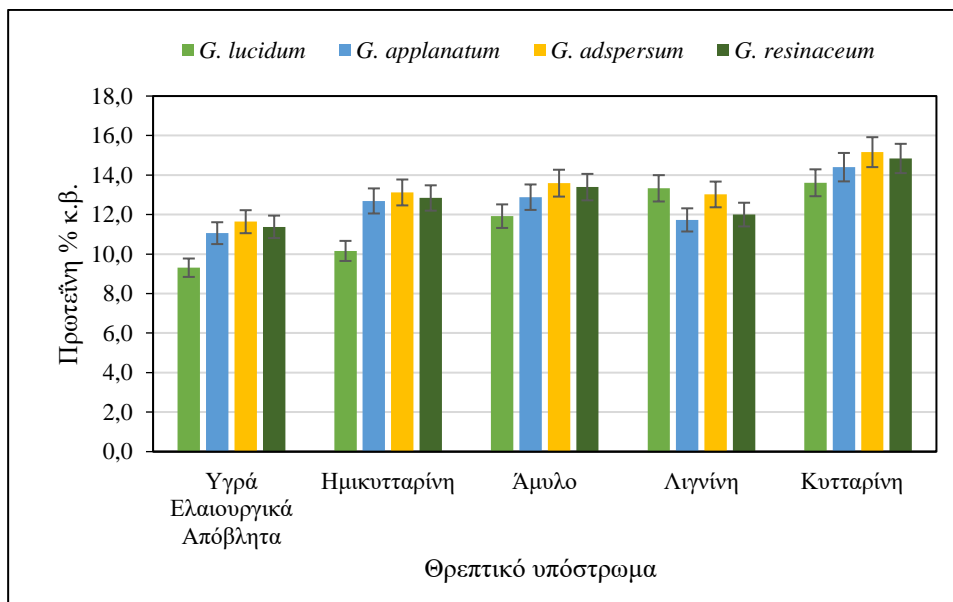
Πίνακας 15: Παραγωγή ολικών πολυσακχαριτών (IPS) (g/l και % κ.β. επί ξηρού) των τεσσάρων ειδών *Ganoderma* για όλα τα θρεπτικά μέσα.

| Θρεπτικό μέσο | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| Είδος | Ημέρα | ΥΕΑ-30 | | Λ-30 | | Κ-30 | | Α-30 | | Η-30 | |
| | | IPS (g/l) | IPS (%κ.β.) | IPS (g/l) | IPS (%κ.β.) | IPS (g/l) | IPS (%κ.β.) | IPS (g/l) | IPS (%κ.β.) | IPS (g/l) | IPS (%κ.β.) |
| <i>G. adpersum</i> | 16 | 5,30 | 48,33 | 7,09 | 58,10 | 4,58 | 44,24 | 9,31 | 58,33 | 4,31 | 55,81 |
| | 24 | 5,18 | 36,12 | 10,84 | 56,33 | 8,84 | 45,56 | 8,37 | 47,85 | 6,37 | 55,53 |
| | 32 | 7,74 | 33,16 | 11,48 | 48,82 | 9,31 | 41,38 | 9,72 | 38,58 | 9,71 | 52,20 |
| | 37 | 9,33 | 34,67 | - | - | - | - | - | - | 11,93 | 49,50 |
| <i>G. applanatum</i> | 16 | 1,07 | 35,12 | 3,14 | 61,99 | 3,75 | 44,11 | 6,95 | 43,03 | 6,39 | 63,88 |
| | 24 | 8,59 | 40,75 | 8,84 | 52,07 | 7,73 | 40,46 | 8,51 | 40,78 | 7,83 | 57,30 |
| | 32 | 6,04 | 25,88 | 12,35 | 51,44 | 7,44 | 37,21 | 7,49 | 28,18 | 9,37 | 49,35 |
| | 37 | 3,94 | 16,05 | - | - | - | - | - | - | 12,53 | 51,32 |
| <i>G. lucidum</i> | 16 | 0,33 | 40,90 | 2,44 | 64,14 | 1,72 | 44,34 | 0,65 | 44,86 | 2,48 | 65,13 |
| | 24 | 2,80 | 40,32 | 4,84 | 41,91 | 4,62 | 43,02 | 4,90 | 44,38 | 6,35 | 61,78 |
| | 32 | 3,27 | 25,39 | 5,04 | 30,20 | 7,35 | 40,90 | 5,41 | 40,96 | 12,42 | 58,65 |
| | 37 | 3,37 | 14,30 | - | - | - | - | - | - | 12,64 | 54,65 |
| <i>G. resinaceum</i> | 16 | 6,08 | 39,99 | 5,61 | 61,60 | 4,97 | 41,86 | 9,13 | 62,47 | 4,33 | 65,44 |
| | 24 | 7,72 | 36,03 | 9,12 | 50,25 | 8,62 | 47,53 | 8,82 | 53,07 | 9,38 | 63,36 |
| | 32 | 8,67 | 33,94 | 10,74 | 47,36 | 9,19 | 44,34 | 7,10 | 38,69 | 9,16 | 60,77 |
| | 37 | 10,05 | 37,92 | - | - | - | - | - | - | 7,63 | 48,01 |

3.9 Παραγωγή Πρωτεϊνών

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 28, η παραγωγή πρωτεϊνών κυμάνθηκε μεταξύ 9,31-15,16% w/w, με την μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεϊνών να εμφανίζεται στο υπόστρωμα της κυτταρίνης για όλα τα μανιτάρια και συγκεκριμένα το *G. adspersum* παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό (15,16% w/w), επομένως το μανιτάρι αυτό φάνηκε το αποδοτικότερο. Δεύτερος εμφανίζεται ο μακρομύκητας *G. resinaceum* με παραγωγή πρωτεϊνών 14,84% w/w, τρίτος ο *G. applanatum* με παραγωγή πρωτεϊνών 14,40% w/w και τέλος ο *G. lucidum* με παραγωγή πρωτεϊνών 13,61% w/w.

Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο του αμύλου παρουσίασε παραγωγή πρωτεϊνών με τιμές 11,92-13,59% w/w εκ των οποίων το μανιτάρι *G. adspersum* παρουσίασε την μεγαλύτερη παραγωγή, τρίτο ακολούθησε το υπόστρωμα της λιγνίνης με παραγωγή πρωτεϊνών 11,73-13,33% w/w και με μεγαλύτερη τιμή να παρουσιάζει το μανιτάρι *G. lucidum*, τέταρτο ακολούθησε το θρεπτικό μέσο της ημικυτταρίνης (10,16-13,12% w/w) εκ των οποίων το μανιτάρι *G. adspersum* παρουσίασε την μεγαλύτερη παραγωγή και τέλος το θρεπτικό μέσο των ΥΕΑ (9,31-11,64% w/w) εκ των οποίων το μανιτάρι *G. adspersum* παρουσίασε την μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεϊνών.



Διάγραμμα 28: Παραγόμενη ποσότητα πρωτεϊνών των 4 μανιταριών κατά την 37^η, ημέρα της υγρής καλλιέργειάς τους.

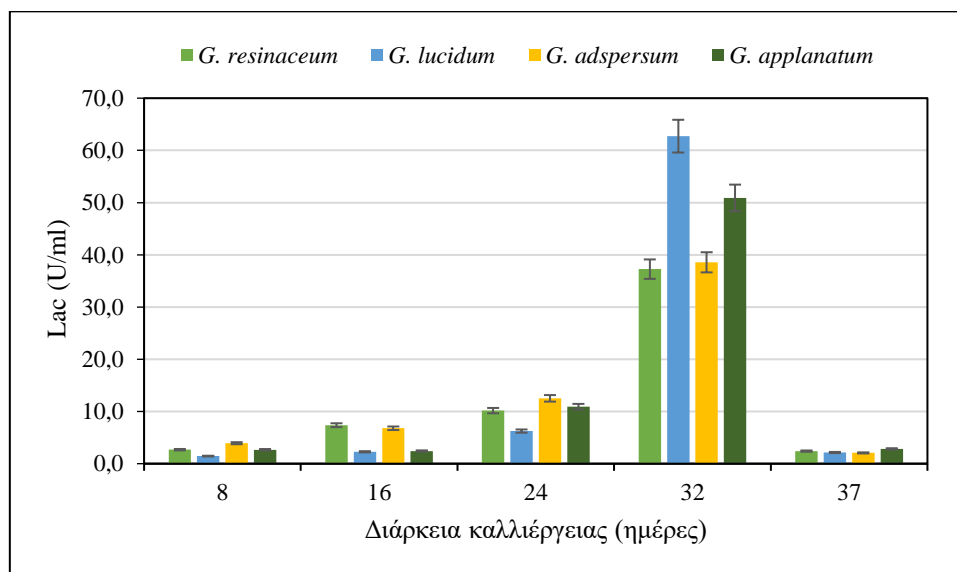
3.10 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων

3.10.1 Προσδιορισμός ενεργότητας λακκάσης

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της λακκάσης σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε είδους με την κάθε τιμή να προκύπτει από τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

3.10.1.1 Ενεργότητα λακκάσης για τα υγρά ελαιουργικά απόβλητα

Για το θρεπτικό μέσο των ΥΕΑ, παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα της λακκάσης (1U= Unit / ml) ήταν χαμηλή και για τα 4 μανιτάρια στην 1η μέτρηση (8^η ημέρα) σύμφωνα με το Διάγραμμα 29. Από την 16^η ημέρα η συγκέντρωση της λακκάσης, εμφάνισε μία σταδιακή αύξηση και την 32^η ημέρα εμφάνισε την μέγιστη ενεργότητα και στα 4 μανιτάρια, δηλαδή εμφανίστηκε η μεγαλύτερη λιγνολυτική δράση της, ενώ την 37^η ημέρα μειώθηκε σημαντικά. Την μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε ο μύκητας *G. lucidum* με τιμή 62,72 U/ml, δεύτερος ο *G. applanatum* με τιμή 50,90 U/ml, τρίτος ο *G. adspersum* με τιμή 38,57 U/ml και τέταρτος *G. resinaceum* με τιμή 37,26 U/ml. Την 37^η ημέρα που ήταν το τελευταίο σημείο ζύμωσης, τα 4 μανιτάρια παρουσίασαν απότομη μείωση στις τιμές της ενεργότητας της λακκάσης παρουσιάζοντας πολύ χαμηλές τιμές σχετικά ίσες με τις αρχικές τιμές που παρουσίασαν στο 1^ο σημείο ζύμωσης.

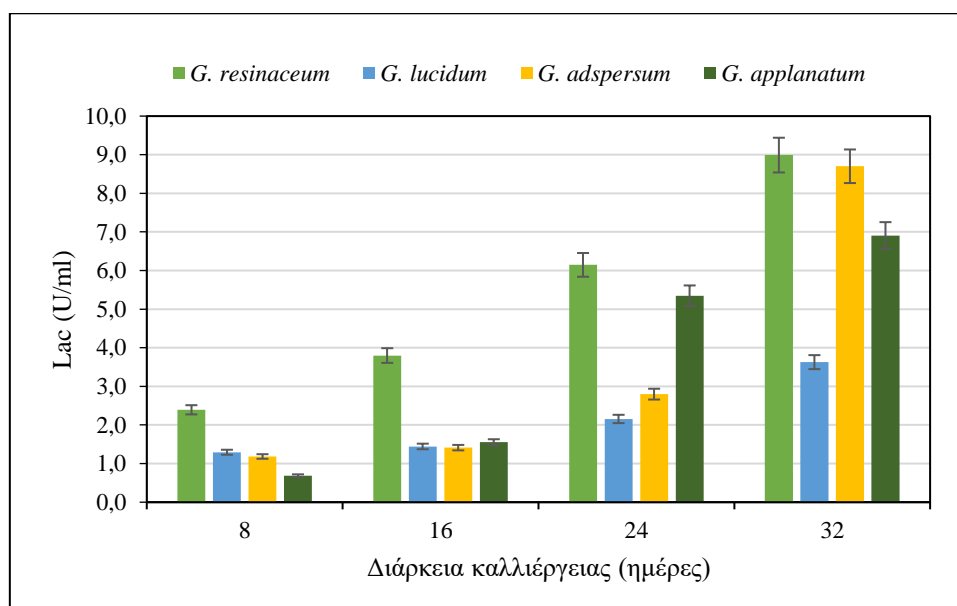


Διάγραμμα 29: Ενεργότητα ενζύμου λακκάσης (U) των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

Συγκρίνοντας την ενεργότητα της λακκάσης με την παραγωγή βιομάζας στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο ΥΕΑ, εύλογα παρατηρείται πως η παραγωγή βιομάζας σχετίζεται με την ενεργότητα της λακκάσης. Πιο αναλυτικά, και τα 4 μανιτάρια παρουσιάζουν αυξητική τάση από την 8^η ημέρα που υπάρχει χαμηλή ανάπτυξη βιομάζας όπως και λακκάσης, την 16^η και 24^η ημέρα αναπτύσσονται αυξητικά η λακκάση όπως και η βιομάζα και την 32^η ημέρα καταγράφεται η μέγιστη τιμή της λακκάσης ενώ η βιομάζα παρουσιάζει τιμές αρκετά κοντά στις μέγιστες τιμές που καταγράφονται την 37^η ημέρα.

3.10.1.2 Ενεργότητα λακκάσης στο υπόστρωμα της λιγνίνης

Για το θρεπτικό μέσο της λιγνίνης, παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα της λακκάσης ήταν χαμηλή και για τα 4 μανιτάρια στην 1^η μέτρηση (8^η ημέρα) σύμφωνα με το Διάγραμμα 30 και συνεχώς αυξανόταν ταυτόχρονα και για τα 4 μανιτάρια μέχρι την 32^η ημέρα που ήταν το τελευταίο σημείο της καλλιέργειας στο οποίο παρουσίασαν την μέγιστη τιμή παραγωγής ενζύμου. Την μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας της λακκάσης, εμφανίζει το είδος *G. resinaceum* με τιμή 8,99 U/ml, δεύτερο το είδος *G. adspersum* με τιμή 8,70 U/ml, τρίτο το είδος *G. applanatum* με τιμή 6,91 U/ml και τέταρτο το είδος *G. lucidum* με τιμή 3,63 U/ml.



Διάγραμμα 30: Ενεργότητα ενζύμου της λακκάσης (U) των τεσσάρων υπό μελέτη ενζύμων στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα λιγνίνης.

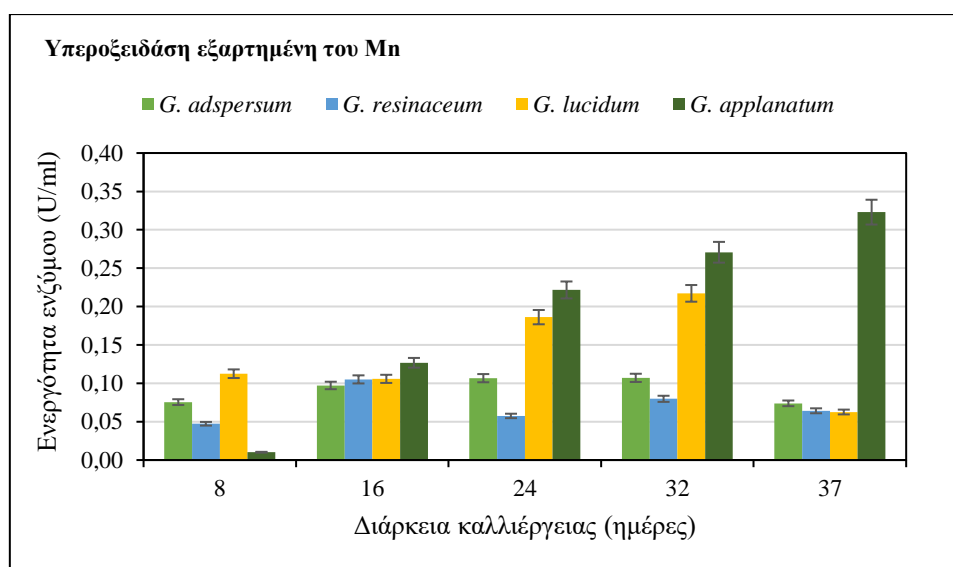
Συγκρίνοντας την ενεργότητα της λακκάσης με την παραγωγή βιομάζας στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο λιγνίνης, εύλογα παρατηρείται πως η παραγωγή βιομάζας σχετίζεται με την ενεργότητα της λακκάσης. Πιο αναλυτικά, και τα 4 μανιτάρια

παρουσιάζουν αυξητική τάση από την 8^η ημέρα μέχρι την 32^η ημέρα παρουσιάζοντας την μέγιστη τιμή στο τελευταίο σημείο ζύμωσης (32^η ημέρα). Μεταβολές στις ενεργότητες παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας παρουσιάζοντας την μέγιστη τιμή και για τα 2 θρεπτικά υποστρώματα την 32^η ημέρα καλλιέργειας. Η λακκάση αρχικά παρουσίασε και για τα 2 θρεπτικά υποστρώματα χαμηλή ενεργότητα και αυξάνεται αρκετά από την 24^η και 32^η. εβδομάδα και στα 2 υποστρώματα (2,16 – 62,72 U/ml) παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ενεργότητα στο θρεπτικό μέσο των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

3.10.2 Προσδιορισμός ενζύμου υπεροξειδάσης εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου

3.10.2.1 Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδάσης εξαρτημένης του μαγγανίου

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της υπεροξειδάσης του μαγγανίου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε είδους με την κάθε τιμή να προκύπτει από τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

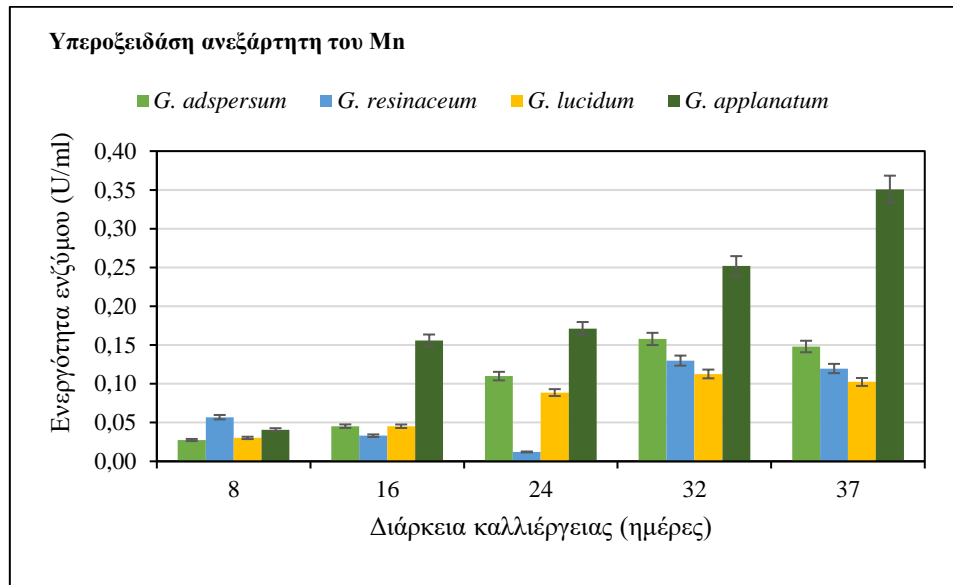


Διάγραμμα 31: Ενεργότητα ενζύμου Υπεροξειδάσης εξαρτημένης του μαγγανίου των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα YEA.

Από το Διάγραμμα 31 διαπιστώνεται μια αυξητική τάση στις τιμές ενεργότητας της υπεροξειδάσης του μαγγανίου μέχρι την 32^η ημέρα ζύμωσης ενώ την 37^η ημέρα μειώθηκαν

οι τιμές στα τρία μανιτάρια. Την υψηλότερη ενεργότητα MnP παρουσίασε το είδος *G. applanatum* με τιμή 0,32 U/ml την 37^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. lucidum* με τιμή 0,22 U/ml την 32^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. adpersum* 0,11 U/ml την 32^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. resinaceum* 0,10 U/ml την 16^η ημέρα.

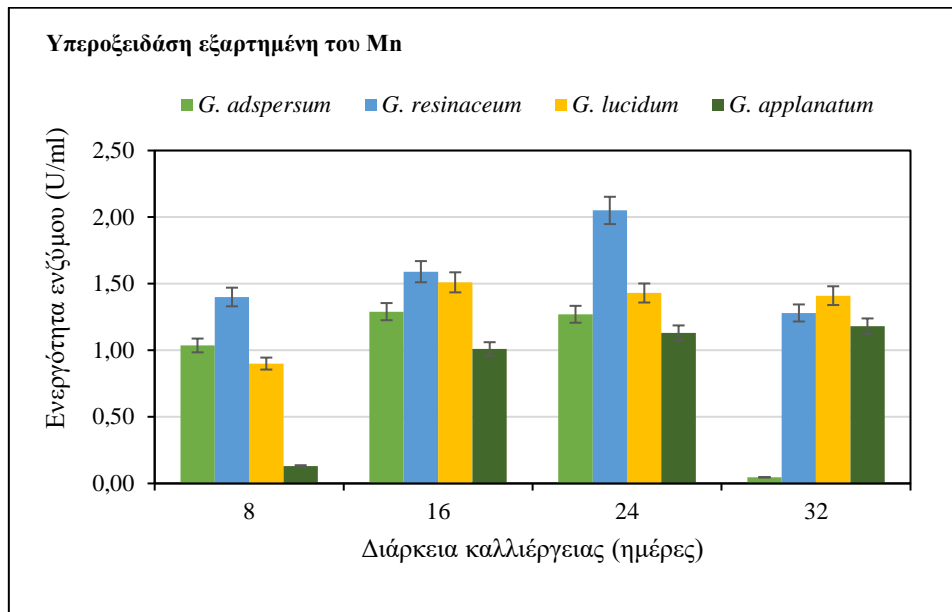
3.10.2.2 Μέτρηση ενεργότητας υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του μαγγανίου



Διάγραμμα 32: Ενεργότητα ενζύμου Υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης του μαγγανίου των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα YEA.

Για την ενεργότητα υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης του Mn, στο υπόστρωμα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, παρατηρείται μια αυξητική τάση με τον χρόνο καλλιέργειας. Η μέγιστη τιμή παρουσιάστηκε στο είδος *G. applanatum* 0,35 U/ml την 37^η ημέρα, δεύτερο το *G. adpersum* 0,16 U/ml την 32^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. resinaceum* 0,13 U/ml την 32^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. lucidum* με τιμή 0,11 U/ml την 32^η ημέρα.

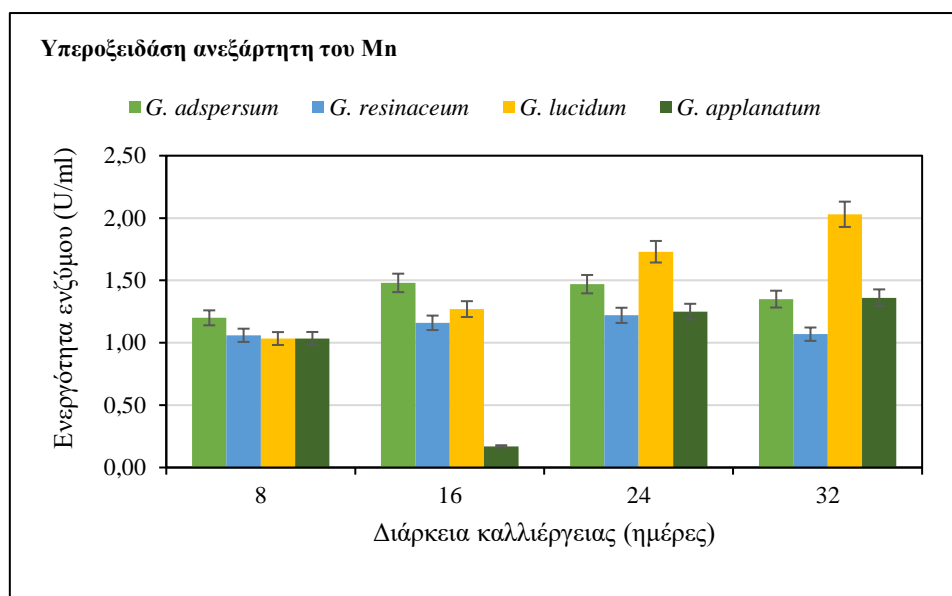
3.10.2.3 Υπεροξειδάση εξαρτημένη του μαγγανίου στο υπόστρωμα λιγνίνης



Διάγραμμα 33: Ενεργότητα ενζύμου Υπεροξειδάσης εξαρτημένης του μαγγανίου των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα λιγνίνης.

Στο υπόστρωμα λιγνίνης, το είδος *G. resinaceum* εμφάνισε την μεγαλύτερη ενεργότητα εξαρτημένη της υπεροξειδάσης με τιμή 2,05 U/ml την 24^η ημέρα, παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη τιμή σε σύγκριση με τα άλλα 3 μανιτάρια εκ των οποίων ακολούθησε δεύτερο το *G. lucidum* με τιμή 1,51 U/ml την 16^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. adspersum* 1,29 U/ml 16^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. applanatum* 1,18 U/ml την 32^η ημέρα.

3.10.2.4 Υπεροξειδάση μη εξαρτημένης του μαγγανίου

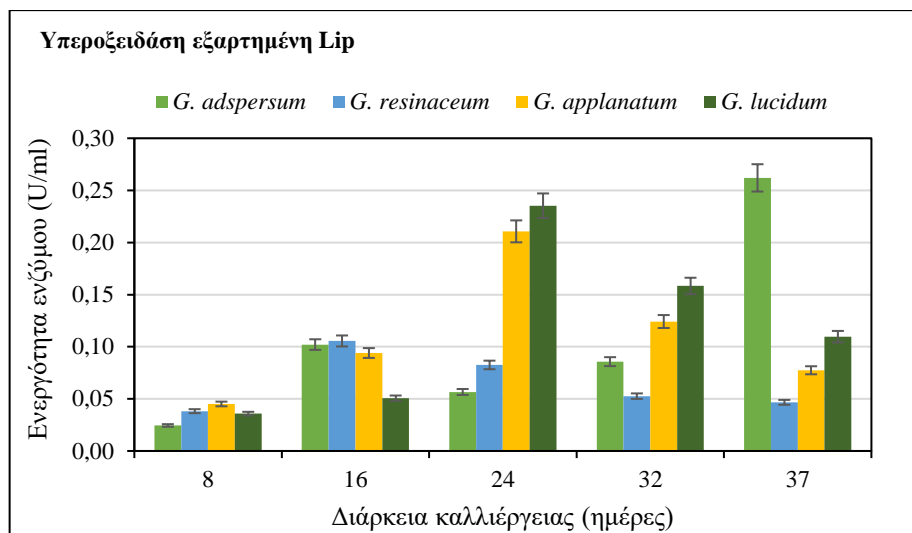


Διάγραμμα 34: Ενεργότητα ενζύμου Υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης του μαγγανίου των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα λιγνίνης.

Στο υπόστρωμα λιγνίνης, η μέγιστη τιμή της ενεργότητας της ανεξάρτητης υπεροξειδάσης του μαγγανίου, εμφανίστηκε στο είδος *G. lucidum* 2,03 U/ml την 32^η ημέρα. Ακολούθησε το είδος *G. adspersum* με τιμή 1,48 U/ml την 16^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. applanatum* 1,36 U/ml την 32^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. resinaceum* με τιμή 1,22 U/ml την 24^η ημέρα.

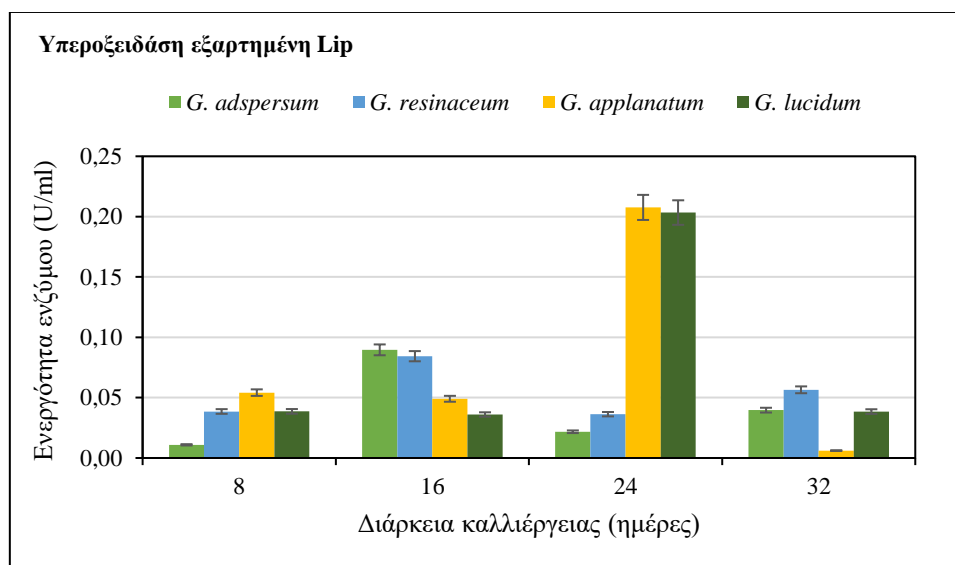
3.10.3 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας υπεροξειδάσης της λιγνίνης

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της υπεροξειδάσης της λιγνίνης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του κάθε είδους με την κάθε τιμή να προκύπτει από τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων.



Διάγραμμα 35: Ενεργότητα ενζύμου Υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης της λιγνίνης των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα YEA.

Στο θρεπτικό μέσο των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, η υψηλότερη ενεργότητα LiP παρουσιάστηκε στο είδος *G. adpersum* με τιμή 0,26 U/ml την 37η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. lucidum* με τιμή 0,24 U/ml την 24η ημέρα, τρίτο το είδος *G. applanatum* με τιμή 0,21 U/ml την 24η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. resinaceum* με τιμή 0,11 U/ml την 16η ημέρα.

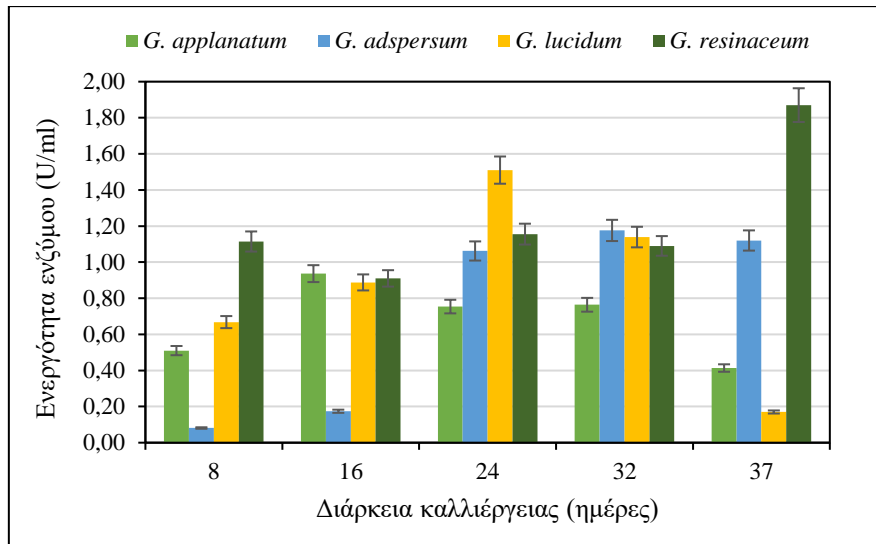


Διάγραμμα 36: Ενεργότητα ενζύμου Υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης της λιγνίνης των τεσσάρων υπό μελέτη μανιταριών στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα λιγνίνης.

Στο θρεπτικό μέσο λιγνίνης, υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα υπεροξειδάσης της λιγνίνης εμφάνισε το είδος *G. applanatum* 0,21 U/ml την 24^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G.*

lucidum με τιμή 0,20 U/ml την 24^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. adpersum* με τιμή 0,09 την 16^η ημέρα U/ml και τέταρτο το είδος *G. resinaceum* με τιμή 0,08 U/ml την 16^η ημέρα.

3.10.4 Παραγωγή ενζύμου Ημικυτταρινάσης

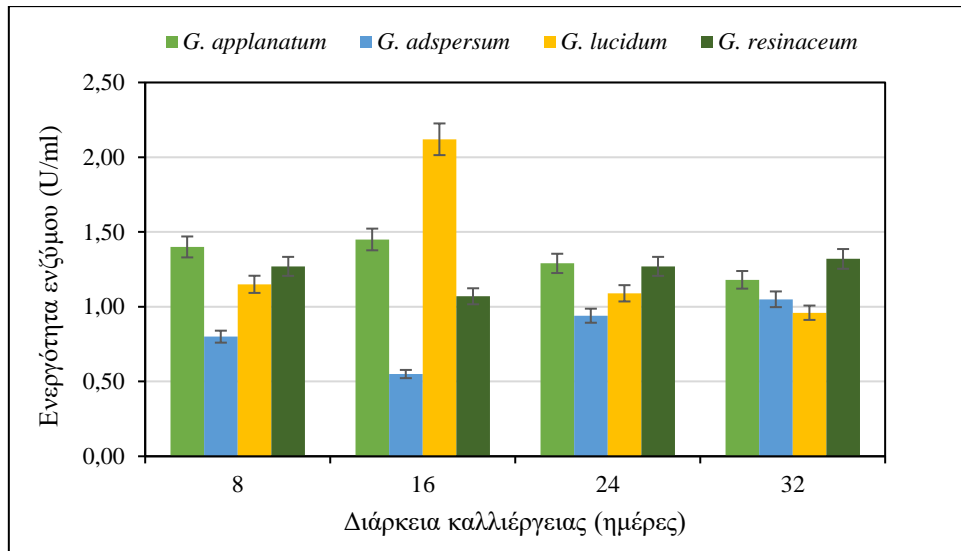


Διάγραμμα 37: Παραγωγή ενζύμου ξυλανάσης στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα ημικυτταρίνης.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 37, στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης, η μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ημικυτταρινάσης, καταγράφηκε στο είδος *G. resinaceum* με τιμή 1,87 U/ml την 37^η ημέρα. Δεύτερο ακολούθησε το είδος *G. lucidum* 1,51 U/ml την 24^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. adpersum* με τιμή 1,18 U/ml την 32^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. applanatum* με τιμή 0,94 U/ml την 16^η ημέρα.

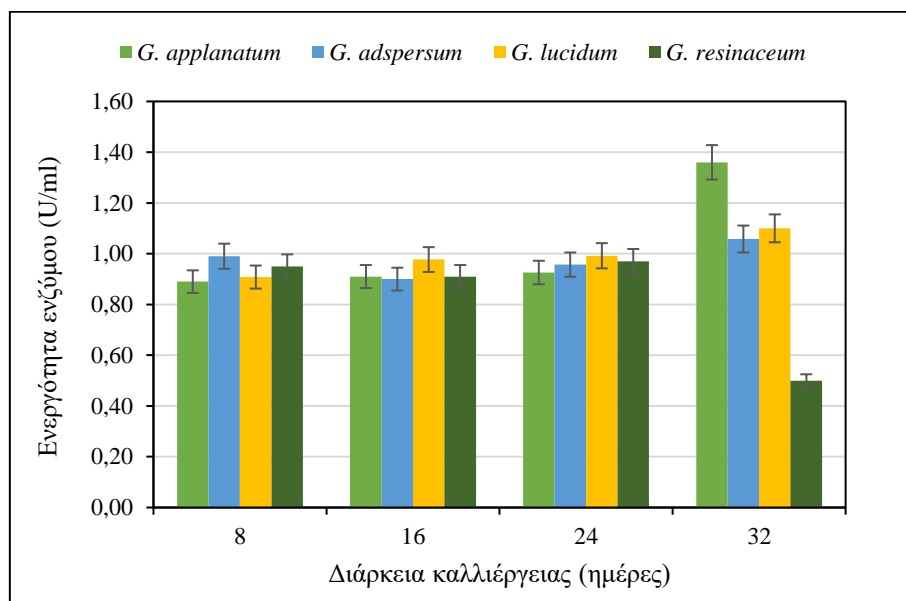
3.10.5 Παραγωγή ενζύμου Αμυλάσης

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 38, στο υπόστρωμα αμύλου, η μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου αμυλάσης, καταγράφηκε στο είδος *G. lucidum* 2,12 U/ml την 16^η ημέρα, δεύτερο ακολούθησε το είδος *G. applanatum* με τιμή 1,45 U/ml την 16^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. resinaceum* με τιμή 1,32 U/ml την 32^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. adpersum* με τιμή 1,05 U/ml την 32^η ημέρα.



Διάγραμμα 38: Παραγωγή ενζύμου αμυλάσης στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα αμύλου.

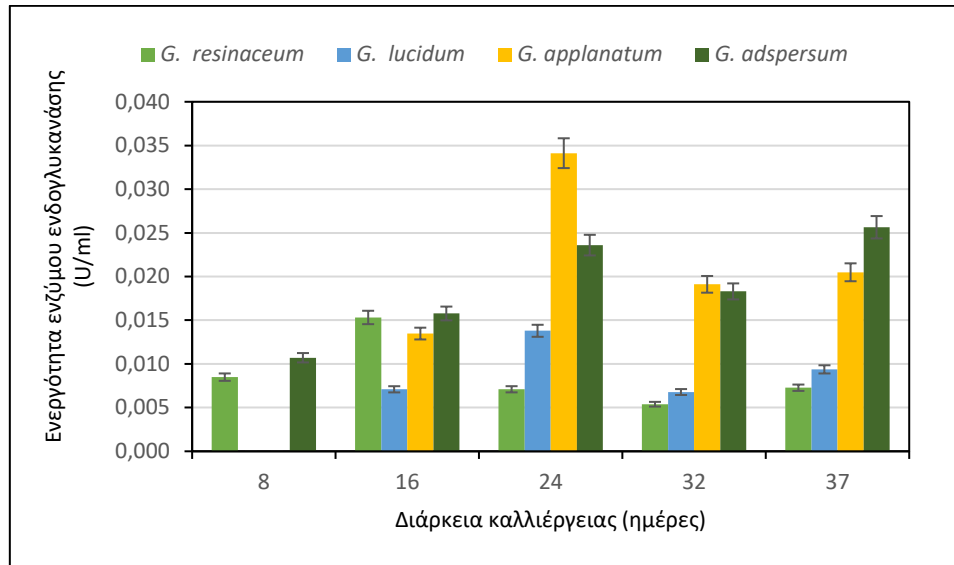
3.10.6 Παραγωγή ολικών κυτταρινασών



Διάγραμμα 39: Παραγωγή ενζύμου κυτταρινάσης στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό υπόστρωμα κυτταρίνης.

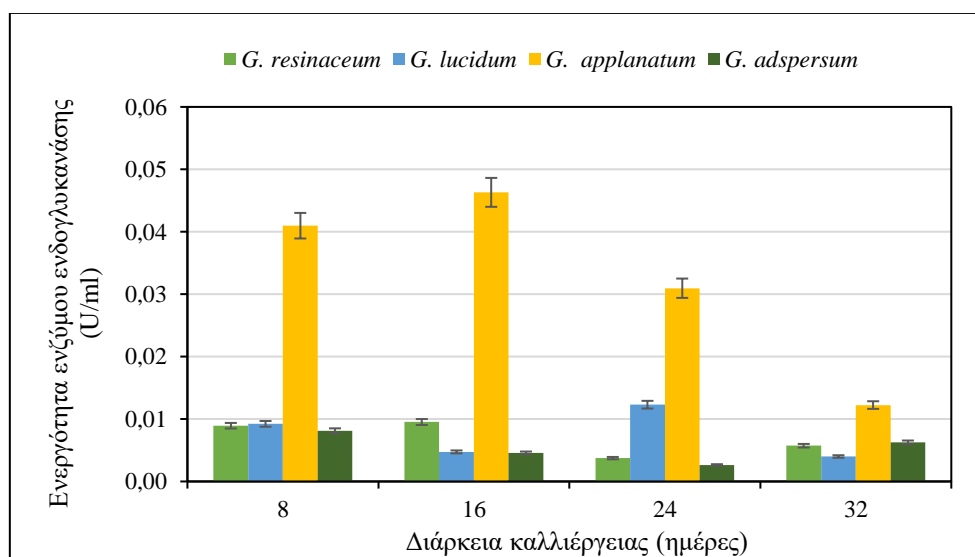
Στο υπόστρωμα κυτταρίνης, η μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου κυτταρινάσης, καταγράφηκε στο είδος *G. applanatum* 1,36 U/ml την 32^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. lucidum* 1,10 U/ml την 32^η ημέρα ζύμωσης, τρίτο το είδος *G. adpersum* με τιμή 1,06 U/ml την 32^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. resinaceum* 0,97 U/ml την 24^η ημέρα.

3.10.7 Παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης



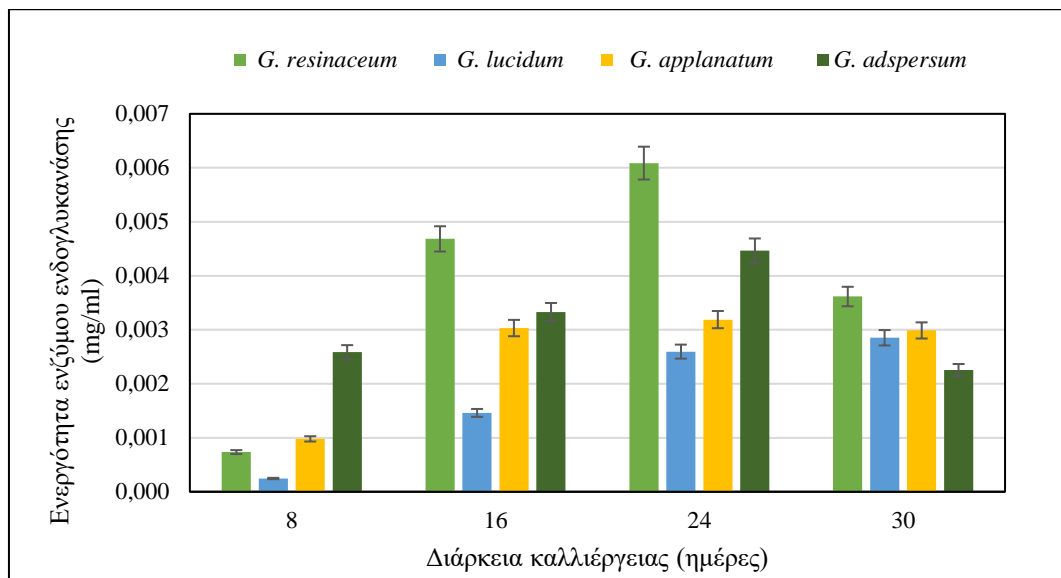
Διάγραμμα 40: Ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης.

Στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης ήταν πολύ χαμηλή, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 40. Η μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, καταγράφηκε στο είδος *G. applanatum* 0,034 U/ml την 24^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. adspersum* με τιμή 0,026 U/ml την 37^η ημέρα, τρίτο το είδος *G. resinaceum* 0,015 U/ml την 16^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. lucidum* 0,014 U/ml την 24^η ημέρα ζύμωσης.



Διάγραμμα 41: Ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό μέσο αμύλου.

Στο υπόστρωμα αμύλου, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης ήταν πολύ χαμηλή, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 41. Η μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, καταγράφηκε στο είδος *G. applanatum* 0,046 U/ml την 16^η ημέρα, δεύτερο το είδος *G. lucidum* 0,012 U/ml την 24^η ημέρα ζύμωσης, τρίτο το είδος *G. resinaceum* 0,01 U/ml την 16^η ημέρα και τέταρτο το είδος *G. adpersum* με τιμή 0,008 U/ml την 8^η ημέρα.



Διάγραμμα 42: Ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης στα 5 σημεία δειγματοληψίας για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης.

Στο υπόστρωμα κυτταρίνης, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης ήταν πολύ χαμηλή, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 42. Η μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, καταγράφηκε στο είδος *G. resinaceum* 0,0061 U/ml την 24^η ημέρα, δεύτερο στο είδος *G. adpersum* με τιμή 0,0045 U/ml την 24^η ημέρα, τρίτο στο είδος *G. applanatum* 0,0032 U/ml την 24^η ημέρα και τέταρτο στο είδος *G. lucidum* 0,0029 U/ml την 30^η ημέρα ζύμωσης.

3.11 Ενεργός οξύτητα (pH) στα υγρά θρεπτικά μέσα

Στον Πίνακα 17 που παρατίθεται παρακάτω, παρουσιάζεται η πορεία της ενεργούς οξύτητας (pH), κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των τεσσάρων ειδών *G. adpersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum* στα πέντε διαφορετικά θρεπτικά μέσα (YEA-30, Λ-30, Κ-30, Α-30, Η-30) με πηγή άνθρακα την γλυκόζη για τα θρεπτικά μέσα υγρών ελαιουργικών αποβλήτων και λιγνίνης, με πηγή άνθρακα την ξυλόζη για το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνη, με πηγή άνθρακα την κυτταρίνη για το θρεπτικό μέσο κυτταρίνη και με πηγή

άνθρακα το άμυλο για το θρεπτικό μέσο αμύλου.

Πίνακας 16: Πορεία ενεργούς οξύτητας (pH) των τεσσάρων ειδών του μύκητα *Ganoderma* στα πέντε διαφορετικά θρεπτικά μέσα.

| Μύκητες | Ημέρα δειγματοληψίας | Θρεπτικό μέσο | | | | |
|----------------------|-------------------------|---------------|------|------|------|------|
| | | ΥΕΑ-30 | Λ-30 | Κ-30 | Α-30 | Η-30 |
| <i>G. adspersum</i> | 0 | 5,51 | 5,73 | 5,94 | 5,63 | 5,94 |
| | 8 | 4,88 | 5,31 | 5,63 | 4,45 | 5,59 |
| | 16 | 4,59 | 4,72 | 4,83 | 4,74 | 5,37 |
| | 24 | 4,51 | 4,53 | 4,64 | 4,54 | 4,78 |
| | 32 | 4,44 | 4,46 | 4,49 | 4,42 | 4,52 |
| | 37 | 4,36 | - | - | - | 4,45 |
| <i>G. applanatum</i> | 0 | 5,51 | 5,73 | 5,94 | 5,63 | 5,94 |
| | 8 | 5,41 | 5,42 | 5,86 | 5,39 | 5,81 |
| | 16 | 4,90 | 5,17 | 4,77 | 5,14 | 5,52 |
| | 24 | 4,84 | 4,73 | 4,64 | 4,30 | 5,36 |
| | 32 | 4,61 | 4,38 | 4,35 | 4,24 | 4,55 |
| | 37 | 4,36 | - | - | - | 4,48 |
| <i>G. lucidum</i> | 0 | 5,51 | 5,73 | 5,94 | 5,63 | 5,94 |
| | 8 | 5,34 | 5,53 | 5,62 | 5,44 | 5,72 |
| | 16 | 5,21 | 5,43 | 4,80 | 4,79 | 5,49 |
| | 24 | 5,08 | 5,01 | 4,61 | 4,65 | 4,39 |
| | 32 | 4,87 | 4,36 | 4,40 | 4,35 | 4,26 |
| | 37 | 4,76 | - | - | - | 4,22 |
| <i>G. resinaceum</i> | 0 | 5,51 | 5,73 | 5,94 | 5,63 | 5,94 |
| | 8 | 5,07 | 5,47 | 4,84 | 4,74 | 5,32 |
| | 16 | 4,88 | 4,37 | 4,46 | 4,42 | 5,21 |
| | 24 | 4,64 | 4,35 | 4,27 | 4,28 | 5,13 |
| | 32 | 4,41 | 4,26 | 4,23 | 4,25 | 4,77 |
| | 37 | 4,26 | - | - | - | 4,64 |

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω Πίνακα 17 σχετικά με τα δύο θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα την γλυκόζη (ΥΕΑ και λιγνίνη), η αρχική τιμή pH (στους μάρτυρες) ήταν 5,51 και 5,73 αντίστοιχα και οι τελικές τιμές pH κυμάνθηκαν από 4,26 – 4,76 για τα ΥΕΑ και 4,26 – 4,46 για το θρεπτικό υπόστρωμα λιγνίνης. Επιπλέον, στο θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την ξυλόζη η καλλιέργεια ξεκίνησε με τιμή pH 5,94 (στους μάρτυρες) και οι τελικές τιμές κυμάνθηκαν από 4,22 – 4,64. Για το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα την

κυτταρίνη, η καλλιέργεια ξεκίνησε με τιμή pH 5,94 (στους μάρτυρες) και οι τελικές τιμές κυμάνθηκαν από 4,23 – 4,49. Τέλος, όσον αφορά το θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα το άμυλο η καλλιέργεια ξεκίνησε με τιμή pH 5,63 (στους μάρτυρες) και οι τελικές τιμές κυμάνθηκαν από 4,24 – 4,74.

3 Συζήτηση

Η ευεργετική επίδραση που ασκούν οι βασιδιομύκητες γένους *Ganoderma* καθώς και τα προϊόντα που παράγουν, αποτελούν ερευνητικό ενδιαφέρον στο κλάδο της Βιοτεχνολογίας, για την ένταξή τους στο εμπόριο ως προϊόντα κατανάλωσης (τρόφιμα, ροφήματα, φάρμακα).

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν οι φαρμακευτικοί βασιδιομύκητες του γένους *Ganoderma* για τα μανιτάρια: *G. resinaceum*, *G. lucidum*, *G. adspersum*, *G. arplanatum* σε πέντε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με ΥΕΑ, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και άμυλο, τα οποία αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες, υπό στατικές συνθήκες με διαφορετική πηγή άνθρακα και λόγο C/N =20.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιοποίηση των πέντε παραπροϊόντων για την ανάπτυξη του βασιδιομύκητα *Ganoderma* με στόχο την καταγραφή ενεργότητας ορισμένων λιγνινολυτικών ενζύμων και ενζύμων υδρόλυσης. Επιπλέον μελετήθηκε η παραγωγή μυκηλιακής μάζας, η παραγωγή IPS, ολικών φαινολικών ενώσεων, πρωτεϊνών, η κατανάλωση σακχάρων και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων καθώς και η εκτίμηση της δυνατότητας του μελετώμενου είδους να αποχρωματίσει και να μειώσει το φαινολικό φορτίο (αποφαινόλωση) του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου και της λιγνίνης.

Ως κύρια πηγή άνθρακα επιλέχθηκε η γλυκόζη για τα υποστρώματα των ΥΕΑ και της λιγνίνης διότι ευνοεί την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων, λόγω της αποτελεσματικής ενσωμάτωσης της μέσω της αναπνευστικής οδού έπειτα από φωσφορυλίωση (Paraspyridi et al., 2011). Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρίνη, το άμυλο και η ξυλόζη για το υπόστρωμα ημικυτταρίνης. Εκτός από την πηγή άνθρακα και το λόγο C/N=20, ο οποίος ευνοεί την ανάπτυξη των συγκεκριμένων μυκήτων (Fraga et al., 2014), σημασία έχει και η ενεργός οξύτητα του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης για το μυκήλιο (Yang και Liao, 1998). Το αρχικό pH στα υποστρώματα καλλιέργειας μετά την αποστείρωση ήταν 5,51–5,94 για τα τέσσερα μανιτάρια. Οι συνολικές τιμές pH των υποστρωμάτων εμφανίστηκαν ελαφρώς όξινες (4,23–5,94) παρουσιάζοντας μείωση κατά την ανάπτυξη των μυκήτων σε όλα τα θρεπτικά μέσα. Σε μελέτη έχει καταγραφεί ότι το είδος *G. lucidum* φάνηκε ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε pH 5,0–9,0 με βέλτιστο για μυκηλιακή ανάπτυξη την τιμή 5,0 (Jayasinghe, 2008; Magday et al., 2014). Ο καθορισμός της τιμής του pH εξαρτάται από τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, ενώ έχει προταθεί πως οι χαμηλές τιμές αρχικού pH εμποδίζουν τις βακτηριακές επιμολύνσεις, ευνοώντας τη κυρίως καλλιέργεια (Yang και Liao, 1998). Οι Lee et al. (1998) απέδειξαν ότι το pH επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη. Μια τυπική υγρή καλλιέργεια του

βασιδιομύκητα *Ganoderma* σημειώνει συνήθως πτώση pH (Kim et al., 2002; Simonic et al., 2008) λόγω της παραγωγής κυρίως των γανοδερικών και λουσιδενικών οξέων που είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και εκκρίνονται κυρίως τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας (Chin, 2000; Kim et al., 2002).

4.1 Κινητική παραγωγής βιομάζας, κατανάλωσης σακχάρων, συγκέντρωσης ενδοπολυσακχαριτών των τεσσάρων μανιταριών *Ganoderma*

4.1.1 Παραγωγή βιομάζας

Όσον αφορά στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας των μακρομυκήτων, αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξης που βρίσκεται ο μακρομύκητας, όπως το pH του θρεπτικού μέσου, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ανάπτυξής τους, τον αερισμό και την ανάδευση (Paragianni, 2004). Ωστόσο, το σημαντικότερο ρόλο στον τρόπο εκμετάλλευσης του υποστρώματος και στην αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων, παρουσιάζει το είδος του μικροοργανισμού, το είδος του υποστρώματος και κυρίως η διαθέσιμη πηγή άνθρακα και αζώτου (Φιλιπούσης, 2003, Okhuoya et al., 2000). 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 et al., 2003; Lee et al., 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 et al., 2002; Gern et al., 2008; Fernandes et al., 2001; Komura et al., 2010; Kim et al., 2010) ενώ ως πηγή αζώτου προτιμώνται συνήθως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης (Chang και Steinkraus, 1982; Higashiyama et al., 2002; Fernandes et al., 2011; Meng et al., 2010; Feng et al., 2010; Komura et al., 2011; Kim et al., 2010). Σημειώνεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η ποσότητα στην οποία προστίθεται η πηγή αζώτου στο μέσο καλλιέργειας, καθώς υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν μείωση ως και ανασχεση της μυκηλιακής αύξησης (Torres-López και Hepperly, 1987; Chang-Ho, 1980). Όπως προαναφέρθηκε, στη παρούσα μελέτη ως κύρια πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη (υποστρώματα YEA-30 και Λ-30), η ημικυτταρίνη (υπόστρωμα Η-30), το άμυλο (υπόστρωμα Α-30) και η κυτταρίνη (Κ-30) και ως κύρια πηγή αζώτου η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα μελετώμενα τρία μανιτάρια *G.*

adpersum, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, εμφάνισαν την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας στο υπόστρωμα ΥΕΑ, ενώ το είδος *G. applanatum*, εμφάνισε την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας στο υπόστρωμα αμύλου. Όλα τα μανιτάρια παρουσιάζουν τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας στο τελευταίο σημείο ζύμωσης για το κάθε θρεπτικό υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, το είδος *G. adpersum*, που παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας, στο θρεπτικό υπόστρωμα των ΥΕΑ με τιμή 26,92 g/l, $Y_{X/S}$: 0,84 g/g, δεύτερο το είδος *G. applanatum* στο θρεπτικό υπόστρωμα του αμύλου με τιμή 26,58 g/l, $Y_{X/S}$: 0,98 g/g. Στη συνέχεια, τρίτη μεγαλύτερη τιμή παραγωγής βιομάζας, παρουσίασε το είδος *G. resinaceum* στο υπόστρωμα των ΥΕΑ με τιμή 26,49 g/l, $Y_{X/S}$: 0,84 g/g και τέλος ακολουθεί το είδος *G. lucidum* στο θρεπτικό μέσο ΥΕΑ με τιμή 23,53 g/l, $Y_{X/S}$: 0,74 g/g.

Οι συγκεκριμένες μέγιστες τιμές πιθανώς οφείλονται στην σύσταση του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου το οποίο εκτός από ιδιαίτερα τοξικό λόγω της υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινολών, περιέχει επίσης και διάφορα θρεπτικά στοιχεία (μακροστοιχεία, ιχνοστοιχεία), τα οποία προάγουν την κυτταρική αύξηση και παρομοίως το ίδιο ισχύει για το υπόστρωμα του αμύλου (Mulinacci et al., 2001; Roig et al., 2006; Mekki et al., 2006). Ήδη από βιβλιογραφικά δεδομένα έχει καταγραφεί ότι αρκετά αποδοτική ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν γλυκόζη, καθώς μεταβολίζεται εύκολα από τους ξυλοσηπτικούς μύκητες λευκής σήψης *G. lucidum*, *G. applanatum*, *A. Auricula-judae*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* (Hsieh et al., 2006; Kim et al., 2006; Gern et al., 2008; Elisashvili et al., 2009; Feng et al., 2010), ενώ η ξυλόζη δείχνει να ευνοεί την αύξηση των μυκήτων του γένους *Pleurotus* (Papaspyridi κ.α., 2011). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι με πηγή άνθρακα την γλυκόζη οι μέγιστες τιμές που επιτεύχθηκαν από το είδος *G. applanatum* σε φιάλες βυθού και καλλιέργειες βιοαντιδραστήρα κυμαίνονταν μεταξύ 7-28 g/l (Lee et al. 2007; Diamantopoulou et al. 2012).

Σύμφωνα με την μελέτη των Garcha et al. (1979) και Diamantopoulou et al. 2012, για τον βασιδιομύκητα *V. voluacea* σε ζυμώσεις βυθού με χρήση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου κατέγραψαν τις καλύτερες επιδόσεις να λαμβάνονται για τα σάκχαρα γλυκόζη, άμυλο, φρουκτόζη και δευτερευόντως στη ξυλόζη. Γενικά, τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες που υποδεικνύουν τη γλυκόζη και το άμυλο ως τα σάκχαρα που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη του μυκηλίου (Tseng, 1974; Chakravarty και Mallick, 1979; Ofosu-Asiedu κ.α., 1984, Volz, 1972). Αν και η γλυκόζη θεωρείται η πιο αξιοποιήσιμη μορφή του άνθρακα για το μεταβολισμό πολλών μανιταριών, το άμυλο (πολυμερές της γλυκόζης) βρέθηκε να είναι εξίσου ικανοποιητικό υπόστρωμα για την

ανάπτυξη του μύκητα.

Από τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας συμπεραίνεται ότι όλοι οι μακρομύκητες *Ganoderma* που δοκιμάστηκαν παρήγαγαν σημαντική ποσότητα βιομάζας. Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των μακρομυκήτων όσον αφορά στις τιμές της παραγόμενης βιομάζας θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορές μεταξύ των μακρομυκήτων ως προς τη φυσιολογία θρέψης τους, καθώς παρουσιάζουν διαφορές στα ενζυμικά συστήματα που διαθέτουν για εκμετάλλευση των υποστρωμάτων προς παραγωγή βιομάζας, καθώς και στην διαφορετική ταχύτητα αύξησής τους στα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας.

Συγκρίνοντας τις βιβλιογραφικές αναφορές με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, επιβεβαιώνεται ο ισχυρισμός ότι η παραγόμενη βιομάζα ήταν αρκετά σημαντική. Επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις ξηράς μυκηλιακής μάζας ($X \geq 13$ g/l), ενίοτε ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν σάκχαρο ήταν αρκετά ικανοποιητικός, καθώς παρουσίασε αυξημένες τιμές γεγονός που υποδεικνύει πολύ καλή εκμετάλλευση του υποστρώματος προς παραγωγή βιομάζας. Για το θρεπτικό υπόστρωμα των ΥΕΑ με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, στα τέσσερα μανιτάρια κυμάνθηκε από 0,74–0,84 g/g. Για το θρεπτικό υπόστρωμα της λιγνίνης με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στα τέσσερα μανιτάρια κυμάνθηκε από 0,80–0,92 g/g. Για το θρεπτικό υπόστρωμα της ημικυτταρίνης με πηγή άνθρακα τη ξυλόζη στα τέσσερα μανιτάρια κυμάνθηκε από 0,92–0,99 g/g. Για το θρεπτικό υπόστρωμα της κυτταρίνης με πηγή άνθρακα τη κυτταρίνη στα τέσσερα μανιτάρια κυμάνθηκε από 0,87–0,95 g/g. Για το θρεπτικό υπόστρωμα του αμύλου με πηγή άνθρακα το άμυλο, τα τέσσερα μανιτάρια, κυμάνθηκαν από 0,69– 1,01 g/g. Αρκετές μέγιστες τιμές συντελεστή απόδοσης συνοδεύτηκαν και με τις μεγαλύτερες τιμές παραγόμενης βιομάζας, στο τελευταίο σημείο των ζυμώσεων. Γενικώς, για ένα μεγάλο αριθμό μακρομυκήτων που μελετήθηκαν (π.χ. *Agaricus* sp., *F. velutipes*, *L. edodes*, *Ganoderma* sp., *Pleurotus* sp.), τιμές του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν υπόστρωμα ήταν της τάξης των ~0,3-0,6 g/g (Tang και Zhong, 2002; Tang et. al. 2011).

4.1.2 Κατανάλωση υποστρώματος

Όσον αφορά στην κατανάλωση υποστρώματος, οι μύκητες του γένους *Ganoderma* αξιοποίησαν στο μέγιστο την σακχαρόζη. Πιο αναλυτικά, για τα πέντε θρεπτικά υποστρώματα, κατανάλωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό της αρχικής γλυκόζης στο τέλος της ζύμωσης (32^η ή 37^η ημέρα). Μετά την 8^η ημέρα παρουσίασαν και τα 4 μανιτάρια ταχεία κατανάλωση της γλυκόζης με μία μικρή διαφορά να παρουσιάζει το είδος *G. lucidum*

χαμηλή κατανάλωση γλυκόζης το οποίο παρατηρήθηκε σε όλα τα θρεπτικά. Το είδος *G. lucidum* συνοδεύτηκε από μικρότερη παραγωγή βιομάζας, πιθανόν κατά την ανάπτυξη του χρησιμοποίησε μέρος του άνθρακα της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης του θρεπτικού μέσου. Από τα πέντε θρεπτικά μέσα, μεγαλύτερη κατανάλωση υποστρώματος παρουσίασαν η λιγνίνη με ποσοστό 75,42 – 98,74%, τα ΥΕΑ με ποσοστό 94,59 – 97,96%, το θρεπτικό μέσο του αμύλου 68,04 – 95,92%, το θρεπτικό μέσο της ημικυτταρίνης κατανάλωσε το υπόστρωμα σε ποσοστό 80,35 – 88,96% και τέλος το θρεπτικό μέσο της κυτταρίνης σε ποσοστό 70,49 – 84,67%. Σύμφωνα με Diamantopoulou et al. (2012), σε ζυμώσεις βυθού, υπό στατικές συνθήκες με πηγή άνθρακα την γλυκόζη (30 g/l) και λόγο C/N ~20, οι μέγιστες τιμές κατανάλωσης υποστρώματος για το είδος *M. elata* κυμάνθηκαν από 55–98% ενώ για το είδος *M. esculenta* κυμάνθηκαν από 30–92 %.

4.1.3 Προσδιορισμός παραγόμενων IPS

Για τον προσδιορισμό των παραγόμενων IPS, στα πέντε θρεπτικά υποστρώματα, οι τιμές που παράχθηκαν ήταν αρκετά ικανοποιητικές καθώς κυμάνθηκαν μεταξύ 0,33-12,64 g/l. Παρατηρήθηκε ότι στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη ημικυτταρίνης, παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη παραγωγή IPS 2,48-12,64 g/l, έπειτα στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη λιγνίνης 2,44-12,35 g/l, τρίτο στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη ΥΕΑ 0,33-10,05 g/l, τέταρτο στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη αμύλου 0,65-9,72 g/l και τέλος στα θρεπτικά μέσα που είχε γίνει προσθήκη κυτταρίνης 1,72-9,31 g/l. Στα περισσότερα θρεπτικά μέσα, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή ολικών IPS παρουσίασε αυξητική πορεία, παρουσιάζοντας την μέγιστη παραγωγή στο τελευταίο ή πριν το τελευταίο σημείο δειγματοληψίας. Όσο αναπτυσσόταν η μυκηλιακή μάζα, η συγκέντρωση των παραγόμενων IPS σε απόλυτη τιμή αυξανόταν.

Όσον αφορά στο ποσοστό IPS επί ξηρού βάρους, όλα τα είδη *Ganoderma* εκτός του είδους *G. adspersum* εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά κατά την καλλιέργειά τους στο θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης που περιείχαν πηγή άνθρακα την ξυλόζη με το είδος *G. resinaceum* να παρουσιάζει ποσοστό 65,44%, το είδος *G. lucidum* με ποσοστό 65,13% και το είδος *G. applanatum* 63,88%. Το είδος *G. adspersum* (58,33%) εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό IPS στο θρεπτικό υπόστρωμα του αμύλου. Τα περισσότερα μανιτάρια παρουσίασαν τις μέγιστες τιμές τους, την 16^η ημέρα ζύμωσης εκτός του *G. resinaceum* και *G. adspersum* στο υπόστρωμα κυτταρίνης που παρουσίασαν τις μέγιστες τιμές τους την 24^η ημέρα. Η μείωση της ποσότητας πολυσακχαρίτη που συντίθεται κατά τη ζύμωση του *G. resinaceum* σε

ΥΕΑ έχει παρατηρήθει και σε άλλα είδη μυκήτων που καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη. Σύμφωνα με Diamantopoulou et al. 2012, Diamantopoulou et al. 2014, και Diamantopoulou et al. 2016, καταγράφηκε παρόμοια τάση στα είδη *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, και *Morchella esculenta* με το IPS (% w/w) να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου από τη 12^η ημέρα της καλλιέργειας (ανάλογα με τον μύκητα).

Σχετικά με την παραγωγή IPS, από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι για την επίτευξη υψηλής απόδοσης σε IPS απαιτείται χαμηλή θερμοκρασία επώασης (10-15 °C), χαμηλή αναλογία C/N και ελάχιστη διάρκεια καλλιέργειας τις 10 ημέρες (Lee κ.α., 2007). Η συγκέντρωση των IPS επηρεάστηκε από την πηγή C του υποστρώματος, με την ξυλόζη, άμυλο και γλυκόζη να ευνοούν την παραγωγή τους. Οι λόγοι C/N: 18-25 θεωρήθηκαν και από τους Babitskaya et al. (2005) ως οι καταλληλότεροι για την παραγωγή IPS (9-13%, κ.β.) στο είδος *G. lucidum*. Με τα αποτελέσματα συμφωνούν και οι Diamantopoulou et al. 2012, οι οποίοι μελέτησαν τους μύκητες *A. aegerita*, *F. velutipes*, *P. pulmonarius* και *G. applanatum* με τιμές παραγωγής IPS_{max} (5,8-11 g/l) και IPS % κ.β. (30-65% κ.β.), με τα καλύτερα υποστρώματα στην παραγωγή των IPS να αποτελούν η γλυκόζη (4,5-5,5 g/l, 40%, κ.β.) και το άμυλο (5,2 g/l, 33%, κ.β.). Οι Diamantopoulou et al. (2014), κατά την καλλιέργεια των μακρομυκήτων *M. esculenta* και *G. applanatum* σε ζυμώσεις βυθού διάρκειας 20 ημερών με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη (30 g/l) και λόγο C/N ~20 υπό στατικές συνθήκες, κατέγραψαν τιμές 3,86 και 6,3 g/l, με ποσοστά IPS επί ξηρής βιομάζας 30,40 και 40,90%, κ.β., αντίστοιχα. Οι Pokhrel και Ohga (2007) υποστήριξαν ότι η γλυκόζη ήταν το καταλληλότερο σάκχαρο για τη σύνθεση των IPS από τον φαρμακευτικό μακρομύκητα *L. decastes* κατά την αύξησή του σε αναδευόμενες φιάλες και ακολούθησε η ξυλόζη. Ακόμη, διαπιστώθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της εκμετάλλευσης της γλυκόζης προς σχηματισμό βιομάζας ($Y_{X/Glc}$) με την βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών ($Y_{IPS/Glc}$), στις στατικές. Η ποσότητα των IPS εκτιμάται ως αρκετά ικανοποιητική με δεδομένο ότι με τις ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές αλλά και κατά τους Petre κ.α. (2010) το περιεχόμενο τριών μανιταριών του *G. lucidum* σε πολυσακχαρίτες κυμάνθηκε από 3,70-5,23 g/l. Σύμφωνα με Diamantopoulou et al. 2021, το είδος *G. resinaceum* με την παρουσία ΥΕΑ ενίσχυσε τη σύνθεση του IPS (με μέγιστες απόλυτες τιμές 4,0–5,2 g/l που αντιστοιχούν σε 35–42% w/w). Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι οι τιμές IPS κυμαίνονταν με το χρόνο, εξαρτημένες από τη διαθέσιμη ποσότητα γλυκόζης στα μέσα, δείχνοντας μέγιστη τιμή κυρίως την 8^η ημέρα της καλλιέργειας.

4.2 Κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων για τα τέσσερα μανιτάρια του *Ganoderma*.

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εύρεση της κατάλληλης επιλογής πηγής αζώτου σε υγρά υποστρώματα, με βάση το είδος του μύκητα που χρησιμοποιείται. Στη παρούσα εργασία, για την μελέτη της κινητικής κατανάλωσης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των ειδών *Ganoderma* στα πέντε υγρά θρεπτικά υποστρώματα ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν το εκχύλισμα ζύμης και η πεπτόνη που θεωρούνται τα πιο αποδοτικά σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Elisashvili et al., 2009; Moonmoon et al., 2008; Meng et al., 2010; Paraspyridi et al., 2011).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το θρεπτικό μέσο κυτταρίνης κατανάλωσε το μεγαλύτερο ποσοστό για την κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (64,48– 85,55%) με πηγή άνθρακα την κυτταρίνη παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη απομάκρυνση στο μανιτάρι *G. adspersum*. Δεύτερο το θρεπτικό μέσο του αμύλου (71,22 – 83,36%) με πηγή άνθρακα το άμυλο παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη απομάκρυνση στο μανιτάρι *G. adspersum*. Τρίτο το θρεπτικό μέσο της λιγνίνης (52,52-70,39%) με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη απομάκρυνση στο μανιτάρι *G. applanatum*. Τέταρτο το θρεπτικό μέσο των YEA (36,31-58,22%) με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη απομάκρυνση στο μανιτάρι *G. adspersum* ενώ το θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές (14,69-48,98%) με πηγή άνθρακα την ξυλόζη παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη απομάκρυνση στο μανιτάρι *G. resinaceum*.

Σύμφωνα με την μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει έλλειψη δεδομένων που αφορούν την κατανάλωση αζώτου ελεύθερων αμινομάδων σε ζυμώσεις με είδη *Ganoderma* σε θρεπτικά υποστρώματα όπως αυτά που χρησιμοποιήσα. Για αυτό τον λόγο τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να συγκριθούν με την κατανάλωση αζώτου ελεύθερων αμινομάδων που πραγματοποιήθηκε από τον ασκομύκητα *M. purpureus* σε υγρές ζυμώσεις υπό ανάδευση με θρεπτικό μέσο τα υγρά απόβλητα αρτοποιίας και με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη (Haque et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, καταναλώθηκε περίπου ποσοστό της τάξης του 97% του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων για τα υγρά υποστρώματα με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 5-20 g/l τα οποία αποτελέσματα συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Όσον αφορά τα μικρότερα ποσοστά κατανάλωσης του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων που παρατηρήθηκαν στα θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα γλυκόζη πιθανώς οφείλονται στην

μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση αζώτου που υπήρχε στα συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα. Επίσης, το άζωτο είναι το δεύτερο πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό σε ζυμώσεις μυκήτων, καθώς είναι απαραίτητο στον κυτταρικό μεταβολισμό. Οι μακρομύκητες επιλέγουν να καταναλώσουν αρχικά τις πηγές άνθρακα (οι οποίες είχαν υψηλότερες τιμές στα θρεπτικά υποστρώματα των ΥΕΑ και της λιγνίνης) για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες και στη συνέχεια τις πηγές αζώτου.

4.3 Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, αποφαινόλωση και αποχρωματισμός στα υγρά θρεπτικά μέσα.

Κατά την καλλιέργεια των τεσσάρων μανιταριών *Ganoderma* πραγματοποιήθηκε παραλαβή και ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου και της λιγνίνης που έγινε προσθήκη στα θρεπτικά μέσα της καλλιέργειας. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα αποχρωματισμού του περιεχομένου, καθώς οι βασιδιομύκητες λευκής σήψης είναι ικανοί να παράγουν λιγνολυτικά ένζυμα τα οποία μπορούν να αποδημήσουν τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα ΥΕΑ και την λιγνίνη λόγω της παρόμοιας δομής τους με την λιγνίνη.

Στο θρεπτικό υπόστρωμα ΥΕΑ η μικρότερη τιμή συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε την τελευταία ημέρα της ζύμωσης και για τα τέσσερα μανιτάρια (0,46 – 0,49 g/l) με ποσοστό αποφαινόλωσης 70,15 – 72,12% και για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης, η μικρότερη τιμή συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε την τελευταία ημέρα της ζύμωσης (0,40 – 0,57 g/l) με ποσοστό αποφαινόλωσης 52,07 – 66,58%. Μεγαλύτερα ποσοστά αποφαινόλωσης καταγράφηκαν από το θρεπτικό μέσο των ΥΕΑ. Σύμφωνα με Diamantopoulou et al. 2021, η μείωση των φαινολών από το *G. resinaceum* ήταν 94,5%. και σε προηγούμενες μελέτες για το είδος *G. applanatum* ήταν 94% (Matos et al. 2007). Για τον αποχρωματισμό του ΥΕΑ τα μέγιστα ποσοστά καταγράφηκαν την τελευταία ημέρα της ζύμωσης (24,72 - 45,37%) και το μεγαλύτερο ποσοστό καταγράφηκε στο είδος *G. resinaceum*. Για τον αποχρωματισμό του υποστρώματος λιγνίνης, οι μέγιστες τιμές καταγράφηκαν την τελευταία ημέρα (42,34-78,59%) με το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού στο είδος *G. adspersum*.

Η παραγωγή ολικών φαινολικών ενώσεων δεν διέφερε ιδιαίτερα στα δύο θρεπτικά μέσα ανάπτυξης, λιγνίνης και ΥΕΑ. Η κινητική συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων παρουσίασε καθοδική τάση σε σχέση με την διάρκεια των ζυμώσεων. Το

φαινολικό περιεχόμενο καθορίζεται από το είδος των μυκήτων, το γένος και το είδος της εκχύλισης και τον τρόπο καλλιέργειας που ακολουθήθηκε. Επίσης, ο διαφορετικός χρόνος ολοκλήρωσης της ζύμωσης αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει τη σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, δεδομένου ότι σε πείραμα που έγινε αποκλειστικά με *G. lucidum* το φαινολικό περιεχόμενο αποδείχθηκε ότι ήταν χρονο-εξαρτώμενο της ζύμωσης (Chien κ.α., 2011).

Σύμφωνα με Diamantopoulou et al. 2021, το είδος *G. resinaceum* στην επεξεργασία αποβλήτων ΥΕΑ, έδειξαν ότι σημειώθηκε σημαντική μείωση φαινολών (94,5%) και αποχρωματισμός (76,5%) παρομοίως για το είδος *G. applanatum*, είχε καταγραφεί μείωση φαινολών 73% από τους Matos et al. (2007). Οι Zerva et al. (2017), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού των μανιταριών *P. citrinopileatus*, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΕΑ (25%) με μέγιστη μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά (86,4%) και μέγιστο αποχρωματισμό κατά (79.1%). Επίσης, οι Ntougias et al. (2012), μελέτησαν την ικανότητα αποφαινόλωσης και αποχρωματισμού διαφόρων μανιταριών του γένους *Pleurotus*, σε υγρές καλλιέργειες βυθού με συγκέντρωση ΥΕΑ (25% v/v) παρουσιάζοντας ποσοστά μείωσης 62,5 – 73,9% και ποσοστά αποχρωματισμού 44,0% και 64,8%.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι βασιδιομύκητες διαθέτουν μεγάλη ικανότητα απορρύπανσης των ΥΕΑ και λιγνίνη και συνεπώς η καλλιέργεια τους με σκοπό την επεξεργασία και αποτοξίνωση των υγρών αποβλήτων είναι μια διεργασία η οποία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και θετικές προοπτικές ως μέθοδος βιολογικής επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργίας.

4.4 Πρωτεΐνες

Για την συγκεκριμένη μέτρηση επιλέχθηκαν λυοφυλιωμένα και λειοτριβημένα δείγματα από τα μυκήλια με το μεγαλύτερο βάρος για κάθε υπόστρωμα και είδος δηλαδή από την τελευταία ημέρα ζύμωσης. Η παραγωγή πρωτεϊνών κυμάνθηκε μεταξύ 9,31-15,16 % w/w με την μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεϊνών να εμφανίζεται στο θρεπτικό υπόστρωμα της κυτταρίνης για όλα τα μανιτάρια στο μακρομύκητα *G. adspersum* (15,16% w/w), επομένως ο μύκητας αυτός φάνηκε αποδοτικός στην παραγωγή πρωτεϊνών. Έπειτα, ακολούθησε το είδος *G. resinaceum* με παραγωγή πρωτεϊνών 14,84% w/w, τρίτος ο *G. applanatum* με παραγωγή πρωτεϊνών 14,40% w/w και τέλος ο *G. lucidum* με παραγωγή πρωτεϊνών 13,61% w/w.

Ακόμη, το μανιτάρι *G. adspersum* παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές παραγωγής πρωτεϊνών στα θρεπτικά υποστρώματα του αμύλου (13,59% w/w), της ημικυτταρίνης (13,12% w/w) και στα ΥΕΑ (11,64% w/w). Στο θρεπτικό μέσο της λιγνίνης, την μεγαλύτερη τιμή παρουσίασε το μανιτάρι *G. lucidum* (13,33% w/w).

Το θρεπτικό μέσο της κυτταρίνης παρουσίασε την μικρότερη παραγωγή βιομάζας συγκριτικά με τα άλλα τέσσερα υποστρώματα, ωστόσο παρουσίασε την μέγιστη παραγωγή πρωτεϊνών, οπότε δεν είχε καταναλωθεί ολοκληρωτικά η πηγή άνθρακα, ευνοώντας τους περισσότερους μύκητες ως προς την βιοσύνθεση πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με Κέντρη, 2016 ο οποίος μελέτησε το είδος *G. resinaceum*, οι τιμές που κατέγραψε ήταν στο ίδιο μήκος κύματος με την συγκεκριμένη εργασία καθώς κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις για τις ολικές πρωτεΐνες συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη βιομάζας στις αντίστοιχες ημέρες δειγματοληψίας. Το % ποσοστό των συστατικών εκφρασμένο σε ξηρό βάρος διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο της ανάπτυξης του μύκητα.

Οι πρωτεΐνες συνήθως κυμαίνονται από 15% - 35%. Επιπλέον, η βιομάζα των μυκήτων έδειξε περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες παρόμοιες με αυτές άλλων πηγών, όπως π.χ στήθος κοτόπουλου (21,5%), μοσχαρίσιο κρέας (16,7%), λευκόψαρο (21,5%) και αυγό κοτόπουλου (13,3%), το οποίο έδειξε τη δυνατότητα αυτών των μανιτάρια ως πηγές πρωτεΐνης (NEPA, 2006).

4.5 Παραγωγή ενζύμων

Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν τη δυνατότητα μέσω ενός ενζυμικού συστήματος που διαθέτουν να διασπών τη λιγνίνη και έτσι μπορούν να αναπτύσσονται σε λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Τα κύρια ένζυμα που παράγουν είναι η λακκάση, η υπεροξειδάση της λιγνίνης και η Mn-υπεροξειδάση (Jaouani, et al., 2005; Arora et al., 2002). Ως εκ τούτου, απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες για την κατανόηση των διαφορετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ενζυματική αποικοδόμηση της λιγνίνης και για την εύρεση αποτελεσματικών μανιταριών μυκήτων που αποικοδομούν τη λιγνίνη για βιοτεχνολογικές διεργασίες.

Για το θρεπτικό υπόστρωμα των ΥΕΑ, στα πρώτα σημεία ζύμωσης ήταν χαμηλές οι τιμές της λακκάσης με μία απότομη αύξηση την 32^η ημέρα στην οποία εμφάνισε την μέγιστη ενεργότητα λακκάσης (προτελευταίο σημείο) και στα 4 μανιτάρια ωστόσο, μειώθηκε απότομα την 37^η ημέρα. Την μεγαλύτερη τιμή, εμφάνισε το είδος *G. lucidum* με τιμή 62,72

U/ml, δεύτερο το είδος *G. applanatum* με τιμή 50,90 U/ml, τρίτο το είδος *G. adspersum* με τιμή 38,57 U/ml και τέταρτο το είδος *G. resinaceum* με τιμή 37,26 U/ml.

Για το θρεπτικό μέσο της λιγνίνης, παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα της λακκάσης, αυξανόταν σταδιακά και για τα 4 μανιτάρια μέχρι την 32^η ημέρα που ήταν το τελευταίο σημείο της καλλιέργειας στο οποίο παρουσίασαν την μέγιστη τιμή παραγωγής ενζύμου και τα τέσσερα είδη Γανόδερμα. Την μεγαλύτερη τιμή ενεργότητα της λακκάσης, εμφάνισε το είδος *G. resinaceum* με τιμή 8,99 U/ml, δεύτερο το είδος *G. adspersum* με τιμή 8,70 U/ml, τρίτο το είδος *G. applanatum* με τιμή 6,91 U/ml και τέταρτο το είδος *G. lucidum* με τιμή 3,63 U/ml.

Συγκριτικά, η ενεργότητα της λακκάσης για τα 2 θρεπτικά υποστρώματα, παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές στο θρεπτικό υπόστρωμα των ΥΕΑ δηλαδή είναι το θρεπτικό υπόστρωμα που παρουσίασε αποδοτικότερη παραγωγή του ενζύμου της λακκάσης.

Σύμφωνα με Diamantopoulou et al. 2021, για το είδος *G. resinaceum*, σε ΥΕΑ, η ενεργότητα της λακκάσης συντέθηκε σε μεγάλο βαθμό στο μέσο της ζύμωσης, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή των 14,75 U/ml ενώ σε σχετικές μελέτες για το *Ganoderma spp.*, καταγράφηκαν τιμές 18,5– 21,23 U/ml από τους Ntougias et al., 2012 και 63–79 U/ml κατά Koutrotsios & Zervakis, 2014. Η καταγραφή της μέγιστης τιμής λακκάσης στη μέση της διαδικασίας ζύμωσης για τα ΥΕΑ, οφείλεται πιθανώς λόγω του χρόνου που απαιτείται για τους μύκητες να προσαρμοστούν στο τοξικό περιβάλλον και σύμφωνα με Diamantopoulou et al. 2021, για το είδος *G. resinaceum*, σε ΥΕΑ η μέγιστη τιμή καταγράφηκε 10-15^η ημέρα της καλλιέργειας και στη συνέχεια μειώθηκε, το οποίο είναι ένα μοτίβο που παρατηρείται επίσης σε άλλα είδη *Ganoderma spp.* (Matos et al. 2007, Ntougias et al. 2012, Koutrotsios & Zervakis, 2014). Επίσης, η δραστηριότητα της ενεργότητας της λακκάσης σχετίστηκε ισχυρά με τη συνολική μείωση των φαινολικών (Aggelis et al., 2002; Aggelis et al., 2003, Koutrotsios & Zervakis, 2014, καθώς και με τον αποχρωματισμό του υποστρώματος (Ntougias et al., 2012) και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ολικού φαινολικού φορτίου (Tsioulpas, et al., 2002; Tomati, et al., 1990).

Συγκριτικά, για τα δύο θρεπτικά μέσα ΥΕΑ και λιγνίνης, η υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές ενεργότητας (λιγνίνη: 1,22 - 2,03 U/ml , ΥΕΑ: 0,11 - 0,35 U/ml) σε σχέση με την εξαρτημένη του μαγγανίου υπεροξειδάση (λιγνίνη: 1,18 – 2,05 U/ml, ΥΕΑ: 0,11 – 0,32 U/ml). Για τα ΥΕΑ, το είδος *G. applanatum* εμφανίστηκε, με την μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας στην υπεροξειδάση ανεξάρτητη και εξαρτημένης του μαγγανίου. Για το θρεπτικό υπόστρωμα της λιγνίνης εξαρτημένης του Μn, τη μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε το είδος *G. resinaceum* και για την ενεργότητα υπεροξειδάσης

ανεξάρτητης του μαγγανίου την μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε το είδος *G. lucidum*.

Σε μελέτη καταγράφηκε ότι το είδος *H. erinaceus* εμφάνισε τη μεγαλύτερη ενεργότητα ενζύμου λακκάσης σε υποστρώματα ΥΕΑ (Λάρου, 2014). Ειδικότερα, στο υπόστρωμα ΥΕΑ η ενεργότητα της λακκάσης ήταν 104 U/μmol με τα υπόλοιπα ένζυμα να εμφανίζουν χαμηλή έως μηδενική ενεργότητα. Επίσης, σύμφωνα με Κέντρη, 2016 η ενεργότητα της λακκάσης παρουσίασε τη μεγαλύτερη δράση για το είδος *G. resinaceum*, σε υποστρώματα ΥΕΑ και ακολούθησαν στη συνέχεια με μικρή διαφορά οι υπεροξειδάσες που είναι ανεξάρτητες του μαγγανίου (ίδιας τάξης μεγέθους) και τη μικρότερη δράση έχουν οι υπεροξειδάσες που είναι εξαρτημένες του μαγγανίου.

Σύμφωνα με την μελέτη Ntougias et. al. 2012, κατέγραψαν την ενεργότητα των υπεροξειδασών εξαρτημένης και ανεξάρτητης του μαγγανίου να εμφανίζουν τιμές αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με την ενεργότητα της λακκάσης για τα γένη *Ganoderma* και *Pleurotus* σε ΥΕΑ. Για την υπεροξειδάση εξαρτημένη του μαγγανίου στα τελευταία στάδια της ζύμωσης, μετρήθηκαν σχετικά χαμηλές δραστηριότητες για το *G. australe* και το *P. eryngii* οι (0,0043 και 0,0045 U/ml αντίστοιχα). Για την δραστηριότητα υπεροξειδάσης ανεξάρτητης του Mn τα δύο είδη *G. australe* και το *P. eryngii* παρουσίασαν παρόμοια μοτίβα στις αντίστοιχες ενζυμικές τους δραστηριότητες επιδεικνύοντας τη μέγιστη τιμή (0,0309 και 0,0361 U/ml την 10^η ημέρα). Πολύ χαμηλές δραστηριότητες εξαρτημένης του Mn μετρήθηκαν και για τα δύο είδη *Pleurotus* με μέγιστες τιμές για το είδος *P. Ostreatus* και τον *P. eryngii* (0,0234 και 0,0257 U/ml αντίστοιχα την 20^η ημέρα). Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα ενζύμου ανεξάρτητη του Mn συσχετίστηκε με την απομάκρυνση των φαινολικών ΥΕΑ από το *P. Ostreatus* (Kirk and Farrell, 1987). Στο παρελθόν, το μοναδικό είδος *Ganoderma* που εξετάστηκε για κατεργασία ΥΕΑ ήταν το *G. applanatum* το οποίο ωστόσο εμφάνιζε μόνο δραστηριότητα λακκάσης (Matos et al., 2007).

Για την υπεροξειδάση εξαρτημένη της λιγνίνης, παρουσιάστηκαν χαμηλές τιμές και συγκεκριμένα για το θρεπτικό υπόστρωμα της λιγνίνης, οι μέγιστες τιμές που καταγράφηκαν ήταν 0,08 – 0,21 U/ml (στα μέσα της ζύμωσης δηλαδή 16^η και 24^η ημέρα), με μέγιστη τιμή να παρουσιάζει το είδος *G. applanatum*. Για το θρεπτικό υπόστρωμα των ΥΕΑ, οι μέγιστες τιμές που καταγράφηκαν ήταν 0,11 – 0,26 U/ml, με μέγιστη τιμή να παρουσιάζει το είδος *G. adspersum* την 37^η ημέρα. Σύμφωνα με Ntougias et. al. 2012, δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα LiP σε δείγματα ΥΕΑ που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από τα γένη *Ganoderma* και *Pleurotus* ενώ στη μελέτη Zhang et. al. 2022, μετά την δραστηριότητα της λακκάσης, εμφάνισε τιμές η δραστηριότητα LiP και στη συνέχεια η δραστηριότητα Mn.

Επομένως, όλα τα μανιτάρια κατάφεραν να αναπτυχθούν και να παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα σε ικανοποιητικό βαθμό. Στην αποτοξικοποίηση του αποβλήτου και στην ανάπτυξη του είδους σημαντικό ρόλο παίζουν τα ένζυμα που παράγει. Τις πρώτες εβδομάδες της ανάπτυξης του μύκητα στο υπόστρωμα δεν παράγεται λακκάση. Οπότε συμπεραίνουμε ότι η ανάπτυξη του μύκητα στη συγκεκριμένη περίοδο διευκολύνεται από τα άλλα δύο ένζυμα (υπεροξειδάσες εξαρτημένη και ανεξάρτητης του μαγγανίου) έστω και σε χαμηλές ενεργότητες τα οποία συνεχίζουν να παράγονται μέχρι το τέλος του πειράματος. Αυτή η φάση υστέρησης στην παραγωγή ενζύμων θα μπορούσε επομένως να αποδοθεί στον χρόνο που απαιτείται για τους συγκεκριμένους μύκητες να προσαρμόσουν τους μηχανισμούς αποδόμησής τους στα συστατικά των ΥΕΑ και για την αντιμετώπιση της τοξικότητάς τους (D' Annibale et al., 2004).

Όσον αφορά στα υδρολυτικά ένζυμα, στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης, η παραγωγή ενζύμου ημικυτταρινάσης, καταγράφηκε 0,94-1,87 U/ml με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ημικυτταρινάσης, στο είδος *G. resinaceum*. Οι τιμές ενεργότητας της αμυλάσης ήταν 1,05-2,12 U/ml με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου αμυλάσης στο είδος *G. lucidum*. Οι τιμές ενεργότητας της κυτταρινάσης ήταν 0,97-1,36 U/ml με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου κυτταρινάσης στο είδος *G. applanatum*. Στο υπόστρωμα ημικυτταρίνης, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης καταγράφηκε 0,014-0,034 U/ml με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, στο είδος *G. applanatum* ενώ στο υπόστρωμα αμύλου, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης παρουσίασε τιμές 0,008-0,046 U/ml με μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, στο είδος *G. applanatum*. Στο υπόστρωμα κυτταρίνης, η ενεργότητα ενζύμου ενδογλυκανάσης καταγράφηκε 0,0029-0,0061 U/ml με την μεγαλύτερη παραγωγή ενζύμου ενδογλυκανάσης, στο είδος *G. resinaceum*.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί η παραγωγή ξυλανάσης, ενδογλυκανάσης στο είδος *G. lucidum* (Rai κ.α., 2004), *G. adpersum* (Elissetche et al., 2007; Ríos & Eyzaguirre, 1992), *G. applanatum* (Elisashvili et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη του Deveci et. al., 2020, τα αποτελέσματα που κατέγραψε για την γλυκανάση στο είδος *G. adpersum* 0,20 mg/ml ενώ για την αμυλάση καταγράφηκαν τιμές για τα είδη *G. adpersum* 0,22 mg/ml, *G. sepiarium* 0,23 mg/ml και *G. trabeum* 0,33 mg/ml.

5 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η χρήση κατάλληλης συγκέντρωσης των θρεπτικών υποστρωμάτων που μελετήθηκαν για την ανάπτυξη των τεσσάρων βασιδιομυκήτων λευκής σήψης του γένους *Ganoderma* σε ζυμώσεις βυθού με στατικές συνθήκες, οδήγησαν στην αξιοποίηση του υγρού αποβλήτου καθιστώντας το πιο ασφαλές για την εναπόθεσή του στο περιβάλλον και στην παραγωγή ικανοποιητικών συγκεντρώσεων μυκηλίου. Τα τέσσερα διαφορετικά μανιτάρια, απομάκρυναν το ρυπαντικό φορτίο (αποφαινόλωση και αποχρωματισμός) σε ικανοποιητικά επίπεδα και συνεπώς η καλλιέργεια τους με σκοπό την επεξεργασία και αποτοξίνωση των υγρών αποβλήτων είναι μια διεργασία η οποία παρουσιάζει θετικές προοπτικές ως μέθοδος βιολογικής επεξεργασίας. Οι μύκητες *Ganoderma* παρήγαγαν σημαντική ποσότητα μυκηλιακής βιομάζας, πρωτεϊνών και ενζύμου λακκάσης, με ταυτόχρονη βιοσύνθεση σημαντικής ποσότητας IPS και ικανοποιητικές τιμές απομάκρυνσης φαινολικών και αζώτου. Με τους μελετώμενους βασιδιομύκητες του γένους *Ganoderma*, να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία στην βιολογική επεξεργασία των συγκεκριμένων υποστρωμάτων με σκοπό την μείωση του ρυπαντικού φορτίου, ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας (βιομάζα, πολυσακχαρίτες, φαινολικές και αντιοξειδωτικές ουσίες) και παραγωγής ενζύμων με μεγαλύτερη ενεργότητα να παρουσιάζουν τα λιγνολυτικά ένζυμα, έναντι των ενζύμων υδρόλυσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στην βιομηχανία τροφίμων, όσο και σε φαρμακοβιομηχανίες. Η μεγάλη βιολογική δραστηριότητα που διαθέτει ο συγκεκριμένος βασιδιομύκητας οδηγεί στην ανάπτυξη του αγροτικού, επιστημονικού και εμπορικού ενδιαφέροντος.

6 Βιβλιογραφία

- Adams, E. W., Ratner, D. M., Bokesch, H. R., McMahon, J. B., O'Keefe, B. R., & Seeberger, P. H. (2004). Oligosaccharide and glycoprotein microarrays as tools in HIV glycobiochemistry: glycan-dependent gp120/protein interactions. *Chemistry & biology*, 11(6), 875-881.
- Adaskaveg, J. E., & Gilbertson, R. L. (1995). Wood decay caused by *Ganoderma* species in the *G. lucidum* complex. In *Ganoderma—systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of Contributed Symposium A* (Vol. 59, pp. 14-21).
- Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., & Zervakis, G. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2), 353-360.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., ... & Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, 37(16), 3897-3904.
- Almaguer, M., Rojas-Flores, T. I., Rodríguez-Rajo, F. J., & Aira, M. J. (2014). Airborne basidiospores of *Coprinus* and *Ganoderma* in a Caribbean region. *Aerobiologia*, 30(2), 197-204.
- Alshikh, N., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2015). Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. *Journal of functional foods*, 18, 1022-1038.
- Amaral, A. E., Carbonero, E. R., Rita de Cássia, G. S., Kadowaki, M. K., Sasaki, G. L., Osaku, C. A., ... & Iacomini, M. (2008). An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *Carbohydrate polymers*, 72(3), 473-478.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 407-416.
- Anwar, Z., Gulfranz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2), 163-173.
- Arora, D. S., & Gill, P. K. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*, 77(1), 89-91.
- Singh Arora, D., & Kumar Sharma, R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(6), 1760-1788.
- Arulpanandi, I., & Kalaichelvan, P. T. (2013). *Ganoderma adspersum* and *Ganoderma cupreum* from South India, first report based on molecular phylogeny. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2(12), 693-702.
- Arvanitoyannis, I. S., Kassaveti, A., & Ladas, D. (2008). Food waste treatment methodologies. *Waste management for the food industries*, 345.
- Ayin, C. M., Alvarez, A. M., Awana, C., Schleinzner, F. M., Marx, B. D., & Schlub, R. L. (2019). *Ralstonia solanacearum*, *Ganoderma australe*, and bacterial wetwood as predictors of ironwood tree (*Casuarina equisetifolia*) decline in Guam. *Australasian Plant Pathology*, 48(6), 625-636.
- Ayissi, V. B. O., Ebrahimi, A., & Schluesener, H. (2014). Epigenetic effects of natural polyphenols: A focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Molecular nutrition & food research*, 58(1), 22-32.
- Babitskaya, V. G., Shcherba, V. V., Puchkova, T. A., & Smirnov, D. A. (2005). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: factors affecting their production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(2), 169-173.
- Bermek, H., Li, K., & Eriksson, K. E. L. (2002). Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology*, 85(3), 249-252.
- Bilal, A. W. (2010). Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2598-2604.
- Bishop, A. E., Sawyer, M., Alber-Morgan, S. R., & Boggs, M. (2015). Effects of a graphic organizer training package on the persuasive writing of middle school students with autism. *Education and Training in Autism and Developmental Disabilities*, 290-302.
- Block, J., Patterson, V., Block, J., & Jackson, D. D. (1958). A study of the parents of schizophrenic and neurotic children. *Psychiatry*, 21(4), 387-397.
- Bruce, F. (2016). Cellulosic ethanol: what to do with the lignin.

- Campbell, W. G. (1932). The chemistry of the white rots of wood: The effect on wood substance of *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Fomes fomentarius* (Linn.) Fr., *Polyporus adustus* (Willd.) Fr., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Fr., *Armillaria mellea* (Vahl.) Fr., *Trametes pini* (Brot.) Fr., and *Polystictus abietinus* (Dicks.) Fr. *Biochemical Journal*, 26(6), 1829.
- Casas, N., Parella, T., Vicent, T., Caminal, G., & Sarrà, M. (2009). Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere*, 75(10), 1344-1349.
- Cantarelli, C., Brenna, O., Giovanelli, G., & Rossi, M. (1989). Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. *Food Biotechnology*, 3(2), 203-213.
- Chakravarty, D. K. & Mallick, A.K. (1979). Studies on the physiology of mushroom fungi, *Volvariella diplasia* and *V. esculenta*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 9, 9-2.
- Chang-Ho, Y., & Yee, N. T. (1977). Comparative study of the physiology of *Volvariella volvacea* and *Coprinus cinereus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 68(2), 167-172.
- Chang, S. C., & Steinkraus, K. H. (1982). Lignocellulolytic enzymes produced by *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied and environmental microbiology*, 43(2), 440-446.
- Miles, P. G., & Chang, S. T. (1997). *Mushroom biology: concise basics and current developments*. World Scientific.
- Cheung, P. C. (Ed.). (2008). *Mushrooms as functional foods*. John Wiley & Sons.
- Chien, C. M., Cheng, J. L., Chang, W. T., Tien, M. H., Tsao, C. M., Chang, Y. H., ... & Chen, S. T. (2004). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56+ NK-cell cytotoxicity in cord blood. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(21), 5603-5609.
- 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 chemistry*, 126(4), 1586-1592.
- Chin T. C. (2000). Studies on the medicinal properties of local *Ganoderma* sp. Universiti Putra Malaysia Institutional Repository Agricultural Sciences, Research Report, 2 (2): 69-72.
- Christie, P. J., Alfenito, M. R., & Walbot, V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194(4), 541-549.
- Cirillo, V. P., Hardwick, W. A., & Seeley, R. D. (1960). *U.S. Patent No. 2,928,210*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Couto, S. R., & Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 500-513.
- Cui, F., & Dolphin, D. (1990). The role of manganese in model systems related to lignin biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1366- 1371.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International journal of biological sciences*, 5(6), 578.
- 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.
- Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S. (2011). Therapeutic properties and current medical usage of medicinal mushroom: *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(8), 1922.
- Delmas, J. (1989). *Les champignons et leur culture*. Flammarion-La Maison Rustique.
- De Simone, D., & Annesi, T. (2012). Occurrence of *Ganoderma adspersum* on *Pinus pinea*. *Phytopathologia Mediterranea*, 374-382.
- Dey, S., Maiti, T. K., & Bhattacharyya, B. C. (1991). Lignin peroxidase production by a brown-rot fungus *Polyporus ostreiformis*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 72(5), 402-404.
- Diamantis, I., Melanouri, E. M., Dedousi, M., Panagopoulou, I., Papanikolaou, S., Stoforos, N. G., & Diamantopoulou, P. (2022). Sustainable and Eco-Friendly Conversions of Olive Mill Wastewater-Based Media by *Pleurotus pulmonarius* Cultures. *Fermentation*, 8(3), 129.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2016). Adaptation of *Volvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food chemistry*, 196, 272-280.
- Diamantopoulou, P., Gardeli, C., & Papanikolaou, S. (2021). Impact of olive mill wastewaters on the physiological behavior of a wild-type new *Ganoderma resinaceum* isolate. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 20570-20585.

- 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 and biotechnology*, 167(7), 1890-1906.
- 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 and Biosystems Engineering*, 37(7), 1385-1400.
- Dill, I., & Kraepelin, G. (1986). Palo podrido: model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6), 1305-1312.
- Domínguez, A., Couto, S. R., & Sanromán, M. (2005). Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 405-409.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356.
- D'souza, T. M., Merritt, C. S., & Reddy, C. A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental Microbiology*, 65(12), 5307-5313.
- Elissetche, J.P., Ferraz, A., Freer, J. and Rodríguez, J. (2007). Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 429-434.
- Elisashvili, V.I., Kachlishvili, E.T., Wasser, S.P., 2009. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45, 531–535.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). Biodegradation of lignin. In *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components* (pp. 225-333). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A., and Soccol, C. R. (2007). Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT* 40, 30–35.
- Fang, Q.-H., and Zhong, J.-J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37 (7): 769–774.
- Fang Q.H. and Zhong J.J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10 (1): 61–65.
- Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B., Harvey, L.M., 2008. Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 63, 33–103.
- 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.
- Fernandes, M. B., Habu, S., Lima, M. A., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2010). Influence of drying methods over in vitro antitumor effects of exopolysaccharides produced by *Agaricus blazei* LPB 03 on submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(3), 253-261.
- Ferreira, S., Duarte, A.P., Ribeiro, M.H.L., Queiroz, J.A. and Domingues, F.C. (2009) Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochem Eng J* 45, 192– 200.
- Ferreira I.C.F.R., L. Barros, R.M.V. Abreu (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, pp. 1543-1560.
- 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.
- Fraga I., Coutinho J., Bezerra R. M., Dias A. A., Marques G., Nunes F.M. (2014). Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydrate Polymers* 111: 936–946.
- Fujita A, et al. (2005) Enhancement of superficial pseudohyphal growth by overexpression of the SFG1 gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 363:97-104
- Furlani, R. P. Z., & Godoy, H. T. (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 154–157.
- Gadd, G. M., & Gadd, G. M. (Eds.). (2001). *Fungi in bioremediation* (No.23). Cambridge University Press.
- Gao, Y., Zhou, S., Chen, G., Dai, X., & Ye, J. (2002). A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Extract (Ganopofy) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4(3).
- Garcha, H. S., Karla, K. L., & Beg, G. M. (1979). Physiology of weed mushrooms. *Mushroom science*.
- Gern, R. M. 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.
- Giavasis I. (2013). Production of microbial polysaccharides for use in food. *Technological Educational Institute of Larissa, Greece* 16: 413-468.
- Glenn, J. K., Akileswaran, L., & Gold, M. H. (1986). Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(2), 688-696.
- Gold, M. H., Wariishi, H., & Valli, K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.
- Greco B., Blasberg M. E., Kosinski E. C., Blaustein D. J., 1999. Response of ER⁺-IR and ER-IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. Center for Neuroendocrine Studies, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA.
- Groombridge, J. J., Jones, C. G., Bayes, M. K., van Zyl, A. J., Carrillo, J., Nichols, R. A., & Bruford, M. W. (2002). A molecular phylogeny of African kestrels with reference to divergence across the Indian Ocean. *Molecular phylogenetics and evolution*, 25(2), 267-277.
- Haque, M. A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A., & Lin, C. S. K. (2016). Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. *Journal of biotechnology*, 231, 55-64.
- Hammel, K. E., Jensen Jr, K. A., Mozuch, M. D., Landucci, L. L., Tien, M., & Pease, E. A. (1993). Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12274-12281.
- Haque, M. A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A., & Lin, C. S. K. (2016). Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. *Journal of biotechnology*, 231, 55-64.
- Hammel, K. E., Jensen Jr, K. A., Mozuch, M. D., Landucci, L. L., Tien, M., & Pease, E. A. (1993). Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12274-12281.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1·5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- Hofrichter, M., & Steinbüchel, A. (Eds.). (2001). *Biopolymers: Lignin, humic substances and coal*. Wiley-Vch.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y., & Shimizu, S. (2002). Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 7(5), 252-262.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *science*, 315(5813), 804-807.
- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W., & Hatakka, A. (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1864-1870.
- Hong, S. G., & Jung, H. S. (2004). Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 96(4), 742-755.
- Howard, R. L., Abotsi, E. L. J. R., Van Rensburg, E. J., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of biotechnology*, 2(12), 602-619.
- Hsieh, C., Tseng, M. H., & Liu, C. J. (2006). Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 109-117.
- Hsieh, C., & Yang, F. C. (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 91(1), 105-109.
- Huie, C. W., & Di, X. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 812(1-2), 241-257.
- Hushiarian, R., Yusof, N. A., & Dutse, S. W. (2013). Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives. *SpringerPlus*, 2(1), 1-12.
- Ihayere, C. A., Oghenekaro, A. O., Osemwegie, O. O., & Okhuoya, J. A. (2010). Chemical nature of *Ganoderma lucidum* (Curtis) Karsten from woodlands of Edo State, Nigeria. *Continental Journal of Biological Sciences*, 3, 8-15.
- Israilides, C., & Philippoussis, A. (2003). Bio-technologies of recycling agro-industrial wastes for the production of commercially important fungal polysaccharides and mushrooms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 20(1), 247-260.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M. J., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2005). Role of *Pycnoporus*

- coccineus laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 478-486. 145
- Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hur, H., Lee, G. W., Lee, T. S., & Lee, U. Y. (2008). Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology*, 36(1), 28-33.
- Jiang, Y., Wang, H., Lü, L., & Tian, G. Y. (2005). Chemistry of polysaccharide Lzps-1 from *Ganoderma lucidum* spore and anti-tumor activity of its total polysaccharides. *Yao xue xue bao= Acta Pharmaceutica Sinica*, 40(4), 347-350.
- Jong, S. C., & Birmingham, J. M. (1992). Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in applied microbiology*, 37, 101-134.
- Kadowaki, K., Leschen, R. A., & Beggs, J. R. (2011). No evidence for a *Ganoderma* spore dispersal mutualism in an obligate spore-feeding beetle *Zearagytodes maculifer*. *Fungal Biology*, 115(8), 768-774.
- Kim, H. M., Paik, S. Y., Ra, K. S., Koo, K. B., Yun, J. W., & Choi, J. W. (2006). Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *The Journal of Microbiology*, 44(2), 233-242.
- 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.
- Kirk T. K., Farrell R. L. (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *National library of Medicine. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- Ko, S. J., Ford, J. D., Kassam-Adams, N., Berkowitz, S. J., Wilson, C., Wong, M., ... & Layne, C. M. (2008). Creating trauma-informed systems: Child welfare, education, first responders, health care, juvenile justice. *Professional psychology: Research and practice*, 39(4), 396.
- 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.
- Kües, U., & Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(2), 141-152.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., & Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters*, 169(2), 247-250.
- 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.
- Latgé, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, 66(2), 279-290.146
- 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.
- Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J. K., Ka, K. H., & Park, S. Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and microbial technology*, 40(2), 249-254.
- Lee, S., Park, S., Oh, J. W., & Yang, C. H. (1998). Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta medica*, 64(04), 303-308.
- 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(17), 6745-6750.
- Liu, Y. T., Sun, J., Luo, Z. Y., Rao, S. Q., Su, Y. J., Xu, R. R., & Yang, Y. J. (2012). Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1238-1244.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., & Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2(3), 285-299.147
- Litchfield, J. H., & Overbeck, R. C. (1965). Submerged culture growth of *Morchella* species in food processing waste substrates. *Proc. 1st Intern. Congr. Food Sci. Technol., London*, 2, 511.
- JOHNSON, K. M., & Busta, F. F. (1978). FATE OF AFLATOXIN B₂ IN A TWO-STEP MICROBIAL RECOVERY SYSTEM FOR FOOD INDUSTRY WASTES. *Journal of Food Science*, 43(4), 1303-1306.
- Liu, X., Yuan, J. P., Chung, C. K., & Chen, X. J. (2002). Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. *Cancer letters*, 182(2), 155-161.

- Lull, C., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of inflammation*, 2005(2), 63-80.
- Luo, Q., Wei, X. Y., Yang, J., Luo, J. F., Liang, R., Tu, Z. C., & Cheng, Y. X. (2017). Spiro meroterpenoids from *Ganoderma applanatum*. *Journal of Natural Products*, 80(1), 61-70. 148
- Maciel, M. J. M., & Ribeiro, H. C. T. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6), 14-15.
- Magday Jr, J. C., Bungihan, M. E., & Dulay, R. M. R. (2014). Optimization of mycelial growth and cultivation of fruiting body of Philippine wild strain of *Ganoderma lucidum*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(2), 162-172.
- Mäkelä, M., Galkin, S., Hatakka, A., & Lundell, T. (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial technology*, 30(4), 542-549.
- Manzi, P., & Pizzoferrato, L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food chemistry*, 68(3), 315-318.
- Martinez, A. T., Barrasa, J. M., Martínez, M. J., Almendros, G., Blanco, M., & González, A. E. (1995). *Ganoderma australe*: a fungus responsible for extensive delignification of some Austral hardwoods. *Ganoderma. Systematics, phytopathology and pharmacology*. Taipei: National Taiwan University. p. 67-77.
- Martinez AT, Barrasa JM, Martinez MJ, Almendros G, Blanco M, Gonzalez AE. 1994 – *Ganoderma australe*: A fungus responsible for extensive delignification of some Austral hardwoods. In: *Ganoderma – systematics, Phytopathology and Pharmacology*. Buchanan, P.K.; Hseu, R.S. & Moncalvo, J.M. (eds). Proceedings of contributed symposium 59A, B, The 5th International Mycological Congress. Vancouver, pp. 67–77. 149
- Martin, A. M. (1983). Submerged production of edible mushroom mycelium. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 16(3), 215-217.
- Matos, A. J. F. S., Bezerra, R. M. F., & Dias, A. A. (2007). Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Letters in applied microbiology*, 45(3), 270-275.
- Miller, R. N. G., Holderness, M., Bridge, P. D., Paterson, R. R. M., Sariah, M., Hussin, M. Z., & Hilsley, E. J. (1995). A multidisciplinary approach to the characterization of *Ganoderma* in oil-palm cropping systems. In *Proceedings of the Contributed Symposium (Vol. 59, pp. 57-66)*.
- Mizuno T, Wang G, Zhang J, Kawagishi H, Nishitoba T, Li J. 1995 – *Reishi, Ganoderma lucidum and Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Rev Int*. 11, 151– 166.
- Mekki, A., Dhoubi, A., & Sayadi, S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research*, 161(2), 93-101.150
- 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.
- Mester, T., & Tien, M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International biodeterioration & biodegradation*, 46(1), 51-59.
- Meyer, A. S., Rosgaard, L., & Sørensen, H. R. (2009). The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 337-344.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6-7), 205-216.
- Moncalvo, J. M., & Ryvarden, L. (1998). Nomenclature of ganodermataceae. *synopsis Fungorum*, 11, 1-109.
- Moonmoon, M., Uddin, M.N., Khan, A.S., Ruhul Amin, S.M., 2008. Effect of culture media and environmental factors on the mycelial growth of *Volvariella volvacea*. *Bagladesh J. Mushroom* 2, 33–42.
- Mtui, G. Y. (2009). Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*, 8(8).
- 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 3509-3514.
- NEPA. (2006). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentac ,ão. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. In *Tabela Brasileira de Composic ,ão de Alimentos – TACO (2nd ed.)*. Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentac ,ão.
- Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautová V. and Zervakis G. I. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88 (5): 620-626.
- Oei, Peter. "La culture des champignons." (1993).
- Ofodile LN, Uma NU, Kokubun T, Grayer RJ, Ogundipe OT, Simmonds MS. 2005 – Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytother. Research* 19, 310–313.

- Ofosu-Asiedu, A., Schmidt, O. and Liese, W. (1984). Growth studies of *Volvariella volvacea* for cultivation on wood waste. *Material and Organism* 19, 241-251.
- Okhuoya, J.A., Isikhuemhen, O.S., Tomo, H.A., 2000. Effect of soil factors on growth and yield during sporophore induction from sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Sing. *Int. J. Mushroom Sci.* 3, 3–7.
- O' Reilly P., 2016. Fascinated by Fungi. Exploring the History, Mystery, Facts, and Fiction of the Underworld Kingdom of Mushrooms.
- Pan, S. M., Ye, J. S., & Hseu, R. S. (1997). Purification and characterization of manganese superoxide dismutase from *Ganoderma microsporum*. *IUBMB Life*, 42(5), 1035-1043
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189-259.
- Papaspyridi L.-M., Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E. and Christakopoulos P. (2011). Growth and biomass production with enhanced b-glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences* 11 (1): 65–74.
- Papinutti, L., Lechner, B., 2008. Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1715–1721.
- Papp N., Szabó T., Szabó Z., Nyéki j., Hegedűs A., (2013). Antioxidant capacity and total polyphenolic content in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) fruit. *International Journal of Horticultural Science*, 19(3-4), 33–35.
- Paterson R.R.M. (2006). *Ganoderma*-A therapeutic fungal biofactory *Phytochemistry*, 67. 1985-2001.
- Peters, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(7-8), 806-814.
- Peterson R., Hughes M. (1983). Isolating cultural choice patterns in the US population. *American behavioral scientist*, 26(4), 459-478.
- Petre M., Teodorescu A., Țuluca E., Bejan C., and Ronescu A. (2010). Biotechnology of Mushroom Pellets Producing by Controlled Submerged Fermentation. *Romanian Biotechnological Letters* 15 (2): 50-55.
- Peng X.-R., J.-Q. Liu, Z.-H. Han, X.-X. Yuan, H.-R. Luo, M.-H. Qiu (2013). Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H₂O₂-induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chem.*, 141), 920-926.
- Philippoussis, A., Zervakis, G., Diamantopoulou, P., 2001. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus spp.* *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 191–200.
- Philippoussis, A.N., 2009. Production of Mushrooms Using Agro-Industrial Residues as Substrates, in: Singh nee' Nigam, P., Pandey, A. (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 163–196.
- Pointing S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (1): 20–33.
- Pokhrel, C.P. and Ohga, S. (2007). Submerged culture conditions for mycelia yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry* 105, 641-646.
- Rajoriya A., Tripathy S. S. and Gupta N. (2015). In vitro antioxidant activity of selected *Ganoderma* species found in Odisha, India. *Tropical Plant Research* 2(2): 72–77.
- Rai, R.D., Kamal, S. and Singh, S.K. (2004). Effect of wheat bran supplementation to the sawdust substrate on mycelial growth rate and production of extracellular degradative enzymes by the medicinal reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae). *International Journal for Medicinal Mushrooms* 6 (4), 116-124.
- Reese, E. & Mandels, M. (1959). b-D-1,3 Glucanases in fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 5: 173– 185.
- Rees RW, Flood J, Hasan Y, Potter U, Cooper RM (2009) Basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*); mode of root infection and lower stem invasion by *Ganoderma boninense*. *Plant Pathology* 58 (5): 982-989.
- Ride JP (1980) The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiol Plant Pathol* 16(2): 187–196.
- 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.
- Ríos, S. and Eyzaguirre, J. (1992) Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 667–669.
- Rogalski, J., Szczodrak, J., and Janusza, G. (2006). Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresour. Technol.* 97, 469–476.
- Rop, O., J. Mlcek, and T. Jurikova, (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews* 67 (11): 624-631.
- Russell R. and Paterson M. (2006). *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67(18): 1985– 2001
- Tel-Çayan, G., Muhammad, A., Deveci, E., Duru, M. E., & Öztürk, M. (2020). Isolation, structural characterization, and biological activities of galactomannans from *Rhizopogon luteolus* and *Ganoderma adspersum* mushrooms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2395-

- Sadyś M, Skjøth CA, Kennedy R (2014) Back-trajectories show export of airborne fungal spores (*Ganoderma* sp.) from forests to agricultural and urban areas in England. *Atmospheric Environment* 84: 88-99.
- Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., Baghel, R.K., Prasad, G.B. and Bisen, P.S. (2009) *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 717-742.
- S'anchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 27, 185-194.
- Sayadi, S., Ellouz, R., 1992. Decolourization of olive mill waste- waters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 813-817.
- Schwarze F.W.M.R. and Ferner D. (2003). *Ganoderma* on Trees - Differentiation of species and studies of invasiveness. *Professur für Forstbotanik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg* 27 (1): 1-21.
- Shao, B.M., Dai, H., Xu, W., Lin, Z.B. & Gao, X.M. (2004). Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.pp. 323, 133-141.
- Silva, S. O, Costa, S. M. G., & Clemente, E. (2002). Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) QuéL., substrates and residue after cultivation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 531-535.
- Simonić J, Stajić M, Glamočlija J Vukojević J Duletić-Laušević S and Brčeski I. (2008). Optimization of submerged cultivation conditions for extra- and intracellular polysaccharide production by medicinal ling zhi or reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10 (4): 351-360.
- Sinclair, W. A., & Lyon, H. H. (2005). *Diseases of trees and shrubs* (No. Ed. 2). Comstock Publishing Associates.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 49-55.
- Smith, J.E., Rowan, N.J., Sullivan, R. (2002). Medicinal mushrooms: A rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters* 24(22): 1839-1845.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, pp. 2563-2605.
- Stajić, M., Glamočlija, J., Maksimović, V., Vukojević, J., Simonić, J., and Zervakis, G. (2011). A comparative study of the potential of polysaccharide production and intracellular sugar composition within Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13 (2): 153-158.
- Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J.H. & Sliva, D. (2005). "*Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-β1 from prostate cancer cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330, 46-52.
- 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.
- Tang Y., Li Y.-Y., Li H.-M., Wan D.-J. and Tang Y.-J. (2011). Comparison of lipid content and fatty acid composition between tuber fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (9): 4736-4742.
- Tang, Y.-J., and Zhong, J.-J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (1-2): 20-28.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Tien M. and Kirk TK. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science*, 221, 661-663.
- Tien, M (1983). «Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds.» *Science* 221 (4611): 661-3.
- Tien, M., & Kirk, K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161, 238-249.
- Toledo, V. A. A., 2012. Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees. *Macro to Nano Spectroscopy*, pp. 271 - 290.
- Tomati, V., Galli E., Lena, G., & Suffone, R. (1990). Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil waste waters. *Journal Annali dell' Istituto Sperimentale Agronomico*, 21, pp. 275-279.
- Torres-López, R.I. and Hepperly, P.R. (1988). Nutritional influences on *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing.growth in Puerto Rico. I. Carbon and nitrogen. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 72 (1), 19-29.
- Tortic, M. 1971. *Ganoderma adpersum* (s. Schulz.) Donk (*Ganoderma europaeum* Steyaert) and its distribution in Yugoslavia. *Acta Botanica Croatica*. 30: 113-118.

- Tseng, D.S. (1974). Studies on nutritional requirements and improvement of techniques in cultivation of straw mushroom *Volvariella volvacea* (Bull. Ex. Fr.) Sing. M.Sc. thesis, National China Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., & Aggelis, G. (2002). Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biosource Technology*, 84, pp. 251-257.
- Tuno N (1999) Insect feeding on spores of a bracket fungus, *Elfvigia applanata* (Pers.) Karst. (*Ganodermataceae*, *Aphyllphorales*). *Ecological Research* 14 (2): 97-103.
- Turner, P., Mamo, G. and Karlsson, E.N. (2007) Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact* 6, 1–23.
- Van Griensven L. J. L. D., (1988) The cultivation of mushrooms, Mushroom Experiment Station Print Book, English, 1988. Mushroom Experiment Station, Horst, 1988.
- 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.
- Volz, P.A. (1972). Nutritional studies on species and mutants of *Lepista*, *Cantharellus*, *Pleurotus* and *Volvariella*. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 48 (2-3), 175-185.
- Wagner R., Mitchell D.A., Sasaki G.L., Amazonas M.A.L. and Berovi M. (2003). Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides: submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Food Technology and Biotechnology* 41(4): 371-382.
- Wanga, F., Xie-a, H., Chen-a, W., Wangb, E., Guang Du c, F., Song, A., 2013. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 144, 572–578.
- Wang K., L. Bao, W. Xiong, K. Ma, J. Han, W. Wang, W. Yin, H. Liu (2015). Lanostane triterpenes from the Tibetan medicinal mushroom *Ganoderma leucocontextum* and their inhibitory effects on HMG-CoA reductase and α -glucosidase. *J. Nat. Prod.*, 78, pp. 1977-1989.
- Wasser S.P. (2005). Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). Institute of Evolution, University of Haifa, Mount Carmel, Haifa, Israel: 603-622.
- Wong, D.W.S. (2009): Structure and Action Mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 157: 174-209.
- Yang F.-C. and Liao C.B. (1998). Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Engineering* 19 (3): 233- 236.
- Yang, F.-C. and Liao C.-B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry* 33(5): 547–553.
- Zahari, M.A.K.M., Zakaria, M.R., Ariffin, H., Mokhtar, M.N., Salihon, J., Shirai, Y., Hassan, M.A., 2012. Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. *Bioresour. Technol.* 110, 566–571.
- Zengin G., C. Sarikurcu, E. Gunes, A. Uysal, R. Ceylan, S. Uysal, H. Gungor, A. Aktumsek (2015). Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food Funct.*, 6, pp. 2794-2802.
- 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.
- Zhang S., Dong Z., Shi J., Yang C., Fang Y., Chen G., Chen H., Tian C., *Bioresource Technology* Volume 361, October 2022, 127699.
- Zhong, J.-J., Tang, Y.-J., 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites, in: *Biomanufacturing*. Springer, pp. 25–59.
- Zhou L.-W., Cao Y., Wu S.-H., Vlasak J., Li D.-W., Li M.-J. and Dai Y.-C. (2015). Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae* *Polyporales*) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114, 7–15.
- Δεδούση Μ. Σ. (2020). Αξιοποίηση σακχαρούχων βιομηχανικών παραπροϊόντων προς παραγωγή μυκηλιακής μάζας και διατροφικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω χρήσης μακρομυκητίων του γένους *Morchella*. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.
- Διαμαντοπούλου Π. (2012). Κινητικές μελέτες βιοσύνθεσης πολυσακχαριτών και λιπιδίων κατά την καλλιέργεια μακρομυκητίων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.
- Ευσταθιάδου Ευδοξία (2016). Μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσωμάτων

- μυκήτων του γένους *Ganoderma*. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.
- Κέντρη Θ. (2016), Προεπεξεργασία με μύκητες και εύρεση ενζύμων υπεύθυνων για την υδρόλυση και την σακχαροποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας. Διπλωματική Διατριβή. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα.
- Ταούκης Π., Τζιά Κ., Ωραιοπούλου Β.(2009). «Επιστήμη και μηχανική τροφίμων» Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα.
- Φιλιπούσης, Α., 2003. Μελέτη της μορφογένεσης μυκήτων του γένους *Morchella* (Διδακτορική Διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας. Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.
- Χριστακόπουλος, Π., Τόπακας, Ε., 2013. Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Παράρτημα φωτογραφιών



Εικόνα 13: Ανάπτυξη ειδών *Ganoderma*, *G. resinaceum* (αριστερά), *G. adspersum* (δεξιά) σε τρυβλία petri 90 mm με PDA (Merck, Darmstadt, Germany).



Εικόνα 14: Ανάπτυξη μανιταριών γένους *G. lucidum*, στο θρεπτικό μέσο υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, 16η ημέρα ζύμωσης.



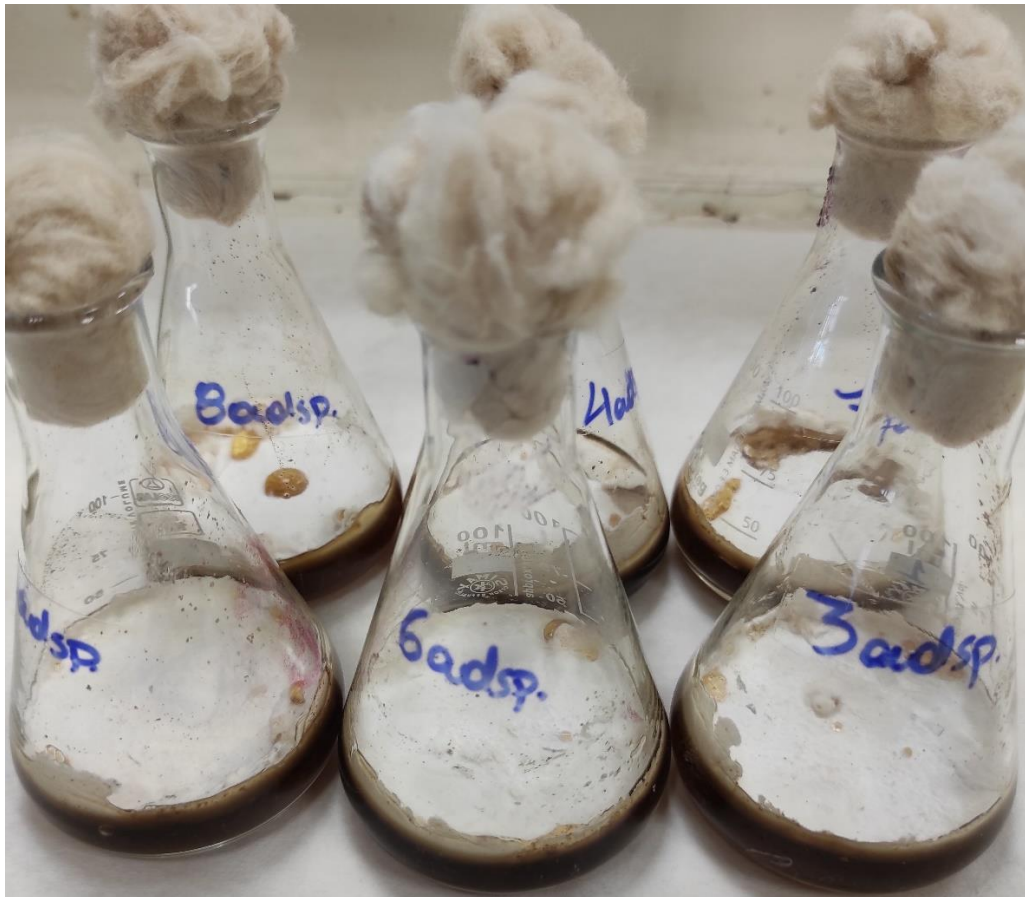
Εικόνα 15: Ανάπτυξη είδους *G. adspersum* στο θρεπτικό μέσο ημικυτταρίνης, 16η ημέρα ζύμωσης.



Εικόνα 16: Ανάπτυξη είδους *G. adspersum* στο θρεπτικό μέσο κυτταρίνης, 8η ημέρα ζύμωσης.



Εικόνα 17: Ανάπτυξη είδους *G. resinaceum* στο θρεπτικό μέσο αμόλου, 16^η ημέρα ζύμωσης.



Εικόνα 18: Ανάπτυξη είδους *G. adpersum* στο θρεπτικό μέσο λιγνίνης, την 16η ημέρα ζύμωσης.



Εικόνα 19: Ανεπτυγμένα μυκήλια στην τελευταία ημέρα ζύμωσης για το θρεπτικό μέσο λιγνίνης. α) *G. adpersum* β) *G. applanatum* γ) *G. lucidum* δ) *G. resinaceum*.